



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 874**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99960396 .2**

96 Fecha de presentación : **16.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1135511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54

Título: **Plantas que metabolizan fosfonatos.**

30

Prioridad: **17.11.1998 US 108763 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.09.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.09.2009**

73

Titular/es: **Monsanto Technology L.L.C.**  
**800 North Lindbergh Boulevard**  
**St. Louis, Missouri 63167, US**

72

Inventor/es: **Barry, Gerard, Francis**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 325 874 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Plantas que metabolizan fosfonatos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la resistencia a los herbicidas en las plantas, y más particularmente a una nueva clase de genes que metabolizan fosfonatos y a los procedimientos para usar estos genes para mejorar la tolerancia de las plantas a los herbicidas de fosfonatos.

10 **Descripción de la técnica anterior**

Las moléculas orgánicas que contienen fósforo pueden presentarse en la naturaleza o pueden obtenerse sintéticamente. Las moléculas orgánicas que contienen enlaces carbono-fósforo (C-P) también pueden encontrarse en la naturaleza o como compuestos sintéticos, y con frecuencia, si se degradan, no se degradan rápidamente por medio de vías enzimáticas naturales. Por consiguiente, los organofosfonatos y fosfinatos sintéticos, los compuestos que contienen un enlace directo carbono-fósforo (C-P) en lugar del enlace más conocido carbono-oxígeno-fósforo de ésteres de fosfato (Metcalf y col., Gene 129: 27-32, 1993) se han usado ampliamente como insecticidas, antibióticos y como herbicidas (Chen y col., J. Biol. Chem. 265: 4461-4471, 1990; Hilderbrand y col., *The role of phosphonates in living systems*. Hilderbrand R. L. ed., páginas 5-29, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1983). Los fosfonatos son ubicuos en la naturaleza y se encuentran solos y en una diversidad de estructuras macromoleculares en una diversidad de organismos (Jiang y col., J. Bacteriol. 177: 6411-6421, 1995). La degradación de las moléculas de fosfonatos tiene lugar a través de una serie de rutas conocidas, una vía de la C-P liasa, una vía de la fosfonatasa y una vía de hidrólisis de C-N (Wanner, Biodegradation 5: 175-184, 1994; Barry y col., Patente de EEUU N° 5.463.175, 1995). Los aislamientos bacterianos capaces de llevar a cabo estas etapas se han caracterizado (Shinabarger y col., J. Bacteriol. 168: 702-707, 1986; Kishore y col., J. Biol. Chem. 262: 12.164-12.168, 1987; Pipke y col., Appl. Environ. Microbiol. 54: 1293-1296, 1987; Jacob y col., Appl. Environ. Microbiol. 54: 2953-2958, 1988; Lee y col., J. Bacteriol. 174: 2501-2510, 1992; Dumora y col., Biochim. Biophys. Acta 997: 193-198, 1989; Lacoste y col., J. Gen. Microbiol. 138: 1283-1287, 1992). Sin embargo, con la excepción de la fosfonatasa y la glifosato oxidasa (GOX), no se han caracterizado otras enzimas capaces de llevar a cabo estas reacciones.

Varios estudios se han centrado en la identificación de genes necesarios para la degradación de los fosfonatos por medio de C-P liasas. Wackett y col. (J. Bacteriol. 169: 710-717, 1987) desvelaron una amplia especificidad de sustrato hacia la degradación del fosfonato por *Agrobacterium radiobacter* y la utilización específica del glifosato como una única fuente de fosfato. Shinabarger y col. y Kishore y col. desvelaron la degradación por medio de C-P liasa del herbicida de fosfonato, glifosato, a glicina y fosfato inorgánico a través del intermedio sarcosina por especies de *Pseudomonas*.

Previamente se ha demostrado que las cepas B de *E. coli* son capaces de utilizar el fosfonato (Chen y col.), mientras que las cepas K-12 de *E. coli* son incapaces de degradar el fosfonato. Sin embargo, se demostró posteriormente que las cepas K-12 contienen una serie completa de genes (*psiD* o *phn*), aunque crípticos capaces de utilizar el fosfonato (Makino y col.), ya que los mutantes se seleccionaban fácilmente por medio del crecimiento en medios bajos en fosfatos que contenían fosfonato de metilo o de etilo como únicas fuentes de fósforo. Se demostró posteriormente que tales cepas K-12 adaptadas para el crecimiento en fosfonato de metilo o de etilo son capaces de utilizar otros fosfonatos como únicas fuentes de fósforo (Wackett y col., J. Bacteriol. 169: 1753-1756, 1987).

Avila y col. (J. Am. Chem. Soc. 109: 6758-6764, 1987) estaban interesados en la evaluación mecánica de los procesos de biodegradación y destoxificación referidos a los fosfonatos de aminometilo, incluida la dilucidación de los intermedios, productos y mecanismos del proceso de desfosforilación degradativa. Avila y col. estudiaron la formación de los productos de biodegradación desfosforilados de una diversidad de sustratos de aminofosfonato en cultivos de *E. coli* K-12 previamente adaptados para crecer en etilfosfonato. Además, Avila y col. utilizaron N-acetil AMPA (N-acetil-amino-metil-fosfonato) como una única fuente de fosfato en algunos de sus estudios para mostrar que el AMPA acetilado no era inhibidor para la escisión del enlace C-P. Además, Avila y col. notaron que el N-acetil-AMPA era capaz de servir como una única fuente de fosfato durante el crecimiento de *E. coli* K-12, sin embargo, no observaron la formación de N-acetil-AMPA cuando se usó AMPA como una única fuente de fosfato. Sus resultados indicaron que el AMPA no era un sustrato para la acetilación en *E. coli*.

Chen y col. identificaron un locus funcional *psiD* de *E. coli* B mediante clonación por complementación en una cepa K-12 de *E. coli* deficiente para la utilización de fosfonato, que permitió a la cepa K-12 utilizar el fosfonato como una única fuente de fosfato (J. Biol. Chem. 265: 4461-4471, 1990). Chen y col. desvelaron de esta manera la secuencia de ADN del locus complementario del *psiD*, identificado en un fragmento de BamHI de 15,5 kb que contiene 17 marcos de lectura abiertos denominados *phnA-phnQ*, que comprenden el operón *phn* de *E. coli* B. Posteriormente se encontró que el operón críptico *phn* (*psiD*) de *E. coli* K-12 contenía una inserción de 8 pares de bases en *phnE*. El cambio de marco resultante en *phnE* no sólo da como resultado un producto genético de *phnE* defectuoso, sino que también causa aparentemente efectos polares en la expresión de los genes secuencia abajo dentro del operón, que evitan la utilización del fosfonato (Makino y col., J. Bacteriol. 173: 2665-2672, 1991). El operón ha sido descrito con más precisión conteniendo los genes *phnC-phnP* por el trabajo de Makino y col. Otra investigación ha estado dirigida a comprender la naturaleza de la función de cada uno de los genes dentro de este operón (Chen y col., J. Biol. Chem.

265: 4461-4471, 1990; Makino y col., J. Bacteriol. 173: Wanner y col., FEMS Microbiol. Lett. 100: 133-140, 1992; Metcalf y col., Gene 129: 27-32, 1993; Ohtaki y col., Actinomyceteol. 8: 66-68, 1994). En todos estos esfuerzos, se ha implicado al gen *phnO* como una proteína reguladora basándose en su similitud con otras proteínas de unión de nucleótidos que contienen motivos estructurales hélice-giro-hélice. Además, la mutagénesis de los genes en el operón *phn* demostró que no se requería *phnO* para la utilización del fosfonato, respaldando además la función reguladora propuesta para este gen (Metcalf y col., J. Bacteriol. 173: 587-600, 1991), al menos para los fosfonatos probados. Se han identificado secuencias de *phn* homólogas de otras bacterias, incluido un gen sustancialmente similar al *phnO* de *E. coli*, aislado de *S. griseus*, usando secuencias de nucleótidos deducidas a partir de las que se encuentran el gen *phnO* de *E. coli* (Jiang y col., J. Bacteriol. 177: 6411-6421, (1995); McGrath y col., Eur. J. Biochem. 234: 225-230, (1995); Ohtaki y col., Actinomyceteol. 8: 66-68, (1994)). Sin embargo, no se ha propuesto otra función diferente de un factor regulador para *phnO*. Se ha citado nuevamente una función reguladora para *phnO* en el operón de C-P liasa en un análisis reciente (Berlyn, Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62: 814-984, 1998).

Los avances en biología molecular, y en particular en las ciencias de las plantas en combinación con la tecnología de ADN recombinante, han permitido la construcción de plantas recombinantes que contienen genes no nativos de importancia agronómica. Además, cuando se incorporan y se expresan en una planta, tales genes confieren de manera deseable algún rasgo o característica ventajosa a la planta recombinante. Una de tales características es la resistencia a herbicidas. Una planta recombinante capaz de crecer en presencia de un herbicida tiene una tremenda ventaja sobre las especies susceptibles al herbicida. Además, las plantas tolerantes a los herbicidas proporcionan un medio más eficaz y económico para la producción agronómica al reducir la necesidad de labranza para controlar las malezas y las plantas espontáneas.

Los herbicidas químicos se han usado durante décadas para inhibir el metabolismo de las plantas, en particular para fines agronómicos como un medio para controlar las malezas y o las plantas espontáneas en campos de plantas de cultivo. Una clase de herbicidas que ha probado ser particularmente eficaz para estos fines son conocidos como herbicidas de fosfonato o de ácido fosfónico. Tal vez, el herbicida de fosfonato agronómicamente más exitoso es el glifosato (N-fosfono-metil-glicina).

Se han construido plantas recombinantes que son tolerantes al herbicida de fosfonato glifosato. Cuando se aplica a las plantas, el glifosato se absorbe en los tejidos de la planta e inhibe la formación de aminoácidos aromáticos, por medio de una inhibición de la actividad de la enzima ácido 5-enolpiruvil-3-fosfohikímico sintasa localizada en los plastidios, también conocida como EPSP sintasa o EPSPS, una enzima que en general se cree que es única de las plantas, bacterias y hongos. Se han transformado plantas recombinantes con una enzima EPSPS bacteriana que es mucho menos sensible a la inhibición por glifosato. Por consiguiente, las plantas que expresan esta EPSPS bacteriana son menos sensibles al glifosato, y se caracterizan frecuentemente como tolerantes al glifosato. Por consiguiente, pueden aplicarse mayores cantidades de glifosato a tales plantas recombinantes, asegurando la muerte de las plantas que son susceptibles o sensibles al herbicida. Sin embargo, se han identificado otros genes que, cuando se transforman en el genoma de una planta, codifican enzimas que también proporcionan tolerancia al glifosato. Una de tales enzimas se ha descrito como GOX, o glifosato oxidorreductasa. La GOX actúa proporcionando protección a las plantas frente al herbicida de fosfonato glifosato al catalizar la degradación del glifosato a ácido aminometil fosfónico (AMPA) y glioxilato. El AMPA producido como un resultado de la degradación de glifosato puede causar blanqueamiento y atrofia o crecimiento disminuido de la planta, entre otras características indeseables. Muchas especies de plantas son también sensibles al AMPA aplicado de manera exógena, así como al AMPA endógeno producido como resultado de la degradación del herbicida glifosato mediada por la GOX. No se ha descrito ningún procedimiento que desvele la protección de las plantas de las aplicaciones de herbicidas de fosfonato tales como AMPA.

Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.633.435) desvelan genes que codifican enzimas EPSP sintasa que son útiles para producir bacterias y plantas transformadas que son tolerantes al glifosato como un herbicida, así como el uso de tales genes como un procedimiento para controlar selectivamente las malezas en un campo plantado de cultivo transgénico. Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.463.175) desvelan genes que codifican enzimas glifosato oxidorreductasas (GOX) útiles para producir bacterias y plantas transformadas que degradan el herbicida glifosato así como plantas de forraje que son tolerantes al glifosato como herbicida. Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.463.175) desvelaron la formación de AMPA como un producto del metabolismo del glifosato mediado por la GOX. Se ha informado que el AMPA es mucho menos fitotóxico que el glifosato para la mayoría de las especies de plantas (Franz, 1985) pero no para todas las especies de plantas (Maier, 1983; Tanaka y col., 1986). La coexpresión de un gen que codifica una proteína capaz de neutralizar o metabolizar el AMPA producido por la degradación del glifosato proporcionará una mejora sustancial sobre el uso de la GOX sola. Por consiguiente, un procedimiento para solucionar la sensibilidad a la formación del AMPA como un resultado de la degradación del glifosato, o un procedimiento para la resistencia al AMPA cuando se usa como un herbicida o como un agente selectivo en procedimientos de transformación de plantas, será útil para proporcionar tolerancia potenciada o mejorada al herbicida en plantas transgénicas y en otros organismos sensibles a tales compuestos.

Se ha descrito el uso del glifosato como un gametocida químico (Patente de EEUU N° 4.735.649). En la misma, se desvela que el glifosato puede, bajo condiciones óptimas, matar aproximadamente el 95% de los gametos masculinos, mientras que deja aproximadamente el 40-60% de los gametos femeninos capaces de fertilizar. Además, se observó típicamente un efecto atrofiante en los niveles de aplicación desvelados, mostrados por una reducción en el tamaño de la planta y por un menor aumento de clorosis. Por consiguiente, un problema importante de usar glifosato como un gametocida, como es en general cierto con la mayoría de los gametocidas, son los efectos laterales fitotóxicos que son

el resultado de la falta de selectividad suficiente para los gametos masculinos. Estas manifestaciones fitotóxicas pueden tener efecto por la producción de AMPA en plantas transgénicas que expresan GOX tras el tratamiento con glifosato. Por consiguiente, sería ventajoso proporcionar un procedimiento para evitar el efecto atrofiante y la clorosis como efectos laterales del uso del glifosato como un gametocida en las plantas transgénicas que expresan GOX. Además, un procedimiento más eficaz matará de manera óptima más del 95% de los gametos masculinos o evitará que los gametos masculinos maduren y dejará sin afectar a más del 60% de los gametos femeninos. Se cree que la coexpresión de GOX específica de tejido con un gen de transacilasa que codifique una enzima capaz de realizar la N-acilación del AMPA alcanzará este objetivo.

Se ha descubierto ahora que el gen *phnO* de *E. coli* codifica una enzima que tiene actividad transacilasa, aciltransferasa, o Acil-CoA transacilasa en la que un sustrato de preferencia es un fosfonato que muestra una amina terminal, y en particular el ácido amino-metil-fosfónico (AMPA). La transferencia de un grupo acilo desde un Acil-CoA a la amina libre terminal del AMPA da como resultado la formación de un AMPA N-acilado. Se sabe que las plantas no acilan el AMPA en gran medida, y se ha mostrado que algunas plantas son sensibles al AMPA e insensibles al acil-AMPA. Por consiguiente, la expresión de *phnO* en plantas será útil para mejorar la tolerancia al herbicida de fosfonato, en particular cuando se usa AMPA como un herbicida o agente selectivo en la transformación de plantas, y más particularmente cuando se usa glifosato como un herbicida en combinación con plantas recombinantes que expresan un gen de GOX.

## 20 Resumen de la invención

Brevemente, por consiguiente la presente invención está dirigida a una planta que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína fosfonato de aminometilo (AMPA)-N-aciltransferasa, en la que dicha proteína AMPA-N-aciltransferasa transfiere un grupo acilo desde un compuesto donador acilado a la amina terminal del AMPA, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a la SEC. ID N° 4, y en la que la expresión de dicha proteína en dicha planta permite a dicha planta ser tolerante al AMPA.

La presente invención está también dirigida a un procedimiento para producir una planta con tolerancia mejorada al herbicida, comprendiendo el procedimiento:

transformar dicha planta con una secuencia de polinucleótidos que comprende

- i) una secuencia de un promotor que funciona en las plantas unida de manera operativa a;
- ii) una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a la SEC. ID N° 4, unida de manera operativa a;
- iii) una secuencia 3' no traducida que funciona en las plantas para causar la terminación de la transcripción; en el que dicha proteína transfiere un grupo acilo desde un compuesto donador acilado a la amina terminal del fosfonato de aminometilo (AMPA).

Entre las varias ventajas que se encuentra que pueden alcanzarse por medio de la presente invención, puede notarse, por consiguiente, la provisión de producción de plantas recombinantes tolerantes a herbicidas transformadas de manera estable que tienen insertada en sus genomas una secuencia de polinucleótidos que codifica un producto genético deseado, de preferencia una enzima N-acil-transferasa. La secuencia de polinucleótidos está compuesta de preferencia de una casete que contiene una secuencia de un promotor que es funcional en las plantas y que está unida de manera operativa 5' a la secuencia estructural del ADN que, cuando se transcribe en una secuencia de ARN, codifica un péptido de enzima N-acil-transferasa. La secuencia del promotor puede ser heteróloga con respecto a la secuencia estructural del ADN y causa suficiente expresión de la enzima transferasa en el tejido de la planta para proporcionar tolerancia al herbicida a la planta transformada con la secuencia de polinucleótidos. La secuencia estructural está de preferencia unida de manera operativa 3' a una secuencia de poliadenilación no traducida 3' que funciona en plantas, y que cuando se transcribe en un ARN junto con la secuencia estructural causa la adición de una secuencia de nucleótidos poliadenilada al extremo 3' del ARN transcrito. La expresión de la secuencia estructural del ADN produce niveles suficientes de la enzima aciltransferasa en el tejido de la planta para mejorar la tolerancia al herbicida de la planta transformada.

Como otra forma de realización, la secuencia estructural del ADN puede también contener una secuencia 5' adicional que codifica una secuencia de péptido amino terminal que funciona en plantas para dirigir el péptido producido de la traducción de la secuencia estructural a un orgánulo intracelular. Esta secuencia codificadora adicional está unida de preferencia en marco a la secuencia estructural que codifica la enzima aciltransferasa. La secuencia del amino péptido terminal puede ser un péptido señal o un péptido de tránsito. El orgánulo intracelular puede ser un cloroplasto, un mitocondrio, una vacuola, retículo endoplásmico, u otra de tales estructuras. La secuencia estructural del ADN puede también estar unida a secuencias 5' tales como secuencias líder no traducidas (UTL), secuencias de intrones, o combinaciones de estas secuencias y similares que pueden servir para mejorar la expresión del producto genético deseado. Las secuencias de intrones pueden introducirse también dentro de una secuencia estructural del ADN que codifica la enzima aciltransferasa. Como alternativa, la transformación de cloroplastos o plastidios puede dar lugar a la localización de una secuencia codificadora de aciltransferasa y enzima al cloroplasto o plastidio, obviando la nece-

sidad de transformación del genoma nuclear, la expresión del genoma nuclear, y la posterior dirección del producto genético a un orgánulo subcelular.

La planta recombinante expresa un gen que codifica una enzima que cataliza la formación de AMPA. La formación del AMPA puede ser el resultado del metabolismo de un precursor que se presenta naturalmente, de un precursor tal como el glifosato proporcionado a la planta, o puede ser el resultado de la formación de AMPA a través de una vía catabólica. La coexpresión de GOX junto con la expresión de AMPA aciltransferasa proporciona una planta que es sorprendentemente más resistente a ciertos herbicidas de fosfonato. Sin embargo, una forma de realización que permite obtener plantas transformadas con sólo una N-aciltransferasa para crecer en presencia de AMPA o compuestos similares o relacionados proporcionará un procedimiento selectivo útil para identificar las plantas transformadas genéticamente, los callos, o los tejidos embriogénicos.

Otra forma de realización abarca la mejora de un procedimiento para producir una planta tolerante al herbicida transformada genéticamente a partir de una célula de planta que expresa un gen de GOX que codifica una enzima glifosato oxidorreductasa expresada en la misma célula de planta en la que se produce una enzima aciltransferasa.

En cualquiera de las anteriores formas de realización, la planta o célula de planta tolerante al herbicida puede seleccionarse del grupo constituido por maíz, trigo, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, canola, lino, cebada, colza oleaginosa, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, lechuga, manzana, álamo, pino, eucalipto, acacia, álamo, liquidambar, pino radiata, pino taeda, picea, teca, alfalfa, tréboles y otros cultivos de forrajes, céspedes, palma de aceite, caña de azúcar, plátano, café, té, cacao, manzanas, nueces, almendras, uvas, cacahuets, semillas de legumbres, petunia, caléndulas, vinca, begonias, geranios, pensamiento, impatiens, avenas, sorgo y mijo.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un cromatograma de HPLC de detección del isótopo [<sup>14</sup>C] que representa una muestra de una disolución de dosificación que contiene sólo [<sup>14</sup>C] glifosato (11,3 minutos, 98,8%), y cantidades trazas de [<sup>14</sup>C] AMPA (5,8 minutos, 0,16%) y un material [<sup>14</sup>C] indefinido (10,2 minutos, 1%).

La Figura 2 ilustra un perfil de HPLC de una mezcla de patrones de los metabolitos radiactivos observados [<sup>14</sup>C] AMPA, [<sup>14</sup>C] glifosato, y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA, así como la impureza identificada como N-acetil-N-metil-[<sup>14</sup>C]-AMPA.

La Figura 3 ilustra un perfil representativo de HPLC de un extracto de un tejido de callo de maíz transformado con GOX y AMPA acetiltransferasa, y tratado con [<sup>14</sup>C] glifosato. Los picos indican [<sup>14</sup>C] glifosato (10,8 minutos, 92,5% del [<sup>14</sup>C] observado total, [<sup>14</sup>C] AMPA generado principalmente por degradación del glifosato mediada por GOX (5,98 minutos, 1,71% del [<sup>14</sup>C] observado total), y N-acetil-[<sup>14</sup>C] AMPA producido de la acilación de [<sup>14</sup>C] AMPA mediada por aciltransferasa de AMPA recombinante expresada dentro del tejido del callo (13,29 minutos, 4,54% del [<sup>14</sup>C] observado total).

La Figura 4 ilustra el plásmido pMON17261.

La Figura 5 ilustra el plásmido pMON32571.

La Figura 6 ilustra el plásmido pMON32936.

La Figura 7 ilustra el plásmido pMON32946.

La Figura 8 ilustra el plásmido pMON32948.

### Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción detallada de la invención se proporciona para ayudar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. Aún así, la siguiente descripción detallada no debe considerarse que limite indebidamente la presente invención, ya que los expertos en la técnica pueden realizar modificaciones y variaciones en las formas de realización analizadas en el presente documento sin apartarse del espíritu o ámbito del presente descubrimiento de invención.

Muchas palabras y frases son bien conocidas en la técnica de biología molecular, microbiología, química de proteínas y ciencias de las plantas y por lo general tienen su significado completo y convencionalmente conocido, por lo demás considerado en el contexto. Sin embargo, las siguientes palabras y frases según se usan en el presente documento tienen los significados que se exponen en general a continuación.

*AMPA aciltransferasa.* Según se usa en el presente documento, AMPA aciltransferasa se refiere a una enzima que funciona en la transferencia de un grupo químico acilo desde un compuesto vehículo de acilo tal como la coenzima A, que es muy conocido y se abrevia en la técnica biológica y química como CoA. En particular, una AMPA aciltransferasa transfiere un grupo químico acilo desde un vehículo de acilo hasta un grupo amino libre de aminometilfosfonato, que se sabe que es un subproducto del metabolismo del glifosato mediado por la glifosato oxidorreductasa. En el pre-

sente documento se ha mostrado que la AMPA aciltransferasa (AAT), que en el presente documento puede conocerse también como AMPA acetiltransferasa, AMPA transacilasa, o acetil-AMPA sintasa (AAS), es capaz de tener actividad acetil transferasa, actividad propionil transferasa, actividad malonil transferasa, y actividad succinil transferasa. Por consiguiente, cualquier equivalente biológicamente funcional de estos compuestos (acetilo, propionilo, malonilo o succinilo) que sirve como una forma de sustrato de vehículo de acilo capaz de funcionar con una enzima AMPA aciltransferasa está dentro del ámbito de la presente invención. En la técnica se ha referido a una AMPA aciltransferasa que se ha identificado, y mostrado por ejemplo en el presente documento que funciona según la descripción contenida en el presente documento, como PhnO, una proteína codificada por el gen de *phnO* dentro del operón *phn* de *E. coli*.

*Equivalentes biológicos funcionales.* Según se usa en el presente documento tales equivalentes con respecto a las proteínas AMPA-aciltransferasas de la presente invención son péptidos, polipéptidos y proteínas que contienen una secuencia o resto que exhibe similitud de secuencia con los péptidos nuevos de la presente invención, tal como PhnO, y que exhiben las mismas o similares propiedades funcionales a las de los polipéptidos desvelados en el presente documento, incluida la actividad transacilasa. Los equivalentes biológicos incluyen también péptidos, polipéptidos y proteínas que reaccionan con, es decir se unen específicamente a los anticuerpos surgidos contra PhnO y que exhiben la misma o similar actividad transacilasa, incluidos los anticuerpos monoclonales y policlonales.

Equivalentes biológicos funcionales según se usa en el presente documento con respecto a los genes que codifican aciltransferasas son polinucleótidos que reaccionan con las secuencias de polinucleótidos contempladas y descritas en el presente documento, es decir que son capaces de hibridar a una secuencia de polinucleótidos que es o es complementaria a un polinucleótido que codifica una aciltransferasa que funciona en la transacilación del AMPA o que codifica proteínas aciltransferasas sustancialmente similares contempladas y descritas en el presente documento. Una proteína que es sustancialmente similar a las proteínas descritas en el presente documento es un equivalente biológico funcional y exhibe las mismas o similares propiedades funcionales que las de los polipéptidos desvelados en el presente documento, incluida la tolerancia mejorada al herbicida o la resistencia mejorada al herbicida. Los péptidos equivalentes biológicos contienen una secuencia o resto tal como uno o más sitios activos que exhiben similitud de secuencia con los péptidos nuevos de la presente invención, tal como PhnO. Los equivalentes biológicos también incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas que reaccionan con, es decir que se unen específicamente a los anticuerpos surgidos contra PhnO y secuencias de péptidos análogas a PhnO y que exhiben la misma o similar mejora en la tolerancia o resistencia al herbicida, incluidos los anticuerpos monoclonales y policlonales.

*Cloroplasto o plastidio localizado,* según se usa en el presente documento, se refiere a una molécula biológica, ya sea polinucleótido o polipéptido, que está localizada dentro del cloroplasto o plastidio de manera que la molécula está aislada del medio citoplásmico celular y funciona dentro del citoplasma del cloroplasto o plastidio para proporcionar los efectos reivindicados en la presente invención. La localización de una molécula biológica al cloroplasto o plastidio puede producirse, con referencia a los polinucleótidos, por medios mecánicos artificiales tales como la electroporación, la microinyección mecánica, o por bombardeo de microproyectiles recubiertos de polinucleótidos, o con referencia a los polipéptidos, por medios de secreción o importación en los que se usa una secuencia de péptido natural, que no se presenta naturalmente, o heteróloga dirigida a plastidios o cloroplastos que funciona para dirigir, insertar, asistir, o localizar un polipéptido unido en un cloroplasto o plastidio.

*Suceso* se refiere a una planta transgénica o tejido de planta transgénica obtenido a partir de la inserción de ADN extraño en uno o más sitios únicos en el ADN nuclear, mitocondrial, del plastidio o del cloroplasto.

*Expresión:* La combinación de procesos intracelulares, incluidas la transcripción, la traducción y otras funciones de procesamiento y estabilización del ARN y proteínas intracelulares, a la que se somete una molécula de ADN codificadora tal como un gen estructural para producir un producto genético.

*Gen que no se presenta naturalmente:* Un gen de acil-transferasa de la presente invención que no se presenta naturalmente contiene información genética que codifica una secuencia de ARN funcional de la planta, pero es de preferencia un gen que codifica una proteína acil-transferasa, ya sea que se presenta naturalmente o una variante de una proteína que se presenta naturalmente, preparada de una manera que incluye cualquier clase de aislamiento o manipulación genética. Esto incluye el aislamiento del gen de su estado en que se presenta naturalmente, la manipulación del gen como por modificación de codones, mutagénesis específica de sitio, truncación, introducción o eliminación de sitios de escisión de endonucleasas de restricción, síntesis o resíntesis de una secuencia que se presenta naturalmente que codifica una aciltransferasa de la presente invención por medio de procedimientos *in vitro* tales como los procedimientos de síntesis química de fosforamida, etc., procedimientos de amplificación térmica tales como la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la ligasa, la reacción de la polimerasa inversa y similares, etc., y cualquier otro procedimiento de manipulación o aislamiento.

*Unido de manera operativa:* Segmentos de ácidos nucleicos conectados en marco de manera que las propiedades de uno influyen en la expresión del otro. Por ejemplo, una secuencia de un promotor que tiene propiedades de carga, unión e iniciación de la transcripción de polimerasa, ejerce influencia en la expresión de secuencias que están unidas al promotor.

*Regiones codificadoras expresables en plantas:* Regiones codificadoras que son expresables, es decir que pueden transcribirse y/o traducirse *in planta*, porque contienen elementos reguladores típicos de las plantas para facilitar la expresión de un gen de interés.

*Péptido de tránsito de plastidio:* Cualquier secuencia de aminoácido útil para dirigir o localizar un aminoácido unido, tal como una proteína de fusión, a un compartimiento subcelular u orgánulo tal como un plastidio o cloroplasto. Las secuencias de aminoácidos que facilitan la entrada en un mitocondrio no son del todo diferentes o distintas de los péptidos de tránsito de plastidios, y se describen también como péptidos de tránsito, pero no funcionan para dirigir las secuencias de péptidos a los orgánulos de plastidios o cloroplastos.

*Progenie* de una planta transgénica incluye cualquier vástago descendiente de una planta transgénica que contiene al menos un gen heterólogo o transgén, o cualquier planta posterior derivada de la planta transgénica que tiene el transgén en su linaje. La progenie no está limitada a una generación, sino más bien abarca los descendientes de la planta transgénica siempre que contengan o expresen el transgén deseado. Las semillas que contienen embriones transgénicos así como las semillas de las plantas transgénicas y sus vástagos o descendientes son también partes importantes de la invención. Las células, tejidos, semillas o plantas transgénicos que contienen un transgén deseado son la progenie de las células, tejidos o plantas transgénicos originales.

*Promotor:* Un sitio de reconocimiento en una secuencia de ADN o grupo de secuencias de ADN que proporciona un elemento de control de la expresión para un gen estructural y al que se une específicamente la ARN polimerasa e inicia la síntesis de ARN (transcripción) de ese gen.

$R_0$  es la planta principal que se regenera derivada de la transformación de tejido o células de la planta en cultivo. La progenie o generaciones posteriores derivadas de la  $R_0$  se denominan  $R_1$  (primera generación),  $R_2$  (segunda generación), etc.

*Regeneración:* El proceso de producir una planta completa haciendo crecer una planta a partir de una célula de planta o tejido de planta (por ejemplo, protoplasto o explante de planta).

*Secuencia codificadora estructural* se refiere a una secuencia de ADN que codifica un péptido, polipéptido, o proteína que se produce tras la transcripción de la secuencia codificadora estructural al ARN mensajero (ARNm), seguida por la traducción del ARNm para producir el péptido, polipéptido, o producto proteico deseado.

*Gen estructural:* Un gen que se expresa para producir un polipéptido.

*Homología sustancial:* Según se usa este término en el presente documento, homología sustancial se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que son al menos aproximadamente 90 por ciento homólogas, desde aproximadamente 91 por ciento homólogas hasta aproximadamente 95 por ciento homólogas, y desde aproximadamente 96 por ciento homólogas hasta aproximadamente 99 por ciento homólogas a una secuencia de polinucleótidos de referencia, tal como cualquier secuencia del gen *phnO* de *E. coli*. Una primera molécula de polinucleótido que es sustancialmente homóloga a una segunda molécula de polinucleótido es o es complementaria al segundo polinucleótido de manera que la primera molécula de polinucleótido hibrida con la segunda molécula de polinucleótido o su secuencia complementaria bajo condiciones de hibridación rigurosas, definiéndose rigurosidad como la concentración de sal y temperatura óptimas necesarias para llevar a cabo la hibridación de un primer polinucleótido con un segundo polinucleótido. Los procedimientos para variar la rigurosidad son bien conocidos en la técnica pero puede hacerse referencia en Sambrook y col., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, 1989, Cold Spring Harbor Press*; o Ausubel y col., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, 1995, John Wiley and Sons, Inc.* Los polipéptidos que se cree que están dentro del ámbito de la presente invención son los que son al menos aproximadamente 90 por ciento similares, desde aproximadamente 91 por ciento similares hasta aproximadamente 95 por ciento similares, y desde aproximadamente 96 por ciento similares hasta aproximadamente 99 por ciento similares a una secuencia de polipéptido de referencia, de preferencia a una secuencia de péptido de *PhnO* de *E. coli*.

*Terminador:* Según se usa en el presente documento con respecto a secuencias específicas de plantas proyectadas para la expresión in planta expresión, la secuencia de terminación de la transcripción del extremo 3' y poliadenilación.

*Transformación* es un proceso de introducción de una secuencia de polinucleótidos exógena, tal como un plásmido o vector viral o una molécula de polinucleótido recombinante, en una célula, protoplasto, plastidio o cloroplasto, o mitocondrio en que la secuencia de polinucleótidos exógena se incorpora en una secuencia de polinucleótidos endógena contenida dentro de la célula, o es capaz de sufrir replicación autónoma. Una célula transformada es una célula que ha sido alterada por la introducción de una o más moléculas de polinucleótido exógenas en esa célula. Una célula transformada de manera estable es una célula transformada que ha incorporado todo o una porción del polinucleótido exógeno en el material genómico nuclear, mitocondrial, o del plastidio o cloroplasto de la célula de manera que el polinucleótido exógeno confiere algún o algunos rasgos genotípicos o fenotípicos a esa célula y a la progenie de la célula transformada, medidos por la detección del polinucleótido introducido de manera exógena, el ARNm o el producto proteico del polinucleótido exógeno, un metabolito que no se produce o que no se encuentra normalmente dentro de la célula en ausencia del polinucleótido exógeno, o una inspección visual de la célula, tejido de la planta, o plantas derivadas de la célula transformada.

*Transgén:* Un transgén es una secuencia de polinucleótidos que se ha transferido a una célula y comprende una casete de expresión que contiene una secuencia del gen estructural que codifica un polipéptido deseado. El transgén es capaz de expresarse cuando está en una célula, tejido u organismo receptor transformado. Este puede incluir un plásmido completo u otro vector, o puede incluir simplemente la secuencia codificadora funcional del polinucleótido

transferido de la planta. Una célula transgénica es cualquier célula derivada de o regenerada de una célula transformada, incluida la célula inicialmente transformada. Las células transgénicas ejemplares incluyen el tejido de callo de plantas derivado de una célula de planta transformada y células particulares tales como células de hoja, raíz, tallo, meristema y otras células de tejidos somáticos, o línea reproductora o germinal y células tapetales obtenidas de una planta transgénica transformada de manera estable. Un suceso transgénico es una planta o progenie de la misma derivada de la inserción de al menos un polinucleótido exógeno en el genoma nuclear, plastídico o mitocondrial de una célula o protoplasto de planta. Una planta transgénica es una planta o una progenie de la misma que se ha sido modificada genéticamente para contener y expresar secuencias heterólogas de polinucleótidos como proteínas o como moléculas de ARN o ADN que no son previamente una parte de la composición de la planta. Como se ejemplifica específicamente en el presente documento, una planta de algodón transgénica, por ejemplo, está genéticamente modificada para contener y expresar al menos una secuencia heteróloga de ADN unida de manera operativa y bajo el control regulador de secuencias de control de transcripción y traducción que funcionan en células o tejidos de plantas o en plantas completas. También puede hacerse referencia a una planta transgénica como una planta transformada. Una planta transgénica también se refiere a la progenie de la planta transgénica inicial donde aquella progenie contiene y es capaz de expresar la secuencia codificadora heteróloga bajo el control de las secuencias de control de la transcripción y traducción expresables en la planta descritas en el presente documento. Una planta transgénica puede producir flores, semillas, bulbos, raíces, tubérculos, frutos, y polen transgénicos y similares y puede cruzarse por medios de reproducción convencionales con líneas de plantas compatibles para producir plantas transgénicas híbridas.

*Vector:* Una molécula de ADN u otro polinucleótido capaz de replicar en una célula huésped y/o a la que puede estar unida otra secuencia de ADN u otro polinucleótido de manera operativa para llevar a cabo la replicación de la secuencia unida. Un plásmido es un ejemplo de vector.

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que las plantas pueden producir un compuesto fitotóxico cuando se transforman con ciertos genes que codifican enzimas capaces de degradar el glifosato. En particular, el metabolismo del glifosato mediado por la glifosato oxidoreductasa (GOX) produce un compuesto fitotóxico identificado como N-aminometil-fosfonato (AMPA). Otros estudios han mostrado que un derivado N-acilado de AMPA, el N-acilaminometil-fosfonato (N-acil-AMPA o acil-AMPA), es mucho menos fitotóxico para la mayoría de las especies de plantas. Se han identificado enzimas que son capaces de modificar covalentemente el AMPA a través de mecanismos de acilación, dando como resultado la formación de N-acil-AMPA. Una enzima en particular causa la N-acetilación del AMPA aplicado de manera exógena. En las plantas que expresan esta enzima junto con GOX, no se observan los efectos fitotóxicos del AMPA.

Las invenciones contempladas en el presente documento toman ventajas de las casetes de polinucleótidos recombinantes que comprenden elementos para regular la expresión de los genes en los que pueden insertarse secuencias, tales como genes estructurales que codifican proteínas útiles. La inserción de tales secuencias en una casete de expresión se realiza de preferencia usando endonucleasas de restricción bien conocidas en la técnica, sin embargo se conocen otros procedimientos para la inserción. Por ejemplo, los procedimientos de recombinación específica de sitio son eficaces para insertar secuencias deseadas en tales casetes de expresión. Las casetes de expresión contienen al menos un promotor operable de la planta para uso en la iniciación de la producción de una molécula de ARN mensajero a partir de la que se traduce la proteína útil. Las casetes también contienen secuencias funcionales de plantas, identificadas como secuencias 3', que funcionan en la terminación de la transcripción y proporcionan secuencias no traducidas que están poliadeniladas en 3'. Por consiguiente, una casete de expresión proyectada para uso en plantas debe contener al menos una secuencia de un promotor unida en su extremo 3' a una secuencia de terminación de la transcripción y poliadenilación 3'. De preferencia, está presente una secuencia policlonado o secuencia conectora que contiene uno o más sitios de escisión de endonucleasas de restricción únicos formando un puente entre el promotor y la secuencia 3' para lograr la inserción conveniente de secuencias de genes estructurales y otros elementos. Una casete de expresión proyectada para uso en plantas también contiene de preferencia una secuencia 5' no traducida insertada entre el promotor y la secuencia 3'. Se ha mostrado que las secuencias 5' no traducidas (UTL) mejoran la expresión genética en las plantas. Los intrones también están contemplados como secuencias que pueden estar presentes en tales casetes de expresión de la presente invención. También se ha observado que la presencia de intrones operables de plantas, en particular en el maíz, mejora la expresión genética en ciertas especies de plantas. Los intrones pueden estar presentes en una casete de expresión en cualquier número de posiciones a lo largo de la secuencia de la casete. Esto puede incluir posiciones entre el promotor y la secuencia de terminación 3' y/o dentro de un gen estructural. Puede haber más de un intrón presente en una casete de expresión, sin embargo para los objetos de las invenciones contempladas en el presente documento, resulta de preferencia que los intrones estén presentes cuando se usan casetes de expresión en plantas monocotiledóneas y en tejidos de plantas monocotiledóneas. Las secuencias potenciadoras son también bien conocidas en la técnica y pueden estar presentes, aunque no necesariamente como una parte de una casete de expresión, ya que se sabe que las secuencias potenciadoras funcionan cuando están presentes secuencia arriba o secuencia abajo o incluso a grandes distancias de un promotor que dirige la expresión de un gen de interés.

La expresión de un gen localizado en el genoma nuclear de la planta y que existe en forma de ADN de doble hebra implica la transcripción para producir un transcripto primario de ARN mensajero (ARNm) a partir de una hebra del ADN por medio de la enzima ARN polimerasa, y el posterior procesamiento del transcripto primario de ARNm dentro del núcleo. Este procesamiento incluye una secuencia de polinucleótidos 3' no traducida que añade nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del ARN. La transcripción del ADN en ARNm está regulada por una secuencia de ADN denominada usualmente como el "promotor". El promotor comprende una secuencia de bases que indica a la ARN

polimerasa asociarse con el ADN e iniciar la transcripción del ARNm usando la hebra de ADN molde para generar una hebra de ARN complementaria correspondiente.

Los expertos en la técnica reconocerán que existe una serie de promotores que son activos en células de plantas, y que se han descrito en la bibliografía. Tales promotores pueden obtenerse de plantas, virus de plantas, o de microbios comensales, saprófitos, simbióticos o patogénicos de plantas e incluyen, pero no se limitan a, los promotores de nopalina sintasa (NOS) y octopina sintasa (OCS) (que son transportados en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*), los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO, un polipéptido de planta muy abundante), el promotor *Act1* del arroz, el promotor 35S del Virus del Mosaico de Figwort (FMV), el promotor del virus baciliforme de ADN de la caña de azúcar, el promotor de ubiquitina, el promotor del virus del moteado clorótico del cacahuete, el promotor del virus amarillo de comalina, el promotor de la proteína de unión a clorofila a/b, y los promotores Act2, Act8, Act11 y EF1a potenciados del meristema y similares. Todos estos promotores se han usado para crear diversos tipos de construcciones de ADN que se han expresado en plantas (véase por ejemplo, McElroy y col., 1990; Barry and Kishore, USP 5.463.175) y que están dentro del ámbito de la presente invención. También se contemplan los promotores específicos de cloroplastos y plastidios, los promotores funcionales de cloroplastos o plastidios, y los promotores funcionales de cloroplastos o plastidios. Resulta de preferencia que el promotor particular seleccionado sea capaz de causar suficiente expresión in-planta para dar lugar a la producción de una cantidad eficaz de aciltransferasa para dar una planta sustancialmente tolerante a herbicidas de fosfonato y productos del metabolismo de herbicidas de fosfonato. La cantidad de aciltransferasa requerida para proporcionar la tolerancia deseada puede variar con las especies de las plantas.

Una serie de promotores de preferencia son promotores constitutivos tales como los promotores CaMV35S o FMV35S que dan altos niveles de expresión en la mayoría de los órganos de plantas. Las versiones mejoradas o duplicadas de los promotores CaMV35S y FMV35S son particularmente útiles en la práctica de esta invención (Kay y col., 1987; Rogers, USP 5.378.619). Además, puede también resultar de preferencia llevar a cabo la expresión del gen de aciltransferasa en tejidos específicos de la planta, tales como hoja, tallo, raíz, tubérculo, semilla, fruto, etc., y el promotor elegido deberá tener la especificidad de tejido y desarrollo deseados. Por consiguiente, la función del promotor deberá optimizarse seleccionando un promotor con las capacidades de expresión de tejido deseadas y la fuerza del promotor aproximada y seleccionando un transformante que produzca la tolerancia al herbicida deseada en los tejidos diana. Este enfoque de selección de la combinación de transformantes se utiliza de manera rutinaria en la expresión de genes estructurales heterólogos en plantas ya que existe variación entre los transformantes que contienen el mismo gen heterólogo por el sitio de inserción del gen dentro del genoma de la planta. (Denominado comúnmente "efecto de posición"). Además de los promotores que se sabe que causan transcripción (constitutiva o específica de tejido) del ADN en las células de plantas, pueden identificarse otros promotores para uso en la presente invención seleccionando una biblioteca de ADNc de plantas para buscar genes que se expresen selectivamente o de preferencia en los tejidos diana y a continuación determinando las regiones promotoras.

Resulta de preferencia que los promotores utilizados tengan expresión relativamente alta en todos los tejidos meristemáticos además de otros tejidos por más que, como ahora se sabe, los herbicidas de fosfonato pueden translocarse y acumularse en este tipo de tejido de plantas. Como alternativa, puede usarse una combinación de genes quiméricos para dar lugar de manera acumulada al nivel de expresión total de enzima aciltransferasa necesario para dar como resultado el fenotipo tolerante al herbicida. Un promotor que proporcione niveles relativamente altos de expresión puede causar la producción de una proteína deseada hasta niveles *in planta* que varían desde 0,1 miligramos por gramo de peso fresco de tejido de la planta, hasta 0,5 miligramos por gramo de peso fresco de tejido de la planta, hasta 1,0 miligramos por gramo de peso fresco de tejido de la planta, hasta 2,0 o más miligramos por gramo de peso fresco de tejido de la planta. Los niveles *in planta* de una proteína deseada en cultivos genéticamente isogénicos en un campo pueden variar a lo largo de un espectro, pero en general los niveles caen dentro del 70% de una media, de más preferencia dentro del 50% de una media, y aún de más preferencia dentro de un 25% de una media para todas las plantas analizadas en una muestra dada.

Los promotores usados en las construcciones de ADN (es decir genes quiméricos de plantas) de la presente invención pueden modificarse, si se desea, para afectar sus características de control. Por ejemplo, puede unirse el promotor CaMV35S a la porción del gen de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana* (ssRUBISCO) que reprime la expresión de ssRUBISCO en ausencia de luz, para crear un promotor que es activo en las hojas pero no en las raíces. El promotor quimérico resultante puede usarse como se describe en el presente documento. Para los objetos de esta descripción, la frase promotor "CaMV35S" incluye por consiguiente variaciones del promotor CaMV35S, por ejemplo, promotores derivados por medio de unión con regiones operadoras, mutagénesis aleatoria o controlada, etcétera. Además, los promotores pueden alterarse para contener múltiples "secuencias potenciadoras" para ayudar a elevar la expresión genética. Los ejemplos de tales secuencias potenciadoras se han informado por Kay y col. (1987).

Un ARN producido por una construcción de ADN de la presente invención también contiene una secuencia líder 5' no traducida. Esta secuencia puede obtenerse del promotor seleccionado para expresar el gen, y puede modificarse específicamente para aumentar la traducción del ARNm. La secuencia no traducida o la secuencia líder 5' no traducida (NTR o UTR) puede obtenerse de un promotor o de una secuencia codificadora no relacionadas. Por ejemplo, las regiones 5' no traducidas pueden también obtenerse de ARN virales, a partir de genes eucariotas adecuados, o a partir de una secuencia genética sintética. La presente invención no está limitada a construcciones, como se presentan en

uno de los siguientes ejemplos, en las que la región no traducida se obtiene de una secuencia 5' no traducida que acompaña a la secuencia del promotor. Los ejemplos de secuencias líder de genes de plantas que son útiles en la presente invención son el líder de la proteína de unión a la clorofila a/b (cab) del trigo y el líder de la proteína del choque térmico 70 (hsp70) de la petunia (Winter y col., 1988).

Para la expresión óptima en plantas monocotiledóneas, debe incluirse un intrón en la construcción de expresión del ADN. Este intrón se colocará típicamente cerca del extremo 5' del ARNm en la secuencia no traducida. Este intrón podría obtenerse de, pero sin limitarse a, una serie de intrones constituidos por el intrón hsp70 del maíz (Brown y col., Patente de EEUU N° 5.424.412; 1995) o el intrón Act1 del arroz (McElroy y col., 1990).

Donde se incluye más de una casete de expresión dentro de un plásmido u otra construcción de polinucleótidos, una primera casete de expresión que comprende una molécula de ADN contiene típicamente un promotor constitutivo, una secuencia de ADN estructural que codifica una enzima glifosato oxidoreductasa (GOX), y una región 3' no traducida. Una segunda casete de expresión que comprende una molécula de ADN contiene típicamente un promotor constitutivo, una secuencia de ADN estructural que codifica una enzima N-acil-transferasa que es capaz de reaccionar con AMPA para producir N-acil-AMPA, y una región 3' no traducida. También están contempladas otras casetes de expresión que comprenden una molécula de ADN. Por ejemplo, genes que codifican actividades insecticidas o fungicidas, tolerancia a la sequía o al calor, compuestos antibióticos, compuestos o reactivos farmacéuticos tales como proteínas supresoras de tumores o componentes de anticuerpos, biopolímeros, otros compuestos comercialmente útiles y similares, puede también expresarse en las plantas contempladas por la presente invención, junto con los genes que proporcionan tolerancia aumentada al herbicida. Se ha descrito una serie de promotores constitutivos que son activos en células de plantas. Los promotores adecuados para la expresión constitutiva de GOX o una N-acil-transferasa incluyen, pero no se limitan a, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell y col. 1985), el promotor 35S del virus del mosaico de Figwort (FMV) (Sanger y col. 1990), el promotor del virus baciliforme de ADN de la caña de azúcar, (Bouhida y col., 1993), el promotor del virus amarillo de la comelina (Medberry y Olszewski 1993), el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (ssRUBISCO) (Coruzzi y col., 1984), el promotor de la triosafosfato isomerasa citosólica (TPI) del arroz (Xu y col. 1994), el promotor de la adenina fosforribosiltransferasa (APRT) de *Arabidopsis* (Moffatt y col. 1994), el promotor del gen de actina 1 del arroz (Zhong y col. 1996), y los promotores de la manopina sintasa y de la octopina sintasa (Ni y col. 1995). Todos estos promotores se han usado para crear diversos tipos de construcciones de ADN recombinantes expresables en plantas. Se han realizado análisis comparativos de los promotores constitutivos por la expresión de genes informadores tales como el gen de *uidA* ( $\beta$ -glucuronidasa) de *E. coli* con muchos de estos y otros promotores (Li y col. 1997; Wen y col. 1993).

Los promotores usados en la segunda casete que comprende una molécula de ADN pueden seleccionarse para controlar o limitar la expresión específica donde se desea la muerte de las células. En una forma de realización de preferencia, el promotor será capaz de dirigir la expresión exclusiva o principalmente en tejidos críticos para la supervivencia de la planta o para la viabilidad de la planta, limitando al mismo tiempo la expresión de la segunda casete que comprende una molécula de ADN en otros tejidos no esenciales. Por ejemplo, los tejidos que se diferencian en tejidos que desarrollan polen o tejidos terminales tales como el polen mismo, las capas de células tapetales de la antera, o los tejidos de la antera. Como alternativa, se conocen bien los promotores de plantas capaces de regular la expresión de los genes en particular los tipos celulares y tisulares. Los que resultan de más preferencia en las formas de realización de esta invención son los promotores que se expresan específicamente durante el desarrollo del tejido reproductor masculino o en el polen a niveles suficientes para producir moléculas de ARN inhibitoras complementarias al ARN mensajero transcrito por el promotor constitutivo de la primera casete de expresión que comprende una molécula de ADN. Los ejemplos de estos tipos de promotores incluyen el promotor específico de tapete del tabaco TA29 (Mariani y col. 1990), los promotores de la chalcona flavonona isomerasa PA1 y PA2 de la petunia (van Tunen y col. 1990), el promotor del gen SLG de *Brassica oleracea* (Heizmann y col. 1991), y los promotores del gen LAT del tomate (Twell y col. 1991).

Se han aislado los promotores de antera y específicos del polen del arroz. Los ejemplos incluyen el promotor Osg6B, que se ha demostrado que dirige la expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en el arroz transgénico en anteras inmaduras. No se detectó actividad en otros tejidos de espiguillas, hojas o raíces (Yokoi y col. 1997). Se ha mostrado que el promotor específico del polen PS1 del arroz expresa específicamente el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en el polen del arroz (Zou y col. 1994). Se han identificado otros genes del arroz que se expresan específicamente en el tapete de la antera del arroz (Tsuchiya y col. 1994, Tsuchiya y col. 1997). Puede llevarse a cabo el aislamiento de otros genes expresados predominantemente durante el desarrollo de la antera del arroz, por ejemplo, por medio de la construcción de una biblioteca de ADNc para identificar clones específicos de antera (Qu y col.).

Los expertos en la técnica son conscientes de los enfoques usados en el aislamiento de promotores que funcionan en las plantas, y de los genes o miembros de las familias de genes que se expresan en gran medida en tejidos particulares de las plantas tales como en raíces, brotes, meristemas, hojas, flores, frutos, en el polen, o en tipos de células de plantas involucradas en la producción del polen (Stinson y col. 1987; Brown and Crouch, 1990; McCormick y col. 1989). Otros ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen el promotor del gen de la exopoligalacturonasa del maíz (Dubald, y col. 1993) y el promotor para el ARNm de Zmc13 (Hanson, y col. 1989). Los promotores que se ha demostrado que se expresan de manera preferencial en el polen del tomate son los promotores LAT52 y LAT59 (Twell y col. 1991). En la Patente de EEUU N° 5.470.359 se desveló una parte de la secuencia del promotor pZtap del maíz (psgB6-1).

Una molécula de ADN recombinante de la presente invención comprende típicamente un promotor funcional o unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica una región 5' no traducida, una secuencia de ADN de un intrón de planta, una secuencia estructural que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP), una secuencia codificadora de ADN para un gen que codifica la tolerancia mejorada al herbicida, y una región 3' no traducida.

La secuencia líder 5' no traducida puede obtenerse del promotor seleccionado para expresar la secuencia heteróloga de ADN, y puede modificarse específicamente si se desea para aumentar la traducción del ARNm. También puede obtenerse una región 5' no traducida de ARN virales, de genes eucariotas adecuados, o de una secuencia genética sintética. La presente invención no está limitada a construcciones en las que la región no traducida se obtiene de la secuencia 5' no traducida que acompaña a la secuencia del promotor. La secuencia líder podría obtenerse también de un promotor o de una secuencia codificadora no relacionados.

La región 3' no traducida de una molécula de ADN recombinante funcional de una planta contiene una señal de poliadenilación que funciona en las plantas causando la adición de nucleótidos adenilato al extremo 3' de ARN. La región 3' no traducida puede obtenerse de diversos genes que se expresan en las células de plantas. La región 3' no traducida de la nopalina sintasa (Fraley y col. 1983), la región 3' no traducida de ssRUBISCO del guisante (Coruzzi y col. 1994), la región 3' no traducida de gen de la proteína de almacenamiento de la semilla 7S de la soja (Schuler y col. 1982) y la subunidad pequeña del gen ssRUBISCO del guisante se usan comúnmente en esta capacidad. Las regiones 3' transcritas, no traducidas que contienen la señal de poliadenilato de los genes del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium* son también adecuadas.

Los ejemplos de intrones de plantas adecuados para la expresión en monocotiledóneas incluyen, por ejemplo, el intrón hsp70 del maíz, el intrón actina 1 del arroz, el intrón ADH 1 del maíz, el intrón SSU de *Arabidopsis*, el intrón EPSPS de *Arabidopsis*, el intrón EPSPS de la petunia y otros conocidos por los expertos en la técnica.

Puede ser particularmente ventajoso dirigir la localización de proteínas que confieren tolerancia a herbicidas al compartimiento subcelular, por ejemplo, a los mitocondrios, al retículo endoplásmico, vacuolas, cloroplastos u otros compartimientos plastídicos. Las proteínas puede dirigirse al cloroplasto incluyendo en su extremo amino terminal un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP). Las proteínas dirigidas al cloroplasto que se presentan naturalmente, sintetizadas como proteínas precursoras mayores que contienen un péptido amino terminal dirigido al cloroplasto que dirige el precursor a la maquinaria de importación del cloroplasto, se han identificado previamente y son bien conocidas en la técnica. Los péptidos dirigidos al cloroplasto se escinden por lo general por medio de endoproteasas específicas localizadas dentro del orgánulo del cloroplasto, liberando de esta manera la enzima madura dirigida y de preferencia activa del precursor en el medio del cloroplasto. Los ejemplos de secuencias que codifican péptidos que son adecuados para dirigir la marcación del gen de tolerancia al herbicida o del producto genético de transacilasa al cloroplasto o plastidio de la célula de la planta incluyen el CTP EPSPS de petunia, el CTP2 EPSPS y el intrón de *Arabidopsis*, y otros conocidos por los expertos en la técnica. Tales secuencias marcadoras proporcionan la transferencia de la proteína expresada deseada hacia la estructura de la célula en la que funciona más eficazmente, o transfiriendo la proteína expresada deseada a áreas de la célula en las que están concentrados los procesos celulares necesarios para la función fenotípica deseada. Se ha encontrado que los péptidos dirigidos a los cloroplastos son particularmente útiles en la selección de plantas resistentes al glifosato (Barry y col., Patente de EEUU N° 5.463.175; Barry y col., Patente de EEUU N° 5.633.435). El glifosato funciona para matar la célula inhibiendo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que tiene lugar en el cloroplasto. Por consiguiente, concentrar el producto genético de resistencia dentro del cloroplasto proporciona resistencia aumentada al herbicida. Los ejemplos en el presente documento proporcionan una transacilasa que está también dirigida o localizada al cloroplasto y que está concentrada dentro del cloroplasto. Los ejemplos específicos de péptidos dirigidos al cloroplasto son bien conocidos en la técnica e incluyen el péptido de tránsito ats1A de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana*, un péptido de tránsito EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, y un péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa del maíz *Zea*. Un CTP que ha funcionado en el presente documento para localizar proteínas heterólogas al cloroplasto se obtuvo del péptido de tránsito ats1A de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana*. Una secuencia de polinucleótidos que codifica una variante de este péptido de tránsito usado en el presente documento proporciona la secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito nativo más una reiteración de sitios de escisión del péptido de tránsito, y se ha mostrado en el presente documento que es útil para desplegar la enzima transacilasa recombinante activa al cloroplasto (SEC. ID N°: 9).

Un medio alternativo para localizar genes de tolerancia a herbicidas o de resistencia a herbicidas funcionales de plantas a un cloroplasto o plastidio incluye la transformación del cloroplasto o plastidio. Pueden producirse plantas recombinantes en las que sólo se ha alterado el ADN mitocondrial o del cloroplasto para incorporar las moléculas contempladas en esta solicitud. En la técnica se han conocido promotores que funcionan en los cloroplastos (Hanley-Bowden y col., Trends in Biochemical Sciences 12: 67-70, 1987). Los procedimientos y composiciones para obtener células que contienen cloroplastos en los que se ha insertado ADN heterólogo se han descrito, por ejemplo por Daniell y col. (Patente de EEUU N° 5.693.507; 1997) y Maliga y col. (Patente de EEUU N° 5.451.513; 1995).

La acumulación de AMPA en las plantas puede causar síntomas fitotóxicos que se manifiestan fenotípicamente como clorosis de las hojas, crecimiento atrofiado, infertilidad y muerte, aunque no todos estos síntomas se evidencian en todas las especies de plantas. Se ha descubierto en el presente documento que la modificación enzimática de la molécula de AMPA por transacilación para producir N-acil-AMPA proporciona un medio para superar los efectos fitotóxicos del AMPA. Un procedimiento para evaluar la conversión de AMPA en N-acil-AMPA implica proporcio-

nar AMPA marcado con [<sup>14</sup>C] como un sustrato para la enzima transacilasa, y Acil-CoA como otro sustrato para la enzima en un volumen de reacción acuosa, y separar el sustrato de AMPA marcado con [<sup>14</sup>C] del producto N-acil-[<sup>14</sup>C]-AMPA por HPLC en una columna de intercambio aniónico como se describe en los ejemplos en el presente documento. Sorprendentemente, se ha mostrado que la enzima transacilasa es capaz de utilizar otros compuestos de CoA acilados como sustratos para transacilar el sustrato AMPA. En particular, se mostró que el propionil-CoA es un sustrato particularmente reactivo para la reacción de transacilación *in vitro*, produciendo N-propionil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Los compuestos de CoA acilados más grandes, es decir butiril-CoA o metilmalonil-CoA y otras moléculas orgánicas unidas de manera covalente a CoA que tienen una longitud de cadena de carbonos mayor que C<sub>3</sub> probaron ser menos eficaces en la reacción de transacilación cuando se usa AMPA como el sustrato receptor del grupo acilo. A pesar de esta información, un experto en la técnica reconocerá que las otras transacilasas que están sustancialmente relacionadas por homología de secuencias de aminoácidos con una enzima de PhnO o análoga a PhnO según se caracterizó en el presente documento tendrán una especificidad de sustrato similar en la reacción de transacilasa de AMPA comparada con la abarcada con la PhnO. Estas otras enzimas también están conceptualmente dentro del ámbito y el espíritu de la invención descrita en el presente documento. Por ejemplo, la biosíntesis de ácidos grasos está mediada por una gran variedad de compuestos de Acil-CoA y compuestos de proteínas transportadoras de acilo que pueden ser útiles como sustratos en la transacilación de compuestos fitotóxicos tales como el AMPA. Una transacilasa capaz de transacilar AMPA usando un intermedio de ácido graso podría proporcionar posiblemente protección a la planta al eliminar la fitotoxicidad del AMPA. Una enzima tal como PhnO, que es capaz de transacilar, puede ser útil en la destoxicación de una gran variedad de compuestos tóxicos que contienen enlaces CP y que contienen además un enlace CN.

Los procedimientos y composiciones para transformar una bacteria, una levadura o una célula fúngica, una célula de planta, o una planta completa con uno o más vectores de expresión que comprenden una secuencia del gen de *phnO*- o análogo a *phnO* son otros aspectos de esta descripción. Una bacteria, levadura o célula fúngica, célula de planta transgénica, o planta derivada de tal proceso de transformación o la progenie y las semillas de una de tales plantas transgénicas son también otras formas de realización de esta invención.

Los procedimientos para transformar bacterias y levaduras o células fúngicas son bien conocidos en la técnica. Típicamente, los medios de transformación son similares a los medios bien conocidos usados para transformar otras bacterias, tales como *E. coli*, o levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Los procedimientos para la transformación del ADN de células de plantas incluyen, pero no se limitan a la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, la transformación de protoplastos, la transferencia de genes en el polen, la inyección de órganos reproductores, la inyección en embriones inmaduros, la transformación de plastidios o cloroplastos, y el bombardeo de partículas. Cada uno de estos procedimientos tiene diferentes ventajas y desventajas. Por consiguiente, un procedimiento particular para introducir genes en una especie particular de planta puede no ser el más eficaz para otra especie de planta, pero los expertos en la técnica saben bien qué procedimientos son útiles para una especie particular de planta.

Existen muchos procedimientos para introducir segmentos de ADN transformantes en las células, pero no todos son adecuados para administrar ADN a las células de las plantas. Se cree que los procedimientos adecuados incluyen virtualmente cualquier procedimiento por el que puede introducirse ADN en una célula, tal como por infección con *Agrobacterium*, vectores binarios de cromosomas bacterianos artificiales (BIBAC) (Hamilton y col., 1996), administración directa de ADN tal como, por ejemplo por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh y col., 1993), por captación de ADN mediada por desecación/inhibición, por electroporación, por agitación con fibras de carburo de silicio, por aceleración de partículas recubiertas de ADN, etc. En ciertas formas de realización, resultan de preferencia los procedimientos de aceleración e incluyen, por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles y similares.

La tecnología para introducir el ADN en las células es bien conocida por los expertos en la técnica. Se han descrito cuatro procedimientos generales para administrar un gen en las células: (1) procedimientos químicos (Graham and van der Eb, 1973; Zatloukal y col., 1992); (2) procedimientos físicos tales como la microinyección (Capecchi, 1980), electroporación (Wong and Neuman, 1982; Fromm y col., 1985; Patente de EEUU N° 5.384.253) y la pistola de genes (Johnston and Tang, 1994; Fynan y col., 1993; Luthra y col., 1997); (3) vectores virales (Clapp, 1993; Lu y col., 1993; Eglitis and Anderson, 1988a; 1988b); y (4) mecanismos mediados por receptores (Curiel y col., 1991; 1992; Wagner y col., 1992).

Los procedimientos para transformar dicotiledóneas, principalmente por medio del uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y obtener planta transgénicas se han publicado para el algodón (Patente de EEUU N° 5.004.863; Patente de EEUU N° 5.159.135; Patente de EEUU N° 5.518.908), la soja (Patente de EEUU N° 5.569.834; Patente de EEUU N° 5.416.011; McCabe y col. (1988); Christou y col. (1988)), *Brassica* (Patente de EEUU N° 5.463.174), y el cacahuete (Cheng y col. (1996); De Kathen and Jabobsen (1990)).

También se han informado la transformación de monocotiledóneas usando electroporación, bombardeo de partículas y *Agrobacterium*. La transformación y la regeneración de plantas se han alcanzado en el espárrago (Bytebier y col. (1987)), la cebada (Wan and Lemaux (1994)), el maíz (Rhodes y col. (1988); Ishida y col. (1996); Gordon-Kammatal. (1990); Fromm y col. (1990); Koziel y col. (1993); Armstrong y col. (1995), la avena (Somers y col. (1992)), el pasto ovillo (Horn y col. (1988)), el arroz (Toriyama y col. (1988); Park y col. (1996); Abedinia y col. (1997); Zhang and Wu (1988); Zhang y col. (1988); Battraw and Hall (1990); Christou y col. (1991); Park y col. (1996)), el centeno (De la Pena y col. (1987)), la caña de azúcar (Bower and Birch (1992)), la festuca (Wang y col. (1992)), y el trigo (Vasil y

col. (1992); Weeks y col. (1993)). Las técnicas para la transformación y regeneración de plantas monocotiledóneas se analizan también en Davey y col. (1986).

Podrían también producirse plantas recombinantes en las que sólo se hubiera alterado el ADN mitocondrial o de cloroplastos para incorporar las moléculas contempladas en esta solicitud. En la técnica se han conocido los promotores que funcionan en los cloroplastos (Handley-Bowden y col., Trends in Biochemical Sciences 12: 67-70, 1987). Los procedimientos y composiciones para obtener células que contienen cloroplastos en los que se ha insertado ADN heterólogo se han descrito por Daniell y col., Patente de EEUU N° 5.693.507 (1997) y Maliga y col. (Patente de EEUU N° 5.451.513; 1995). Las plantas recombinantes que se han transformado usando ADN heterólogo, alterando tanto el genoma nuclear como el genoma de los cloroplasto o plastidios están también dentro del ámbito de esta invención.

La presente invención desvela construcciones de ADN que comprenden secuencia de polinucleótidos que codifican la AMPA-transacilasa. En el presente documento se desvelan procedimientos para identificar y aislar genes heterólogos que codifican péptidos que actúan en la N-acilación del AMPA. Los procedimientos para la construcción y expresión de genes sintéticos en plantas son bien conocidos por los expertos en la técnica y están descritos en detalle en la Patente de EEUU N° 5.500.365, y en plantas monocotiledóneas en particular en la Patente de EEUU N° 5.689.052. La presente invención contempla el uso de genes de AMPA aciltransferasa solos o en combinación con genes que codifican enzimas de degradación del glifosato mediada por GOX en la transformación tanto de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Para potenciar la expresión de estos genes, la presente invención proporciona construcciones de ADN que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican estos tipos de proteínas que se localizan al citoplasma de la célula de la planta así como secuencias que codifican péptidos dirigidos a plastidios ubicados secuencia arriba de las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas AMPA transacilasa y/o GOX.

En un aspecto, la información de la secuencia de nucleótidos proporcionada por la invención permite la preparación de secuencias de ADN relativamente cortas que tienen la capacidad de hibridar específicamente a secuencias de genes de los polinucleótidos seleccionados desvelados en el presente documento. En estos aspectos, se preparan sondas de ácidos nucleicos de una longitud adecuada basándose en una consideración de secuencias de polinucleótidos seleccionadas que codifican polipéptidos de AMPA transacilasa, por ejemplo, secuencias tales como las que se muestran en SEC. ID N°: 1, SEC. ID N°: 2, y SEC. ID N°: 3. Tales sondas de ácidos nucleicos pueden también prepararse basándose en una consideración de secuencias de polinucleótidos seleccionados que codifican un péptido dirigido a plastidios, tales como las que se muestran en SEC. ID N°: 9, SEC. ID N°: 11, SEC. ID N°: 13, y SEC. ID N°: 14. La capacidad de tales sondas de ácidos nucleicos para hibridar específicamente a una secuencia del gen que codifica un polipéptido de AMPA transacilasa o una secuencia de péptido dirigido a plastidio les otorga particular utilidad en una diversidad de formas de realización. Más importante aún, las sondas pueden usarse en una diversidad de ensayos para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada.

En ciertas formas de realización, resulta ventajoso utilizar cebadores de oligonucleótidos. La secuencia de tales cebadores se diseña usando un polinucleótido de la presente invención para uso en la detección, amplificación o mutación de una secuencia definida de un gen de AMPA transacilasa de cualquier organismo adecuado usando tecnología de PCR<sup>TM</sup>. El proceso puede también usarse para detectar, amplificar o mutar una secuencia definida del polinucleótido que codifica un péptido dirigido a plastidios. Los segmentos de genes relacionados con los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de AMPA transacilasa y los péptidos dirigidos a plastidios de la presente invención pueden también amplificarse por medio de PCR<sup>TM</sup> usando tales cebadores.

Para proporcionar algunas de las ventajas de acuerdo con la presente invención, una secuencia de ácido nucleico de preferencia utilizada para estudios o ensayos de hibridación incluye secuencias que son sustancialmente complementarias a al menos una longitud de 14 hasta aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de polinucleótidos vecina, en cis, o que codifica una AMPA transacilasa, tal como la que se muestra en SEC. ID N°: 5 o SEC. ID N°: 6, o secuencias que son sustancialmente complementarias a al menos una longitud de 14 a aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia que codifica un péptido dirigido a plastidios. Por "sustancialmente complementaria", se entiende que un polinucleótido es de preferencia aproximadamente 70% complementario, o de más preferencia aproximadamente 80% complementario, o aún de más preferencia aproximadamente 90% complementario, o de mayor preferencia aproximadamente 99-100% complementario en secuencia a una secuencia de polinucleótidos diana.

Un tamaño de al menos 14 nucleótidos de longitud ayuda a asegurar que el fragmento será de longitud suficiente para formar una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Por lo general son de preferencia las moléculas que tienen secuencias complementarias sobre segmentos con una longitud mayor de 14 bases. Para aumentar la estabilidad y la selectividad del híbrido, y mejorar de esta manera la calidad y el grado de moléculas híbridas específicas obtenidas, por lo general resulta de preferencia diseñar moléculas de ácido nucleico con secuencias de 14 a 20 nucleótidos complementarias al gen, o incluso mayores cuando se desea. Tales fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, tales como las químicas de fosforamidita por ejemplo; por medio de aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología de PCR<sup>TM</sup> de las Patentes de EEUU N° 4.683.195 y 4.683.202; o escindiendo fragmentos de ADN seleccionados de plásmidos recombinantes que contienen insertos adecuados y sitios de restricción adecuados.

La presente invención también contempla un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. Por consiguiente, en una forma de realización un vector de expresión es una molécula de ADN aislada

y purificada que comprende un promotor unido de manera operativa a una región codificadora que codifica un polipéptido de la presente invención, cuya región codificadora está operativamente unida a una región de terminación de la transcripción por la que el promotor dirige la transcripción de la región codificadora. La región codificadora puede incluir un segmento o secuencia que codifica una AMPA transacilasa y un segmento o secuencia que codifica un péptido dirigido a plastidios. La molécula de ADN que comprende el vector de expresión puede también contener un intrón funcional de planta, y puede también contener otros elementos funcionales de plantas tales como secuencias que codifican secuencias no traducidas (UTL) y secuencias que actúan como potenciadores de la transcripción o de la traducción.

Según se usa en el presente documento, las expresiones “operativamente unido” o “unido de manera operativa” significan que una secuencia que funciona como un promotor está conectada o unida a una región codificadora de tal manera que la transcripción de la región codificadora está controlada y regulada por ese promotor. Los medios para unir operativamente un promotor a una región codificadora para regular tanto la secuencia arriba como la secuencia abajo son bien conocidos en la técnica.

Los vectores de transformación de plantas de preferencia incluyen los derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, así como los desvelados, por ejemplo, por Herrera-Estrella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) y Solicitud de Patente Europea N° EP 0120516.

Además, los vectores de transformación de plantas de preferencia dirigidos para transformación de cloroplastos o plastidios incluyen los desvelados en la Patente de EEUU N° 5.693.507 (1997), Patente de EEUU N° 5.451.513 (1995), McBride y col. (1995), Staub y col. (1995a), Staub y col. (1995b), y en el documento WO 95/24492.

Donde se usa un vector de expresión de la presente invención para transformar una planta, se selecciona un promotor que tiene la capacidad de dirigir la expresión en esa especie particular de planta. Los promotores que funcionan en diferentes especies de plantas son también bien conocidos en la técnica. Los promotores útiles en la expresión de polipéptido en plantas son los que son inducibles, virales, sintéticos o constitutivos como están descritos (Odell y col., 1985), y/o regulados temporalmente, regulados espacialmente y regulados espacio-temporalmente. De preferencia los promotores incluyen los promotores de CaMV35S potenciados, y el promotor de FMV35S.

La expresión de un gen que existe en forma de ADN de doble hebra localizado en el genoma nuclear de la planta implica la transcripción de ARN mensajero (ARNm) a partir de la hebra codificadora del ADN por medio de una enzima ARN polimerasa, y el posterior procesamiento del transcrito primario de ARNm dentro del núcleo. Los genes expresados de un cloroplasto o plastidio también producen un transcrito de ARNm que no se procesa más antes de la traducción. En cualquier caso, la transcripción del ADN en ARNm está regulada por una región de ADN denominada el “promotor”. El ADN que comprende el promotor está representado por una secuencia de bases que indican a la ARN polimerasa asociarse con el ADN e iniciar la transcripción del ARNm usando una de las hebras de ADN como un molde para generar una hebra de ARN correspondiente. El promotor particular seleccionado debe ser capaz de causar suficiente expresión de una secuencia codificadora de la enzima AMPA aciltransferasa para dar como resultado la producción de una cantidad eficaz de proteína transacilasa localizada en la localización intracelular deseada para otorgar eficaz tolerancia al herbicida o eficaz resistencia al herbicida.

Los genes estructurales pueden estar dirigidos por una diversidad de promotores en tejidos de planta. Los promotores pueden ser casi constitutivos (es decir dirigen la transcripción del transgén en todo el tejido), tal como el promotor CaMV35S, o promotores específicos de tejido o específicos del desarrollo que afectan a dicotiledóneas o monocotiledóneas. Donde el promotor es un promotor casi constitutivo tal como CaMV35S o FMV35S, se encuentran aumentos en la expresión de polipéptidos en una diversidad de tejidos de plantas transformadas y en la mayoría de los órganos de las plantas (por ejemplo, callo, hoja, semilla, tallo, meristema, flor y raíz). Las versiones mejoradas o duplicadas de los promotores CaMV35S y FMV35S son particularmente útiles en la práctica de esta invención (Kay y col., 1987; Rogers, Patente de EEUU N° 5.378.619).

Los expertos en la técnica reconocerán que existen una serie de promotores que son activos en células de plantas, y que se han descrito en la bibliografía. Tales promotores pueden obtenerse de plantas o virus de plantas e incluyen, pero no se limitan a, los promotores de la nopalina sintasa (NOS) y de la octopina sintasa (OCS) (que son transportados en plásmidos inductores de tumores de *A. tumefaciens*), los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (ssRUBISCO, un polipéptido de las plantas muy abundante), el promotor *Act1* del arroz y el promotor 35S del Virus del Mosaico de Figwort (FMV). Todos estos promotores se han usado para crear diversos tipos de construcciones de ADN que se han expresado en plantas (véase por ejemplo, McElroy y col., 1990, Patente de EEUU N° 5.463.175).

Además, puede resultar de preferencia llevar a cabo la expresión de los genes tales como una AMPA aciltransferasa que mejora la tolerancia al herbicida o la resistencia al herbicida en tejidos específicos de una planta usando vectores de integración de plantas que contienen un promotor específico de tejido. Los tejidos diana específicos pueden incluir la hoja, el tallo, la raíz, el tubérculo, la semilla, el fruto, etc., y el promotor elegido debe tener la especificidad de tejido y desarrollo deseada. Por consiguiente, la función del promotor deberá optimizarse seleccionando un promotor con las capacidades de expresión de tejido deseadas y la potencia de promotor aproximada, y seleccionando un transformante que produzca la actividad transacilasa deseada en los tejidos diana. Este enfoque de selección a partir de la combinación de transformantes se utiliza de manera rutinaria en la expresión de genes estructurales heterólogos en las plantas

ya que existe variación entre los transformantes que contienen el mismo gen heterólogo por el sitio de inserción del gen dentro del genoma de la planta (denominado comúnmente “efecto de posición”). Además de los promotores que se sabe que causan transcripción (constitutiva o específica de tejido) del ADN en las células de las plantas, pueden identificarse otros promotores para uso en la presente invención seleccionando una biblioteca de ADNc de plantas en busca de genes que se expresan de manera selectiva o de preferencia en los tejidos diana, determinando a continuación las regiones promotoras. Los promotores funcionales de cloroplastos o plastidios son conocidos en la técnica (Hanley-Bowden y col., Daniell y col., Maliga y col.).

Otros ejemplos de promotores específicos de tejido son los promotores de la sacarosa sintasa 1 del maíz (Yang y col., 1990), de la alcohol deshidrogenasa 1 del maíz (Vogel y col., 1989), del complejo de captación de luz del maíz (Simpson, 1986), de la proteína del choque térmico del maíz (Odell y col., 1985), de la subunidad pequeña de RuBP carboxilasa del guisante (Poulsen y col., 1986; Cashmore y col., 1983), de la manopina sintasa de plásmido Ti (McBride y Summerfelt, 1989), de la nopalina sintasa del plásmido Ti (Langridge y col., 1989), de la chalcona isomerasa de la petunia (Van Tunen y col., 1988), de la proteína 1 rica en glicina de la alubia (Keller y col., 1989), del transcrito 35S de CaMV (Odell y col., 1985) y de patatina de Patata (Wenzler y col., 1989). Los promotores de preferencia son el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el promotor de la subunidad pequeña de RuBP carboxilasa S-E9.

Los promotores usados en las construcciones de ADN de la presente invención pueden modificarse, si se desea, para afectar sus características de control. Por ejemplo, el promotor CaMV35S puede unirse a la porción del gen de ssRUBISCO que reprime la expresión de ssRUBISCO en ausencia de luz, para crear un promotor que es activo en las hojas pero no en las raíces. Para los objetos de esta descripción, la frase promotor “CaMV35S” incluye por consiguiente variaciones del promotor CaMV35S, por ejemplo, promotores derivados por medio de unión con regiones operadoras, mutagénesis aleatoria o controlada, etc. Además, los promotores pueden alterarse para contener múltiples “secuencias potenciadoras” para ayudar a elevar la expresión del gen. Los ejemplos de tales secuencias potenciadoras se han informado por Kay y col. (1987). Los promotores específicos de cloroplastos o plastidios son conocidos en la técnica (Daniell y col., Patente de EEUU N° 5.693.507).

Existen promotores que pueden obtenerse a partir de genes de cloroplastos son, por ejemplo, tales como el gen *psbA* de la espinaca o del guisante, las regiones del promotor *rbcL* y *arpB* del maíz, y los promotores de ARNr. Cualquier promotor funcional de cloroplasto o plastidio está dentro del ámbito de la presente invención.

Una planta transgénica de la presente invención producida a partir de una célula de planta transformada con un promotor específico de tejido puede cruzarse con una segunda planta transgénica desarrollada a partir de una célula de planta transformada con un promotor específico de tejido diferente para producir una planta transgénica híbrida que muestra los efectos de transformación en más de un tejido específico.

El ARN producido por una construcción de ADN de la presente invención puede también contener una secuencia líder 5' no traducida (5'UTL). Esta secuencia puede obtenerse a partir del promotor seleccionado para expresar el gen, y puede modificarse específicamente para aumentar la traducción del ARNm. Las regiones 5' no traducidas puede también obtenerse a partir de ARN virales, a partir de genes eucariotas adecuados, o a partir de una secuencia de un gen sintético. La presente invención no está limitada a construcciones en las que la región no traducida se obtiene a partir de la secuencia 5' no traducida que acompaña a la secuencia del promotor. Una secuencia líder de un gen de planta para uso en la presente invención es el líder de la proteína del choque térmico 70 (*hsp70*) de la petunia (Winter y col., 1988).

Las 5'UTL son capaces de regular la expresión genética cuando se localizan en la secuencia de ADN entre el sitio de iniciación de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificadora. Se han realizado recopilaciones de secuencias líder para predecir secuencias óptimas o subóptimas y generar secuencias líder de preferencia y “de consenso” (Joshi, 1987). Se contempla que las secuencias líder de preferencia incluyan las que comprenden secuencias previstas para dirigir la expresión óptima del gen estructural unido, es decir, que incluyan una secuencia líder de consenso de preferencia que puede aumentar o mantener la estabilidad del ARNm y evitar la iniciación inadecuada de la traducción. Los expertos en la técnica reconocerán la elección de tales secuencias a la luz de la presente descripción. Las secuencias que se obtienen a partir de genes que se expresan en gran medida en las plantas, en particular en el maíz, serán las de mayor preferencia. Un líder particularmente útil puede ser el líder HSP70 de la petunia.

De acuerdo con la presente invención, los vectores de expresión diseñados para potenciar específicamente la expresión del polipéptido en la planta transformada pueden incluir ciertas regiones que codifican péptidos dirigidos a plastidios o cloroplastos, abreviados en el presente documento en diversas formas como CTP, CTP1, CTP2, etc., representando cada uno una secuencia de péptido dirigido variante o diferente. Estas regiones permiten explotar completamente los procesos celulares involucrados en la transcripción, traducción y expresión de la proteína codificada cuando se asocian con ciertas secuencias de proteínas GOX o AMPA transacilasa. Tales péptidos dirigidos funcionan en una diversidad de maneras, tales como por ejemplo, transfiriendo la proteína expresada a la estructura celular en la que funciona más eficazmente, o transfiriendo la proteína expresada a áreas de la célula en las que están concentrados procesos necesarios para la expresión. El uso de los CTP pueden también aumentar la frecuencia de recuperación de plantas morfológicamente normales, y la frecuencia con la que pueden recuperarse plantas transgénicas.

Se ha encontrado que los péptidos dirigidos a cloroplastos son particularmente útiles en el sistema marcador seleccionable resistente al glifosato. En este sistema, las plantas transformadas para expresar una proteína que confiere resistencia al glifosato se transforman junto con un CTP que dirige el péptido a los cloroplastos de las células de la planta. El glifosato inhibe la vía del ácido shikímico que da lugar a la biosíntesis de compuestos aromáticos incluidos aminoácidos y vitaminas. Específicamente, el glifosato inhibe la conversión de ácido fosfoenolpirúvico y ácido 3-fosfoshikímico en ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímico al inhibir la enzima ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímico sintasa (EPSP sintasa o EPSPS). La introducción de un transgén que codifica EPSPS permite a la célula de la planta resistir los efectos del glifosato, especialmente cuando el transgén codifica una enzima EPSPS insensible al glifosato. Por consiguiente, como el herbicida glifosato funciona para matar la célula interrumpiendo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, particularmente en el cloroplasto de la célula, el CTP permite una resistencia aumentada al herbicida al concentrar lo que expresa en la célula la enzima de resistencia al glifosato en el cloroplasto, es decir en el orgánulo diana de la célula. Los ejemplos de enzimas de resistencia a herbicidas incluyen los genes de EPSPS y de glifosato oxido-reductasa (GOX) (véase Comai, 1985, Patente de EEUU N° 4.535.060).

Los CTP pueden dirigir proteínas a los cloroplastos y a otros plastidios. Por ejemplo, el orgánulo diana puede ser el amiloplasto. Los CTP de preferencia de la presente invención incluyen los dirigidos tanto a cloroplastos como también a otros plastidios. Los ejemplos específicos de CTP de preferencia incluyen el CTP de la proteína RUBISCO SSU del maíz, y péptidos funcionalmente relacionados tales como el CTP de la subunidad pequeña de RUBISCO de *Arabidopsis thaliana* y el CTP de EPSPS de *Arabidopsis thaliana*. Los CTP se ejemplifican por medio de las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que se muestran en SEC. ID N°: 9, SEC. ID N°: 11, SEC. ID N°: 13, y SEC. ID N°: 14 respectivamente.

Podrían también producirse plantas, células, semillas, y otros tejidos de plantas recombinantes en los que se hubieran alterado sólo el ADN mitocondrial o del cloroplasto para incorporar las moléculas contempladas en esta solicitud. Se han conocido en la técnica promotores que funcionan en los cloroplastos (Hanley-Bowden y col., Trends in Biochemical Sciences 12: 67-70, 1987). Los procedimientos y composiciones para obtener células que contienen cloroplastos en los que se ha insertado ADN heterólogo se han descrito en la Patente de EEUU N° 5.693.507 (1997). McBride y col. (documento WO 95/24492) desvelan la localización y la expresión de genes que codifican la proteína Cry1 A  $\delta$ -endotoxina en el genoma de cloroplastos de plantas de tabaco.

Un ejemplo de forma de realización de la invención implica la acción de dirigir hacia los plastidios o cloroplastos o localizar en los plastidios o cloroplastos genes que codifican enzimas o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas o resistencia a herbicidas en las plantas. Se han aislado secuencias dirigidas hacia plastidios o cloroplastos de numerosos genes nucleares codificados de plantas y se ha mostrado que dirigen la importación de proteínas sintetizadas en el citoplasma en los plastidios o cloroplastos (examinado por Keegstra y Olsen, 1989). En la práctica de esta invención puede utilizarse una diversidad de secuencias dirigidas a plastidios, bien conocidas en la técnica, incluidas pero limitadas a ADPGPP, EPSP sintasa o ssRUBISCO. Además, las secuencias dirigidas a plastidios (péptido y ácido nucleico) para cultivos de monocotiledóneas pueden estar constituidas por un fragmento genómico codificador que contiene una secuencia de intrón así como un sitio de escisión proteolítica duplicado en las secuencias dirigidas a plastidios codificadas.

En este documento se hace referencia a la secuencia de CTP de preferencia para los cultivos de dicotiledóneas como (SEC. ID N°: 9), y está constituida por un fragmento codificador genómico que contiene la secuencia de péptido dirigido hacia el cloroplasto del gen de la EPSP sintasa de *Arabidopsis thaliana* en el que el sitio de escisión del péptido de tránsito del CTP de ssRUBISCO del guisante reemplaza el sitio de escisión CTP de EPSP sintasa nativo (Klee y col., 1987).

Para una expresión optimizada en las plantas monocotiledóneas, también puede incluirse un intrón en la construcción de expresión del ADN. Tal intrón se coloca típicamente cerca del extremo 5' del ARNm en la secuencia no traducida. Este intrón puede obtenerse de, pero no se limita a, una serie de intrones constituida por el intrón 70 de la proteína del choque térmico (HSP) del maíz (Patente de EEUU N° 5.424.412; 1995), el intrón *Act1* del arroz (McElroy y col., 1990), el intrón 1 *Adh* (Callis y col., 1987), o el intrón de la sacarosa sintasa (Vasil y col., 1989).

La región 3' no traducida de los genes de la presente invención que se localizan hacia el genoma nuclear de la planta también contiene una señal de poliadenilación que funciona en las plantas para causar la adición de nucleótidos adenilato al extremo 3' del ARNm. La ARN polimerasa transcribe un genoma nuclear que codifica la secuencia de ADN a través de un sitio donde se produce la poliadenilación. Típicamente, las secuencias de ADN localizadas unos pocos cientos de pares de bases secuencia abajo del sitio de poliadenilación sirven para terminar la transcripción. En el presente documento se hace referencia a esas secuencias de ADN como regiones de terminación de la transcripción. Esas regiones son necesarias para la eficaz poliadenilación del ARN mensajero (ARNm) transcrito. Los ejemplos de regiones 3' de preferencia son (1) las regiones 3' transcritas, no traducidas que contienen la señal de poliadenilación de los genes del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium*, tal como el gen de la nopalina sintasa (NOS) y (2) los extremos 3' de los genes de plantas tales como el gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa del guisante, denominado en este documento como E9 (Fischhoff y col., 1987). Las construcciones incluirán típicamente el gen de interés junto con un extremo 3' de la secuencia de ADN que actúa como una señal para terminar la transcripción y, en construcciones proyectadas para la expresión genómica nuclear, permite la poliadenilación del ARNm resultante. Se contempla que los elementos 3' de más preferencia sean los del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (extremo 3' de nos) (Bevan y col., 1983), el terminador para el transcrito T7 del gen de la octopina

## ES 2 325 874 T3

sintasa de *A. tumefaciens*, y el extremo 3' de los genes del inhibidor de proteasa I o II de la patata o del tomate. Los elementos reguladores tales como el elemento  $\Omega$  de TMV Q (Gallie, y col., 1989), pueden incluirse además donde se desee.

5 Según la presente invención y como se indicó anteriormente, los genes localizados en cloroplastos o plastidios que codifican enzimas que confieren características de tolerancia a herbicidas o resistencia a herbicidas a las plantas no necesitan secuencias que confieran señales de terminación de la transcripción y poliadenilación, pero en su lugar pueden sólo necesitar información de terminación de la transcripción en el extremo 3' del gen. Para las secuencias codificadoras introducidas en un cloroplasto o plastidio, o en un genoma de cloroplasto o plastidio, la terminación  
10 de la transcripción del ARNm es similar a los procedimientos bien conocidos en la técnica de expresión de genes bacterianos. Por ejemplo, tanto en una secuencia policistrónica como en una monocistrónica, la transcripción puede terminarse por medio de estructura de tallo y bucle o por estructuras similares a secuencias dependientes de *rho*.

Podrían usarse potenciadores de la transcripción o duplicaciones de potenciadores para aumentar la expresión.  
15 Estos potenciadores se encuentran frecuentemente en posición 5' al comienzo de la transcripción en un promotor que funciona en células eucariotas, pero frecuentemente pueden insertarse en la orientación directa o inversa 5' o 3' a la secuencia codificadora. Los ejemplos de potenciadores incluyen elementos del promotor 35S de CaMV, genes de la octopina sintasa (Ellis y col., 1987), el gen de la actina del arroz, y el promotor de eucariotas diferentes de plantas (por ejemplo, levaduras; Ma y col., 1988).

20 En ciertas formas de realización de la invención, el uso de elementos de sitios internos de unión de ribosomas (IRES) se utiliza para crear mensajes multigenéticos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de sortear el modelo de barrido ribosómico de traducción dependiente de Cap 5 metilado y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier and Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier and Sonenberg, 1988), así como IRES de un mensaje de mamífero (Macejak and Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden estar unidos a marcos de lectura abiertos heterólogos. Los múltiples marcos de lectura abiertos pueden transcribirse juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto está accesible a los ribosomas para la traducción eficaz. Múltiples genes pueden expresarse de manera eficaz usando un único promotor/potenciador para transcribir un  
30 único mensaje.

Cualquier marco de lectura abierto heterólogo puede unirse a elementos IRES. Este incluye genes para proteínas secretadas, proteínas de subunidades múltiples, codificadas por genes independientes, proteínas intracelulares o unidas a membrana y marcadores seleccionables. De esta manera, la expresión de varias proteínas puede prepararse  
35 simultáneamente dentro de una célula con una única construcción y un único marcador seleccionable.

Las construcciones proyectadas para la expresión dentro de un cloroplasto o plastidio usando maquinaria de transcripción y traducción específica de cloroplasto o plastidio pueden contener secuencias mono o policistrónicas.

40 La elección de qué vector de expresión y finalmente a qué promotor se une operativamente una región codificadora de polipéptido depende directamente de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la localización y el tiempo de expresión proteica y la célula huésped a transformar. Estas son limitaciones bien conocidas inherentes en la técnica de construcción de moléculas de ADN recombinantes. Sin embargo, un vector útil en la práctica de la presente invención es capaz de dirigir la expresión de la región codificadora de polipéptido a la que está unida de manera  
45 operativa.

Los vectores típicos útiles para la expresión de genes en plantas superiores son bien conocidos en la técnica e incluye vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *A. tumefaciens* descrito (Rogers y col., 1987). Sin embargo, se sabe que otros varios sistemas de vectores de integración de plantas funcionan en las plantas incluido el vector de control de transferencia pCaMVCN descrito (Fromm y col., 1985). pCaMVCN (disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ) incluye el promotor CaMV35S.

55 En formas de realización de preferencia, el vector usado para expresar el polipéptido incluye un marcador de selección que es eficaz en una célula de planta, de preferencia un marcador de selección resistente a fármacos. Un marcador de selección resistente a fármacos de preferencia es el gen cuya expresión da como resultado la resistencia kanamicina; es decir el gen quimérico que contiene el promotor de la nopalina sintasa, Tn5 neomicina fosfotransferasa II (nptII) y la región 3' no traducida de la nopalina sintasa descrita (Rogers y col., 1988).

60 Los medios para preparar vectores de expresión son bien conocidos en la técnica. Los vectores de expresión (transformación) usados para transformar plantas y los procedimientos para generar esos vectores están descritos en las Patentes de EEUU N° 4.971.908, 4.940.835, 4.769.061 y 4.757.011. Esos vectores pueden modificarse para incluir una secuencia codificadora según la presente invención.

65 Se ha desarrollado una diversidad de procedimientos para unir de manera operativa el ADN a los vectores a través de extremos terminales cohesivos complementarios o extremos romos. Por ejemplo, pueden añadirse extensiones de homopolímeros complementarios al segmento de ADN a insertar y al ADN del vector. El vector y el segmento de ADN se juntan a continuación por medio de enlaces de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinantes.

## ES 2 325 874 T3

Una región codificadora que codifica un polipéptido que tiene la capacidad para conferir actividad enzimática de resistencia a herbicidas mejorada a una célula es de preferencia un polinucleótido que codifica una AMPA transacilasa o un equivalente funcional, solo o en combinación, con un gen que codifica una enzima GOX o un equivalente funcional de GOX. De acuerdo con tales formas de realización, también resulta de preferencia una región codificadora que comprende las secuencias de ADN de SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 7 ó SEC. ID N°: 19.

Los genes específicos que codifican la AMPA transacilasa que se ha mostrado que transforman plantas de manera satisfactoria conjuntamente con genes que codifican péptidos dirigidos a plastidios, para expresar la AMPA transacilasa en niveles suficientes protectores frente a herbicidas son los genes comprendidos dentro de los vectores plasmídicos. Los plásmidos de preferencia que contienen secuencias dirigidas a plastidios incluyen pMON17261, pMON10151, pMON10149, pMON32570, pMON32571, pMON32572, pMON32573, pMON32926, pMON32931, pMON32932, pMON32936, pMON32938, pMON32946, pMON32947, pMON32948 y pMON32950. Estos plásmidos contienen secuencias de polinucleótidos que codifican secuencias dirigidas como se muestran en SEC. ID N°: 9, SEC. ID N°: 11, SEC. ID N°: 13, SEC. ID N°: 14. Las casetes de expresión que comprenden los promotores funcionales de plantas unidos a secuencias codificadoras, algunos con y algunos sin secuencias 5' no traducidas y/o secuencias de intrones, en las que las secuencias codificadoras contienen al menos una AMPA transacilasa o transacetilasa, unidas a las secuencias de terminación funcionales de plantas se desvelan en particular como se expone en SEC. ID N°: 23, SEC. ID N°: 25, SEC. ID N°: 27, SEC. ID N°: 29, y SEC. ID N°: 31.

El trabajo descrito en el presente documento ha identificado procedimientos para potenciar la expresión de una AMPA transacilasa *in planta*, que confiere protección del glifosato y herbicidas relacionados a las plantas cuando se incorpora en el genoma nuclear, de plastidios, o cloroplastos de plantas susceptibles que también expresan un gen de GOX o similar. La Patente de EEUU N° 5.500.365 describe un procedimiento para sintetizar genes de plantas para optimizar el nivel de expresión de la proteína que codifica el gen sintetizado. Este procedimiento se refiere a la modificación de las secuencias del gen estructural del transgén exógeno, para hacerlas más “análogas de plantas” y por consiguiente con más probabilidad de ser traducidas y expresadas por una planta. Un procedimiento similar para la expresión mejorada de transgenes, de preferencia en plantas monocotiledóneas, se desvela en la Patente de EEUU N° 5.689.052. Pueden generarse plantas útiles desde el punto de vista agronómico, de la horticultura, ornamental, y desde otros puntos de vista económicos o comerciales según los procedimientos descritos en el presente documento.

Tales plantas pueden coexpresar el gen de AMPA transacilasa y/o un gen de GOX junto con otros péptidos, polipéptidos, o proteínas relacionados con patogénesis antifúngicos, antibacterianos, o antivirales; proteínas insecticidas; otras proteínas que confieren resistencia a herbicidas; y proteínas implicadas en mejorar la calidad de productos de las plantas o el rendimiento agronómicos de las plantas. La coexpresión simultánea de múltiples proteínas heterólogas en las plantas es ventajosa porque puede explotar más de un modo de acción para controlar el daño de las plantas o mejorar la calidad de la planta o de los productos producidos por el metabolismo de las plantas.

Está contemplado que pueda resultar deseable la introducción de grandes secuencias de ADN que comprenden mas de un gen. La introducción de tales secuencias puede facilitarse por el uso de cromosomas artificiales bacterianos o de levaduras (BAC o YAC, respectivamente), o incluso cromosomas artificiales de plantas. Por ejemplo, el uso de los BAC para la transformación mediada por *Agrobacterium* fue desvelado por Hamilton y col. (1996).

Finalmente, las secuencias de ADN más deseables para introducir en el genoma de una monocotiledónea pueden ser genes homólogos o familias de genes que codifican un rasgo deseado (por ejemplo, rendimiento aumentado), y que se introducen bajo el control de promotores o potenciadores nuevos, etc., o tal vez incluso promotores o elementos de control homólogos o específicos de tejido (por ejemplo, específicos de cuello de raíz/vaina, cogollo, tallo, espiga, grano u hoja). Por cierto, está contemplado que un uso particular de la presente invención puede ser la producción de transformantes que comprenden un transgén que está dirigido de una manera específica de tejido. Por ejemplo, los genes de resistencia a herbicidas o tolerancia a herbicidas pueden expresarse específicamente o regularse específicamente de una manera negativa en los tejidos reproductores de las plantas que pueden proporcionar a esos tejidos un medio para mejorar la tolerancia o sensibilidad a los herbicidas. Tales medios de control reguladores pueden proporcionar procedimientos para regular la salida de los transgenes en el entorno o para controlar el uso ilícito de la propiedad comercializada o intelectual autorizadas o de marcas registradas.

Los vectores para uso en la expresión de genes específicos de tejido en las plantas transgénicas incluirán típicamente promotores específicos de tejido y también pueden incluir otros elementos de control específicos de tejido tales como secuencias potenciadoras. Los promotores que dirigen la expresión específica o mejorada en ciertos tejidos de plantas serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción.

También está contemplado que la expresión específica de tejido pueda llevarse a cabo de manera funcional introduciendo un gen expresado constitutivamente (todos los tejidos) en combinación con un gen complementario que se expresa solo en los tejidos donde el producto genético no es deseado. Por ejemplo, puede introducirse un gen que codifica la AMPA transacilasa de *E. coli* de manera que se exprese en todos los tejidos usando el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. Como alternativa, podría usarse un promotor de actina del arroz o un promotor de histonas de una especie dicotiledónea o monocotiledónea para la expresión de un gen. Además, está contemplado que puedan ser útiles los promotores que combinen elementos de más de un promotor. Por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.491.288 desvela la combinación de un promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor con un promotor de histonas. Por consiguiente, la expresión de un transcrito complementario del gen de la AMPA transacilasa en la semilla

del maíz, usando por ejemplo un promotor de zeína, podrá prevenir la acumulación de la transacilasa en la semilla. Por consiguiente, en una planta que expresa GOX y la transacilasa, la aplicación del herbicida glifosato dará como resultado tejidos de semillas que no maduran. A la inversa, la supresión complementaria del gen de GOX dará como efecto los mismos resultados. De preferencia, la supresión de la transacilasa en tejidos específicos será más ventajosa, en particular donde los tejidos específicos han demostrado una intolerancia al AMPA o a compuestos relacionados. El autor de la invención contempla específicamente que podría usarse una estrategia similar con la presente invención para dirigir la expresión de un marcador identificable o seleccionable en el tejido de las semillas.

Como alternativa, puede resultar deseable obtener nuevas secuencias de promotores específicos de tejido para uso de acuerdo con la presente invención. Para lograr esto, pueden aislarse primero los clones de ADNc del tejido afectado e identificarse los clones que son expresados específicamente en ese tejido, por ejemplo, usando transferencia Northern. De manera ideal, puede ser deseable identificar un gen que no está presente en un número elevado de copias, pero cuyo producto genético es relativamente abundante en tejidos específicos. El promotor y los elementos de control de los clones genómicos correspondientes pueden localizarse usando las técnicas de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica.

Se contempla que la expresión de algunos genes en las plantas transgénicas será deseable sólo bajo condiciones especificadas. Por ejemplo, se propone que la expresión de ciertos genes que confieren resistencia a factores de estrés ambiental tales como la sequía será deseable sólo bajo condiciones de estrés reales. Se contempla además que la expresión de tales genes a lo largo de todo el desarrollo de las plantas pueda tener efectos perjudiciales. Se sabe que existe una gran cantidad de genes que responden al ambiente. Por ejemplo, la expresión de algunos genes tales como *rbcS*, que codifica la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa, está regulada por la luz mediada por medio del fitocromo. Otros genes están inducidos por estímulos secundarios. Por ejemplo, la síntesis de ácido abscísico (ABA) está inducida por ciertos factores ambientales, incluidos pero no limitados al estrés por agua. Se ha demostrado una serie de genes inducidos por ABA (Skriver and Mundy, 1990). También se espera que la expresión de genes que confieren resistencia a las aplicaciones de herbicidas resulte deseable sólo bajo condiciones en las que el herbicida esté realmente presente. Por consiguiente, para algunos rasgos deseados, resultará deseable la expresión inducible de los genes en las plantas transgénicas.

Se propone que, en algunas formas de realización de la presente invención, la expresión de un gen en una planta transgénica será deseable sólo en un cierto período de tiempo durante el desarrollo de la planta. El tiempo de desarrollo está frecuentemente correlacionado con la expresión de genes específicos de tejido. Por ejemplo la expresión de las proteínas de almacenamiento de la zeína se inicia en el endosperma aproximadamente 15 días después de la polinización.

Se contempla también que puede ser útil dirigir específicamente la inserción de ADN dentro de una célula. Por ejemplo, puede ser útil dirigir el ADN introducido al núcleo, y en particular en una posición precisa dentro de uno de los cromosomas de la planta para lograr integración específica de sitio. Por ejemplo, sería útil tener introducir un gen a través de la transformación que actúa para reemplazar un gen existente en la célula, o para complementar un gen que no es funcional o no está presente.

También está contemplada una planta transformada con un vector de expresión de la presente invención. También está contemplada una planta transgénica derivada de tal célula transformada o transgénica. Los expertos en la técnica reconocerán que un gen quimérico de planta que contiene una secuencia estructural codificadora de la presente invención puede insertarse en el genoma de una planta por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos para transformar el ADN de células de plantas incluyen la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, el uso de liposomas, la transformación usando virus o polen, la electroporación, la transformación de protoplastos, la transferencia de genes en el polen, la inyección en órganos reproductores, la inyección en embriones inmaduros y el bombardeo de partículas. Cada uno de estos procedimientos tiene diferentes ventajas y desventajas. Por consiguiente, un procedimiento particular para introducir genes en una cepa particular de planta puede no ser necesariamente el más eficaz para otra cepa de planta, pero se sabe bien cuáles procedimientos son útiles para una cepa particular de planta.

Existen muchos procedimientos para introducir segmentos de ADN transformantes en las células, pero no todos son adecuados para administrar ADN a las células de las plantas. Se cree que los procedimientos adecuados incluyen virtualmente cualquier procedimiento por el que puede introducirse ADN en una célula, tal como por infección por *A. tumefaciens* y cepas de *Agrobacterium* relacionadas, administración directa de ADN tal como, por ejemplo por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh y col., 1993), por captación de ADN mediada por desecación/inhibición, por electroporación, por agitación con fibras de carburo de silicio, por aceleración de partículas recubiertas de ADN, etc. En ciertas formas de realización, resultan de preferencia los procedimientos de aceleración e incluyen, por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles y similares.

La tecnología para introducir el ADN en las células es bien conocida por los expertos en la técnica. Se han descrito cuatro procedimientos generales para administrar un gen en las células: (1) procedimientos químicos (Graham and van der Eb, 1973); (2) procedimientos físicos tales como la microinyección (Capecchi, 1980), electroporación (Wong and Neuman, 1982; Fromm y col., 1985) y la pistola de genes (Johnston and Tang, 1994; Fynan y col., 1993); (3) vectores virales (Clapp, 1993; Lu y col., 1993; Eglitis and Anderson, 1988a; 1988b); y (4) mecanismos mediados por receptores (Curiel y col., 1991; 1992; Wagner y col., 1992).

La aplicación de pulsos eléctricos breves, de alto voltaje a una diversidad de células de animales y plantas da lugar a la formación de poros de tamaño nanométrico en la membrana plasmática. El ADN penetra directamente en el citoplasma de la célula a través de estos poros o como consecuencia de la redistribución de los componentes de membrana que acompaña el cierre de estos poros. La electroporación puede ser extremadamente eficaz y puede usarse tanto para la expresión transitoria de los genes clonados como para el establecimiento de líneas celulares que llevan integradas copias del gen de interés. La electroporación, a diferencia de la transfección mediada por fosfato de calcio y la fusión de protoplastos, con frecuencia da lugar a líneas celulares que llevan una, o como mucho unas pocas, copias integradas del ADN extraño.

La introducción del ADN por medio de electroporación es bien conocida por los expertos en la técnica. Para efectuar la transformación por electroporación, pueden utilizarse tejidos friables tales como un cultivo en suspensión de células, o un callo embrionario, o como alternativa, pueden transformarse embriones inmaduros u otros tejidos organizados directamente. Pueden degradarse parcialmente las paredes celulares de las células elegidas exponiéndolas a enzimas que degradan la pectina (pectinolasas) o mecánicamente lesionando de una manera controlada, haciendo que las células sean más susceptibles a la transformación. Tales células serán a continuación receptoras para la transferencia de ADN por electroporación, que puede llevarse a cabo en esta etapa, y tales células transformadas se identificarán a continuación por medio de un protocolo adecuado de selección o identificación dependiente de la naturaleza del ADN incorporado nuevo.

Otro procedimiento ventajoso para administrar segmentos de ADN transformantes a las células de plantas es el bombardeo de microproyectiles. En este procedimiento, las partículas pueden recubrirse con ácidos nucleicos y administrarse en las células por medio de una fuerza propulsora. Los ejemplos de partículas incluyen los que comprenden tungsteno, oro, platino, y similares. Usando estas partículas, el ADN se transporta a través de la pared celular y dentro del citoplasma en la superficie de pequeñas partículas metálicas como está descrito (Klein y col., 1987; Klein y col., 1988; Kawata y col., 1988). Las partículas metálicas penetran a través de varias capas de células y permiten de esta manera la transformación de células dentro de explantes de tejidos. El procedimiento de bombardeo de microproyectiles resulta de preferencia para la identificación de sucesos de transformación dirigidos a cloroplastos o plastidios.

Una ventaja del bombardeo de microproyectiles, además de ser un medio eficaz para transformar de manera estable células de plantas de forma reproducible, es que no es necesario el aislamiento de protoplastos (Cristou y col., 1988) ni la susceptibilidad a la infección por *Agrobacterium*. Una forma de realización ilustrativa de un procedimiento para administrar ADN en células de plantas por aceleración es un Sistema de Administración de Partículas Biolístico, que puede usarse para propulsar partículas recubiertas con ADN o células a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o Nytex, en una superficie del filtro cubierta con las células cultivadas en suspensión de la planta. El tamiz dispersa las partículas para que no se administren a las células receptoras en grandes agregados. Se cree que un tamiz que interviene entre el aparato de proyectiles y la célula a bombardear reduce el tamaño del agregado de proyectiles y puede contribuir a una mayor frecuencia de transformación al reducir el daño infligido en las células receptoras por los proyectiles que son muy grandes.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran de preferencia en filtros o en medio de cultivo sólido. Como alternativa, pueden organizarse embriones inmaduros u otras células diana en medio de cultivo sólido. Las células a bombardear se colocan a una distancia aproximada por debajo de la placa que detiene los microproyectiles. Si se desea, también se colocan uno o más tamices entre el dispositivo de aceleración y las células a bombardear. A través del uso de las técnicas expuestas en el presente documento pueden obtenerse 1000 o más focos de células que expresan un gen marcador de manera transitoria. El número de células en un foco que expresan el producto del gen exógeno 48 horas después del bombardeo frecuentemente varía desde 1 hasta 10 y promedian 1 a 3.

En la transformación por bombardeo, pueden optimizarse las condiciones de cultivo previo al bombardeo y los parámetros de bombardeo para dar la cantidad máxima de transformantes estables. Tanto los parámetros físicos como biológicos para el bombardeo son importantes para esta tecnología. Los factores físicos son los que implican la manipulación de precipitado de DNA/microproyectil o los que afectan el vuelo y la velocidad de los macro o microproyectiles. Los factores biológicos incluyen todas las etapas involucradas en la manipulación de las células antes e inmediatamente después del bombardeo, el ajuste osmótico de las células diana para ayudar a aliviar el trauma asociado con el bombardeo, y también la naturaleza del ADN transformante, tal como ADN linealizado o plásmidos superenrollados intactos. Se cree que las manipulaciones previas al bombardeo son especialmente importantes para la transformación exitosa de embriones inmaduros de plantas.

Por consiguiente, está contemplado que uno pueda desear ajustar diversos parámetros de bombardeo en estudios a pequeña escala para optimizar completamente las condiciones. Uno puede desear particularmente ajustar los parámetros físicos tales como la distancia del intervalo, la distancia de vuelo, la distancia de tejido y la presión de helio. Uno puede también minimizar los factores de reducción de trauma (TRF) modificando condiciones que influyen en el estado físico de las células receptoras y que pueden por consiguiente influir en las eficacias de transformación e integración. Por ejemplo, puede ajustarse el estado osmótico, la hidratación tisular y el estado de subcultivo o ciclo celular de las células receptoras para la transformación óptima. La ejecución de otros ajustes de rutina será reconocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción.

Los procedimientos de transformación mediada por partículas son bien conocidos por los expertos en la técnica. La Patente de EEUU N° 5.015.580 describe la transformación de las semillas de soja usando una de tales técnicas.

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en células de plantas porque puede introducirse ADN en la el tejido de plantas completas, evitando de esta manera la necesidad de regeneración de una planta intacta a partir de un protoplasto. El uso de vectores de integración de plantas mediados por *Agrobacterium* para introducir ADN en las células de plantas es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, los procedimientos descritos (Fraley y col., 1985; Rogers y col., 1987). La ingeniería genética utilizada para producir plantas de algodón usando transferencia mediada por *Agrobacterium* está descrita en la Patente de EEUU N° 5.004.863; una transformación similar de plantas de lechuga está descrita en la Patente de EEUU N° 5.349.124; y la transformación de soja mediada por *Agrobacterium* está descrita en la Patente de EEUU N° 5.416.011. Además, la integración del Ti-ADN es un proceso relativamente preciso que da lugar a pocas reorganizaciones. La región del ADN a transferir está definida por las secuencias de los bordes, y el ADN interviniente se inserta usualmente en el genoma de la planta como está descrito (Spielmann y col., 1986; Jorgensen y col., 1987).

Los vectores de transformación de *Agrobacterium* modernos son capaces de replicar en *E. coli* así como en *Agrobacterium*, permitiendo manipulaciones convenientes como está descrito (Klee y col., 1985). Además, avances tecnológicos recientes en vectores para transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* han mejorado la organización de los genes y sitios de restricción y los vectores para facilita la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes que codifican polipéptidos. Los vectores descritos (Rogers y col., 1987), tienen regiones conectoras múltiples convenientes vecinas a un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de los genes codificados de polipéptidos insertados y son adecuados para los presentes objetos. Además, para las transformaciones puede usarse el *Agrobacterium* que contiene tanto genes Ti armados como desarmados. En aquellas variedades de plantas donde la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficaz, es el procedimiento de elección por la fácil y definida naturaleza de la transferencia genética.

La transformación mediada por *Agrobacterium* de discos de hojas y de otros tejidos tales como cotiledones o hipocótilos parece estar limitada a plantas que infectan naturalmente el *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* es más eficaz en las plantas dicotiledóneas. Pocas monocotiledóneas parecen ser huéspedes naturales para *Agrobacterium*, aunque se han producido plantas transgénicas en espárragos usando vectores de *Agrobacterium* como está descrito (Bytebier y col., 1987). Recientemente se han transformado también otras monocotiledóneas con *Agrobacterium*. En este grupo están incluidos el maíz (Ishida y col.) y el arroz (Cheng y col.).

Una planta transgénica formada usando procedimientos de transformación de *Agrobacterium* contiene típicamente un único gen en un cromosoma. Puede hacerse referencia a tales plantas transgénicas como homocigotas para el gen añadido. Sin embargo, por más que el uso de la palabra "heterocigota" usualmente implica la presencia de un gen complementario en el mismo locus del segundo cromosoma de un par de cromosomas, y no existe tal gen en una planta que contiene un gen añadido como aquí, se cree que un nombre más exacto para tal planta es un segregante independiente, porque el gen añadido, exógeno segrega independiente durante la mitosis y la meiosis.

Un segregante independiente puede resultar de preferencia cuando la planta se comercializa como un híbrido, tal como el maíz. En este caso, se cruza un segregante independiente que contiene el gen con otra planta, para formar una planta híbrida que es heterocigota para el gen de interés.

Una preferencia alternativa es para una planta transgénica que es homocigota para el gen estructural añadido; es decir una planta transgénica que contiene dos genes añadidos, un gen en le mismo locus en cada cromosoma de un par de cromosomas. Una planta transgénica homocigota puede obtenerse por unión sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen añadido, germinando algunas de las semillas producidas y analizando la presencia de la actividad del gen de interés en las plantas resultantes producidas y la herencia mendeliana que indica homocigosidad con relación a un control (nativo, no transgénico) o a una planta transgénica segregante independiente.

Pueden unirse dos plantas transgénicas diferentes para producir descendencia que contiene dos genes exógenos, añadidos segregantes de manera independiente. La autofertilización de una progenie adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos, que codifican un polipéptido de interés. También están contemplados el retrocruzamiento a una planta relacionada y el cruzamiento lejano con una planta no transgénica.

La transformación de protoplastos de plantas puede alcanzarse usando procedimientos basados en la precipitación con fosfato de calcio, el tratamiento con polietilenglicol, la electroporación y combinaciones de estos tratamientos (véase por ejemplo, Potrykus y col., 1985; Lorz y col., 1985; Fromm y col., 1985; Uchimiya y col., 1986; Callis y col., 1987; Marcotte y col., 1988).

La aplicación de estos sistemas a diferentes germoplasmas de plantas depende de la capacidad para regenerar esa variedad particular de planta a partir de protoplastos. Los procedimientos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos están descritos (véase, por ejemplo, Fujimura y col., 1985; Toriyama y col., 1986; Yamada y col., 1986; Abdullah y col., 1986).

Para transformar germoplasma de plantas que no puede regenerarse con éxito a partir de protoplastos, pueden utilizarse otras formas para introducir el ADN en las células intactas o tejidos. Por ejemplo, puede efectuarse la regeneración de cereales a partir de embriones inmaduros o explantes como está descrito (Vasil, 1988).

Los genes bacterianos no modificados se expresan con frecuencia de manera pobre en las células de las plantas transgénicas. El uso de codones de las plantas se asemeja más al de los seres humanos y otros organismos superiores que al de los organismos unicelulares, tales como las bacterias. Varios informes han desvelado procedimientos para mejorar la expresión de genes recombinantes en plantas (Murray y col., 1989; Diehn y col., 1996; Ianacone y col., 1997; Rouwendal y col., 1997; Futterer y col., 1997; y Futterer and Hohn, 1996). Estos informes desvelan diversos procedimientos para producir secuencias codificadoras para representar secuencias que se traducen más eficazmente basándose en tablas de frecuencias de codones de plantas, mejoras en la probabilidad de posición de la tercera base del codón, usando secuencias recombinantes que evitan sospecha de poliadenilación o dominios ricos en A/T o secuencias de consenso de empalme de intrones.

La Patente de EEUU N° 5.500.365 describe el procedimiento de preferencia para sintetizar genes de plantas para optimizar el nivel de expresión de la proteína que codifica el gen sintetizado. Este procedimiento se refiere a la modificación de las secuencias del gen estructural del transgén exógeno, para hacerlas más "análogas de plantas" y por consiguiente con más probabilidad de ser traducidas y expresadas por una planta, monocotiledónea o dicotiledónea. Sin embargo, el procedimiento según se desvela en la Patente de EEUU N° 5.689.052 proporciona la expresión mejorada de transgenes, de preferencia en plantas monocotiledóneas. Brevemente, según Brown y col., la frecuencia de codones raros y semi raros de monocotiledóneas en una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína deseada es reducida y se reemplaza con más codones de monocotiledóneas de preferencia. La mayor acumulación de un polipéptido deseado codificado por una secuencia de polinucleótidos modificada en una planta monocotiledónea es el resultado de aumentar la frecuencia de los codones de preferencia analizando la secuencia codificadora en fragmentos sucesivos de seis nucleótidos y alterando la secuencia basándose en la frecuencia de aparición de los hexámeros comparado con la frecuencia de aparición de los hexámeros más raros 284, 484 y 664 en las plantas monocotiledóneas. Además, Brown y col. desvelan la expresión mejorada de un gen recombinante aplicando el procedimiento para reducir la frecuencia de codones raros con procedimientos para reducir la presentación de señales de poliadenilación y sitios de empalme de intrones en la secuencia de nucleótidos, eliminando las secuencias auto complementarias en la secuencia de nucleótido y reemplazando tales secuencias con nucleótidos no auto complementarios manteniendo al mismo tiempo un gen estructural que codifica el polipéptido, y reduciendo la frecuencia de presentación de pares de di-nucleótidos 5'-CG-3' en la secuencia de nucleótidos. Estas etapas se realizan de manera secuencial y tienen un efecto acumulado dando lugar a una secuencia de nucleótidos que contiene una utilización preferencial de codones de más preferencia de monocotiledóneas para las plantas monocotiledóneas para la mayor parte de los aminoácidos presentes en el polipéptido deseado.

Por consiguiente, la cantidad de un gen que codifica un polipéptido de interés puede aumentarse en las plantas transformando esas plantas utilizando procedimientos de transformación tales como los que se desvelan en el presente documento. En particular, la transformación de cloroplastos o plastidios puede dar como resultado la presencia de secuencias codificadoras deseadas en hasta aproximadamente 10.000 copias por célula en los tejidos que contienen estas estructuras de orgánulos subcelulares (McBride y col., Bio/Technology 13: 362-365, 1995).

El DNA también puede introducirse en las plantas por transferencia directa de ADN en el polen como está descrito (Zhou y col., 1983; Hess, 1987). Puede obtenerse expresión de genes que codifican polipéptidos por inyección del ADN en los órganos reproductores de una planta como está descrito (Pena y col., 1987). También puede inyectarse ADN directamente en las células de embriones inmaduros y puede introducirse en las células por rehidratación de embriones disecados como está descrito (Neuhaus y col., 1987; Benbrook y col., 1986).

Tras efectuar la administración del ADN exógeno a las células receptoras, la siguiente etapa para obtener una planta transgénica se refiere generalmente a identificar las células transformadas para el posterior cultivo y regeneración de la planta. Como se menciona en el presente documento, para mejorar la capacidad para identificar transformantes, uno puede desear utilizar un gen de marcador identificable o seleccionable, o además, el gen expresable de interés. En este caso, uno podrá ensayar posteriormente en general la población de células potencialmente transformadas exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o uno podrá seleccionar las células según el rasgo deseado del gen marcador.

Una forma de realización ejemplar de los procedimientos para identificar células transformadas implica exponer los cultivos transformados a un agente selectivo, tal como un inhibidor metabólico, un antibiótico, herbicida o similar. Las células que han sido transformadas y tienen un gen marcador integrado de manera estable que confiere resistencia al agente selectivo usado, crecerán y se dividirán en cultivo. Las células sensibles no serán susceptibles de otro cultivo. Un ejemplo de un gen marcador de preferencia confiere resistencia al glifosato. Cuando se usa este gen como un marcador seleccionable, el cultivo celular transformado de manera putativa se trata con glifosato. Tras el tratamiento, las células transgénicas estarán disponibles para otros cultivos mientras que las células sensibles, o no transformadas, no lo estarán. Este procedimiento está descrito en detalle en la Patente de EEUU N° 5.569.834.

Otro ejemplo de un sistema marcador seleccionable de preferencia es el sistema de resistencia a la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) por el que se confiere resistencia al antibiótico kanamicina, como está descrito en la Patente de EEUU N° 5.569.834. Nuevamente, tras la transformación con este sistema, las células transformadas estarán disponibles para otro cultivo tras el tratamiento con kanamicina, mientras que las células no transformadas no lo estarán. Aún otro sistema marcador seleccionable de preferencia incluye el uso de una construcción genética que confiere resistencia a la paromomicina. El uso de este tipo de sistema marcador seleccionable está descrito en la Patente de EEUU N° 5.424.412.

Otro sistema marcador seleccionable de preferencia incluye el uso de los genes contemplados por esta invención. En particular, puede utilizarse un gen de *phnO* o un gen sustancialmente similar que codifica una AMPA transacilasa como un marcador seleccionable. Las células de plantas en las que se ha introducido una molécula de ADN recombinante en su genoma pueden seleccionarse de una población de células que fracasaron en incorporar una molécula recombinante haciendo crecer las células en presencia de AMPA. Un experto en la técnica reconocerá las ventajas particulares que tiene este sistema marcador seleccionable sobre los sistemas marcadores seleccionables previos. El marcador seleccionable usado en el ADN recombinante integrado en el genoma de una planta reduce la cantidad de ADN dirigido para la integración porque el marcador seleccionable se usará también para la tolerancia mejorada a herbicidas o la resistencia mejorada a herbicidas en las plantas generadas a partir de las células de planta transformadas. Este marcador seleccionable también proporciona un sistema marcador adicional no conocido anteriormente, en particular en un campo en el que frecuentemente hay sólo un número limitado de marcadores seleccionables disponibles.

La selección transplastónica (selección de sucesos de transformación de plastidios o cloroplastos) se simplifica tomando ventaja de la sensibilidad de los cloroplastos o plastidios a la espectinomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas en plastidios o cloroplastos, pero no de la síntesis de proteínas por los ribosomas citoplásmicos codificados en el genoma nuclear. La espectinomicina evita la acumulación de proteínas de cloroplastos necesarias para la fotosíntesis y de esta manera las células de plantas transformadas resistentes a la espectinomicina pueden distinguirse basándose en su diferencia de color: las células transformadas resistentes son verdes, mientras que las células sensibles son blancas, por inhibición de la síntesis de proteínas de plastidios. La transformación de cloroplastos o plastidios con un gen *aad* bacteriano adecuado, o con un gen que codifica un ARN ribosomal funcional de plastidio o cloroplasto resistente a la espectinomicina proporciona un medio para seleccionar y mantener los sucesos transplastónicos (Maliga, Trends in Biotechnology 11: 101-106, 1993).

Se contempla además que las combinaciones de marcadores identificables o seleccionables serán útiles para la identificación de células transformadas. En algunos tipos de células o tejidos un agente de selección, tal como el glifosato o la kanamicina, puede no proporcionar suficiente actividad para matar para reconocer claramente las células transformadas o puede causar inhibición no selectiva sustancial de los transformantes y también de los no transformantes, causando de esta manera que la técnica de selección no resulte eficaz. Se propone que la selección con un compuesto de inhibición de crecimiento, tal como glifosato en concentraciones inferiores a las que causan el 100% de inhibición seguida por la selección de los tejidos en crecimiento para la expresión de un gen marcador seleccionable tal como la kanamicina permitirá recuperar transformantes de tipos de células o tejidos que no son susceptibles de selección solos. Se propone que las combinaciones de selección e identificación pueden permitir identificar transformantes en una diversidad más amplia de tipos de células y tejidos. La disponibilidad de las transacilasas de la presente invención puede obviar la necesidad de combinar selección e identificación al proporcionar otro medio de selección.

El desarrollo o regeneración de plantas a partir de protoplastos de plantas únicos o diversos explantes es bien conocido en la técnica (Weissbach and Weissbach, 1988). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye típicamente las etapas de selección de las células transformadas, cultivando las células individualizadas a través de las etapas usuales del desarrollo embrionario a través de la etapa de la plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan posteriormente en un medio de crecimiento de plantas adecuado tal como tierra.

El desarrollo o regeneración de plantas que contienen el gen exógeno, extraño que codifica un polipéptido de interés introducido por *Agrobacterium* a partir de explantes de hojas puede alcanzarse por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica tales como los que están descritos (Horsch y col., 1985). En este procedimiento, se cultivan los transformantes en presencia de un agente de selección y en un medio que induce la regeneración de brotes en la cepa de la planta transformada como está descrito (Frale y col., 1983). En particular, la Patente de EEUU N° 5.349.124 detalla la creación de células de lechuga transformadas genéticamente y plantas resultantes de las mismas que expresan proteínas cristalinas híbridas que confieren actividad insecticida contra la larva de *Lepidopteran* a tales plantas.

Este procedimiento produce típicamente brotes dentro de los dos a cuatro meses y esos brotes se transfieren a continuación a un medio inductor de raíces adecuado que contiene el agente selectivo y un antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano. Los brotes que enraízan en presencia del agente selectivo para formar plántulas se transplantan a continuación a la tierra u otro medio para permitir la producción de raíces. Estos procedimientos varían dependiendo de la cepa particular de planta utilizada, siendo tales variaciones bien conocidas en la técnica.

De preferencia, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigotas, o se cruza el polen obtenido de las plantas regeneradas con plantas crecidas de semillas de líneas endogámicas de preferencia, agrónomicamente importantes. En cambio, el polen de las plantas de esas líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una forma de realización, una planta transgénica de esta invención tiene por consiguiente una cantidad aumentada de una región codificadora que codifica un polipéptido de AMPA transacilasa que también puede expresarse junto con un péptido dirigido a plastidio. Una planta transgénica de preferencia i un segregante independiente y puede transmitir ese gen y su actividad a su progenie. Una planta transgénica de más preferencia es homocigota para ese gen, y transmite ese gen a toda su descendencia en la unión sexual. La semilla de una planta transgénica puede cultivarse en

el campo o en invernadero, y las plantas transgénicas sexualmente maduras resultantes se autopolinizan para regenerar plantas reproductoras verdaderas. La progenie de estas plantas se convierte en líneas reproductoras verdaderas en las que se evalúa la expresión del transgén de transacilasa así como la tolerancia mejorada al herbicida, en particular cuando el transgén de transacilasa se coexpresa con un gen que codifica una enzima GOX.

Los genes y las aciltransferasas según el tema de la invención incluyen no sólo las secuencias de longitud total desveladas en el presente documento sino también fragmentos de estas secuencias, o proteínas de fusión, que retienen la actividad protectora frente al herbicida mejorada característica de las secuencias ejemplificadas específicamente en el presente documento.

Resultará evidente para un experto en la técnica que los genes y péptidos de AMPA transacilasas pueden identificarse y obtenerse a través de varios medios. Los genes específicos, o porciones de los mismos, pueden obtenerse de un depósito de cultivos, o pueden construirse de manera sintética, por ejemplo, por medio del uso de una máquina de genes. Las variaciones de estos genes pueden construirse fácilmente usando técnicas convencionales para realizar mutaciones puntuales. También, pueden generarse fragmentos de estos genes usando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles según los procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden usarse enzimas tales como *Bal31* o mutagénesis dirigida a sitio para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. También, pueden obtenerse genes que codifican fragmentos activos usando una diversidad de otras enzimas de restricción. Pueden usarse proteasas para obtener directamente fragmentos activos de tales transacilasas.

Las AMPA transacilasas equivalentes y/o los genes que codifican estas transacilasas pueden también aislarse de cepas de *E. coli* y/o de bibliotecas de ADN usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos para las transacilasas desvelados y reivindicados en el presente documento para identificar y aislar otras transacilasas de una mezcla de proteínas. Específicamente, pueden generarse anticuerpos para las transacilasas desveladas en el presente documento y usarse para identificar específicamente AMPA transacilasas equivalente por inmunoprecipitación, inmunopurificación en columna, inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), o transferencia Western.

Otro procedimiento para identificar los péptidos y genes del tema de la invención es a través del uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos que tienen un marcador detectable. Como se sabe bien en la técnica, si la molécula de la sonda y las secuencias en una muestra de ácido nucleico diana hibridan formando un enlace fuerte entre las dos moléculas, puede asumirse de manera razonable que la sonda y la molécula diana contienen secuencias de polinucleótidos esencialmente idénticas. El marcador detectable de la sonda proporciona un medio para determinar de una manera conocida si se ha producido la hibridación. Tal análisis de sondas proporciona un procedimiento rápido para identificar genes de AMPA transacilasas del tema de la invención.

Los segmentos de nucleótidos que se usan como sondas según la invención pueden sintetizarse por medio del uso de sintetizadores de ADN usando procedimientos convencionales. En el uso de segmentos de nucleótidos como sondas, la sonda particular se marca con cualquier marcador adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluidos marcadores radiactivos y no radiactivos. Los marcadores radiactivos incluyen  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , o similares. Una sonda marcada con un isótopo radiactivo puede construirse a partir de una secuencia de nucleótidos complementaria a la muestra de ADN por una reacción de traducción de mellas convencional, usando una ADNasa y ADN polimerasa. A continuación pueden combinarse la sonda y la muestra en una disolución de tampón de hibridación y mantenerse a una temperatura adecuada hasta que se produzca el apareamiento. A continuación, se eliminan los materiales extraños de la membrana por lavado, dejando la muestra y las moléculas de sonda unidas detectadas y cuantificadas típicamente por autorradiografía y/o conteo de centelleo en líquido.

Los marcadores no radiactivos incluyen, por ejemplo, ligandos tales como biotina y tiroxina, así como enzimas tales como hidrolasas y peroxidases, o los diversos compuestos quimioluminiscentes tales como la luciferina, o compuestos fluorescentes como la fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, y sus derivados y similares. La sonda puede también marcarse en ambos extremos con diferentes tipos de marcadores para facilitar la separación, como por ejemplo, usando un marcador isotópico en el extremo mencionado anteriormente y un marcador de biotina en el otro extremo, o con diferentes emisores fluorescentes que tienen espectros de absorción y emisión solapados.

La formación y estabilidad del dúplex depende de la complementariedad sustancial entre las dos hebras de un híbrido y, como se indicó anteriormente, puede tolerarse un cierto grado de apareamiento erróneo. Por consiguiente, las sondas del tema de la invención incluyen mutaciones (simples y múltiples), deleciones, inserciones de las secuencias descritas, y sus combinaciones, en las que dichas mutaciones, deleciones e inserciones permiten formar híbridos estables con el polinucleótido diana de interés. Las mutaciones, inserciones y deleciones pueden producirse en una secuencia de polinucleótidos dada de muchas maneras, por medio de procedimientos actualmente conocidos por los expertos en la técnica, y tal vez por medio de otros procedimientos que podrán conocerse en el futuro.

Las variaciones potenciales en las sondas presentadas se deben, en parte, a la redundancia del código genético. Por la redundancia del código genético, puede usarse más de un triplete de nucleótidos codificante (codón) para la mayoría de los aminoácidos usados para generar proteínas. Por consiguiente diferentes secuencias de nucleótidos pueden codificar un aminoácido particular. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de la AMPA transacilasa de *E. coli* y el péptido, y los péptidos dirigidos a plastidios y los polinucleótidos que los codifican, pueden prepararse por medio de secuencias de nucleótidos equivalentes que codifican la misma secuencia de aminoácidos de la proteína o del

péptido. Por consiguiente, el tema de la invención incluye tales secuencias de nucleótidos equivalentes. También, las secuencias inversas o complementarias son un aspecto del tema de la invención y un experto en la técnica puede prepararlas fácilmente. Además se ha mostrado que las proteínas de estructura y función identificadas pueden construirse cambiando la secuencia de aminoácidos si tales cambios no alteran la estructura secundaria de la proteína (Kaiser and Kezdy, 1984). Por consiguiente, el tema de la invención incluye mutantes de la secuencia de aminoácidos representada en el presente documento que no alteran la estructura secundaria de la proteína, o si se altera la estructura, la actividad biológica se mantiene sustancialmente. Además, la invención también incluye mutantes de organismos que hospedan todo o parte de un gen que codifica una AMPA aciltransferasa y/o un gen que codifica un péptido dirigido a plastidios, como se analiza en la presente invención. Tales mutantes pueden generarse por medio de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse irradiación UV para preparar mutantes de organismos huésped. Asimismo, tales mutantes pueden incluir células huésped asporógenas que pueden también prepararse por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica.

La mutagénesis específica de sitio o dirigida a sitio es una técnica útil en la preparación de péptidos útiles, individuales, nuevos y únicos, o proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, a través de la mutagénesis específica de los genes estructurales que codifican tales péptidos. La técnica proporciona además una capacidad lista para preparar y probar variantes de secuencias alterando la secuencia codificadora de un gen, por ejemplo, introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el ADN con el objeto de crear una secuencia de reconocimiento de escisión de endonucleasas de restricción útil o nueva con el objeto de alterar la secuencia codificadora para que los codones del gen y el porcentaje de G/C representen los más comúnmente usados por un género o especie particular. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutaciones por delección, inserción o reemplazo a través del uso de secuencias de oligonucleótidos de mutagénesis específicas que comprenden la secuencia del ADN de la mutación deseada. Los oligonucleótidos de mutagénesis proporcionan típicamente una secuencia cebadora de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados del sitio de mutación diana deseado. Típicamente, resulta de preferencia un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, solapando aproximadamente 5 a 10 residuos en cada lado del sitio de mutación diana deseado.

En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en la técnica, como lo ejemplifican diversas publicaciones. Como podrá apreciarse, la técnica utiliza típicamente un vector de fago que existe tanto en la forma de hebra única como de doble hebra. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida a sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles en el comercio y su uso es por lo general bien conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos de doble hebra también se utilizan de manera rutinaria en la mutagénesis dirigida a sitio, y con frecuencia contienen un origen de replicación de fago filamentoso que, en presencia de un fago ayudante permite la síntesis de ADN de hebra única a partir del vector del plásmido.

En general, la mutagénesis dirigida a sitio de acuerdo con el presente documento se realiza obteniendo en primer lugar un vector de hebra única o separando dos hebras de un vector de doble hebra que incluye dentro de su secuencia un sitio de mutación diana. Un cebador de oligonucleótidos de mutagénesis que lleva la secuencia mutante deseada se prepara por lo general sintéticamente. El cebador de mutagénesis se hibrida a continuación con el vector de hebra única en el sitio de mutación diana, y se somete a las enzimas de polimerización de ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa 1 de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Por consiguiente, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia original no mutada y la segunda hebra lleva la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa a continuación para transformar células adecuadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyen vectores recombinantes que contienen la mutación representada por la secuencia del cebador de mutagénesis.

La preparación de variantes de secuencias de los segmentos de ADN que codifican el péptido seleccionado usando mutagénesis dirigida a sitio se proporciona como un medio para producir especies potencialmente útiles y no pretende ser limitante ya que hay otras maneras en las que pueden obtenerse variantes de secuencias de péptidos y las secuencias de ADN que los codifican. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican la secuencia del péptido deseado pueden tratarse con agentes mutagénicos, tales como la hidroxilamina, para obtener variantes de secuencias. Tales procedimientos pueden cambiar de manera favorable las características bioquímicas y biofísicas de las proteínas o su modo de acción. Éstas incluyen, pero no se limitan a: 1) mejor formación de AMPA transacilasa, 2) mejor estabilidad de la proteína o degradación por proteasas reducida, 3) mejor reconocimiento y unión al sustrato, 4) mejor cinética enzimática, y 5) mejor formación de N-acil-AMPA por cualquiera o todas las razones expuestas anteriormente.

Pueden realizarse modificaciones y cambios en la estructura de los péptidos de la presente invención y en los segmentos de ADN que los codifican y aún obtener una molécula funcional que codifica una proteína o péptido con las características deseables. Los péptidos, polipéptidos, y proteínas equivalentes biológicamente funcionales contemplados en el presente documento deben tener al menos desde aproximadamente 40% hasta aproximadamente 65% de similitud de secuencia, de preferencia desde aproximadamente 66% hasta aproximadamente 75% de similitud de secuencia, de más preferencia desde aproximadamente 76% hasta aproximadamente 85% de similitud, y de mayor preferencia desde aproximadamente 86% hasta aproximadamente 90% o más similitud de secuencia con la secuencia, o el resto correspondiente dentro, de las secuencias de aminoácidos de AMPA aciltransferasa desveladas en el presente documento.

El siguiente es un análisis basado en el cambio de aminoácidos de una proteína para crear una molécula de segunda generación, equivalente, o incluso mejorada. En formas de realización de la invención particulares, se contempla que

las proteínas mutadas de AMPA transacilasa son útiles para mejorar o potenciar la expresión de la proteína *in planta*, y por consiguiente aumentar o mejorar la actividad de la AMPA transacilasa y/o la expresión del transgén recombinante en una célula de planta. Los cambios de aminoácidos pueden lograrse cambiando los codones de la secuencia de ADN, según los codones dados en la Tabla 1, en dicotiledóneas, y más particularmente en plantas monocotiledóneas.

TABLA 1

| Aminoácido      |     |   | Codones |     |     |     |     |     |
|-----------------|-----|---|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Alanina         | Ala | A | GCA     | GCC | GCG | GCU |     |     |
| Cisteína        | Cys | C | UGC     | UGU |     |     |     |     |
| Ácido aspártico | Asp | D | GAC     | GAU |     |     |     |     |
| Ácido glutámico | Glu | E | GAA     | GAG |     |     |     |     |
| Fenilalanina    | Phe | F | UUC     | UUU |     |     |     |     |
| Glicina         | Gly | G | GGA     | GGC | GGG | GGU |     |     |
| Histidina       | His | H | CAC     | CAU |     |     |     |     |
| Isoleucina      | Ile | I | AUA     | AUC | AUU |     |     |     |
| Lisina          | Lys | K | AAA     | AAG |     |     |     |     |
| Leucina         | Leu | L | UUA     | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| Metionina       | Met | M | AUG     |     |     |     |     |     |
| Asparagina      | Asn | N | AAC     | AAU |     |     |     |     |
| Prolina         | Pro | P | CCA     | CCC | CCG | CCU |     |     |
| Glutamina       | Gln | Q | CAA     | CAG |     |     |     |     |
| Arginina        | Arg | R | AGA     | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| Serina          | Ser | S | AGC     | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| Treonina        | Thr | T | ACA     | ACC | ACG | ACU |     |     |
| Valina          | Val | V | GUA     | GUC | GUG | GUU |     |     |
| Triptofano      | Trp | W | UGG     |     |     |     |     |     |
| Tirosina        | Tyr | Y | UAC     | UAU |     |     |     |     |

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de anticuerpos de unión a antígenos o sitios de unión en moléculas de sustratos. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína son las que definen la actividad biológica funcional de la proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína, y, por supuesto, su secuencia de ADN codificadora subyacente, y no obstante obtenerse una proteína con propiedades análogas. Por consiguiente está contemplado por el autor de la invención que puedan realizarse diversos cambios en las secuencias de péptidos de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Al realizar tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína es conocida generalmente en la técnica (Kyte and Doolittle, 1982.).

Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su carácter hidrófobo y sus características de carga (Kyte and Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen índice o puntuación hidropático similar y aún dar lugar a una proteína con actividad biológica similar, es decir aún obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar tales cambios, resulta de preferencia la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , son particularmente de preferencia los que están dentro de  $\pm 1$ , y aún más particularmente de preferencia los que están dentro de  $\pm 0,5$ .

También se sabe en la técnica que la sustitución de aminoácidos análogos puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofiliía. La Patente de EEUU N° 4.554.101 establece que la mayor hidrofiliía promedio local de una proteína, según está determinada por la hidrofiliía de sus aminoácidos adyacentes, está correlacionada con una propiedad biológica de la proteína.

5 Como está detallado en la Patente de EEUU N° 4.554,101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliía a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5);  
10 cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4).

Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofiliía similar y aún obtenerse una proteína biológicamente equivalente, y en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliía están dentro de ± 2 resulta de preferencia, son particularmente  
15 de preferencia los que tienen valores dentro de ± 1, y son aún más particularmente de preferencia los que tienen valores dentro de ± 0,5.

Como se resumió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan por consiguiente generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliía, carga, tamaño y similar. Los ejemplos de sustituciones que tienen en consideración diversas de las características anteriores son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Los expertos en la técnica saben que los polinucleótidos que codifican proteínas heterólogas, con frecuencia se expresan pobremente cuando se incorporan en el ADN nuclear de las planta transgénicas (revisado por Diehn y col., 1996). De preferencia, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga de interés se diseña esencialmente como está descrito en las Patentes de EEUU N° 5.500.365 y 5.689.052 (cada una incorporada específicamente en el presente documento por referencia). Los ejemplos de secuencias de nucleótidos útiles para la expresión incluyen pero no se limitan a, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 19.  
30

Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia fundamental del polipéptido pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido que se presenta naturalmente. Los aminoácidos pueden dividirse en los siguientes cuatro grupos: (1) aminoácidos ácidos; (2) aminoácidos básicos; (3) aminoácidos polares neutros; y (4) aminoácidos no polares neutros. Los aminoácidos representativos dentro de estos diversos grupos incluyen, pero no se limitan a: (1) aminoácidos ácidos (cargados negativamente) tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico; (2) aminoácidos básicos (cargados positivamente) tales como la arginina, histidina y lisina; (3) aminoácidos polares neutros tales como la glicina, serina, treonina, cisteína, cistina, tirosina, asparagina y glutamina; (4) aminoácidos no polares (hidrófobos) neutros tales como la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano y metionina.  
40

Los cambios conservadores de aminoácidos dentro de una secuencia fundamental del polipéptido pueden realizarse sustituyendo un aminoácido dentro de uno de estos grupos con otro aminoácido dentro del mismo grupo. La secuencia de nucleótidos codificadora (gen, ADN de plásmido, ADNc, o ADN sintético) tendrá por consiguiente sustituciones de bases correspondientes, que le permiten codificar formas equivalentes biológicamente funcionales de una AMPA transacilasa.  
45

Los siguientes ejemplos describen formas de realización de preferencia de la invención.

En los ejemplos todos los porcentajes se dan en peso a menos que se indique de otra manera.

## 50 Ejemplos

### Ejemplo 1

55 Este ejemplo ilustra los efectos inhibidores del crecimiento del ácido N-acetil-aminometil fosfónico (AMPA) en tejido de callo de plantas, y la falta de inhibición de N-acetil-aminometil fosfónico en el tejido de callo de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*.

Ciertas especies de plantas recombinantes que expresan un gen de GOX bacteriano, y que también se expusieron al glifosato, pueden exhibir efectos fitotóxicos manifestados a través de síntomas tales como clorosis, corte de la flor, y fertilidad reducida. La base para estos síntomas no se ha determinado previamente. Estudios previos indicaron que las plantas que expresan GOX metabolizaban el glifosato a AMPA y glioxilato (Patente de EEUU N° 5.463.175). El glioxilato se metaboliza rápidamente por las plantas, sin embargo el AMPA persiste en los tejidos de las plantas y puede ser la causa de los efectos fitotóxicos tales como la clorosis, atrofas, u otros efectos no deseables. Se ha mostrado previamente que la especie LBAA de *Achromobacter* fue capaz de modificar enzimáticamente AMPA a N-acetil AMPA (Patente de EEUU N° 5.463.175). Los datos de *Achromobacter*, junto con los datos de fitotoxicidad de la planta, indicaron que la N-acilación del AMPA *in planta* puede proporcionar alivio eficaz de la clorosis y otros efectos no deseables. Por consiguiente, se expuso el tejido de callo del tabaco a AMPA y a N-acetil AMPA para determinar si  
65

## ES 2 325 874 T3

alguno de estos compuestos exhibía efectos citotóxicos similares a los observados en las plantas que expresan GOX y se exponen al glifosato.

5 Se generaron callos de tabaco a partir de partes de hojas de tabaco *Nicotiana tabacum* variedad "Samsun" de tipo salvaje en placas de MS104 (sales MS 4,3 g/l, sacarosa 30 g/l, vitaminas B5 500X 2 ml/l, NAA 0,1 mg/l, y Bacto Agar 1,0 mg/l). Se aplicó el tejido de los callos a placas con o sin AMPA y con o sin N-acetil AMPA. Las placas contenían AMPA o N-acetil AMPA en concentraciones de 0,1 mM o 0,4 mM. Las placas se incubaron durante hasta tres semanas y se controlaron periódicamente.

10 El tejido de los callos en las placas de control que no contenían AMPA o N-acetil AMPA creció a velocidades normales, regenerando raíces y brotes como se esperaba. El tejido de los callos en presencia de AMPA se inhibió de manera importante. No se observó crecimiento, mostrando el efecto fitotóxico del AMPA en estas concentraciones. El tejido de los callos no se inhibió en las placas que contenían N-acetil AMPA, y formó raíces y brotes similares al crecimiento del tejido de los callos de control. Este resultado indicó que el AMPA, como un subproducto del metabolismo del glifosato mediado por GOX, podía ser responsable de la fototoxicidad observada en las plantas. Este resultado también indicó la posibilidad de un procedimiento mejorado para seleccionar plantas a partir del tejido de callos transformado genéticamente, así como un posible procedimiento para mejorar la resistencia al herbicida glifosato.

### 20 Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra que la degradación del glifosato por hidrólisis por medio de la enzima GOX en la cepa LBAA de la bacteria de *Achromobacter* sp. da como resultado la producción de AMPA y N-acetil AMPA.

25 Se ha mostrado previamente que la degradación del glifosato mediada por GOX producía glioxilato y AMPA (Barry y col., Patente de EEUU N° 5.463.175). También se mostro que la cepa LBAA de *Achromobacter* sp. produce AMPA y glioxilato como un resultado de la degradación del glifosato. La vía de la degradación del glifosato se caracterizó en células en reposo la de cepa LBAA de *Achromobacter* sp. cultivadas con glifosato según el siguiente procedimiento. Se recogieron células de un cultivo de LBAA de 100 ml, cultivadas en un medio DF3S conteniendo glucosa, gluconato y citrato como fuentes de carbono y con tiamina y Extracto de Levadura (0,01%) para suministrar los requerimientos de trazas y con glifosato 0,2 mM como una fuente de fósforo, a una densidad celular de 200 unidades Klett, se lavaron dos veces con 20 ml de medio DF3S y se resuspendió el equivalente de 20 ml de células en 100 l del mismo medio que contenía [<sup>14</sup>C]glifosato (2,5 ml de 52 mCi/mmol, Amersham; CFA.745). La mezcla de células se incubó a 30°C con agitación y se retiraron muestras de 20 ml en diversos intervalos. Las muestras se centrifugaron para separar las células del sobrenadante de caldo. El sobrenadante y el sedimento celular se analizaron mediante HPLC.

Las muestras preparadas de esta manera se analizaron por HPLC de intercambio de aniones fuertes (SAX) con detección del marcador de radioisótopo para determinar sus niveles de [<sup>14</sup>C]-AMPA y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Las muestras se inyectaron usando un autoinyector WISP Waters. Los perfiles cromatográficos y los datos cuantitativos se recogieron usando MACS2, el sistema de recogida de datos cromatográficos automatizado de Monsanto. Para los análisis se usó una columna de SAX Spherisorb S5, de 250 mm X 10 mm, o una columna de SAX de Alltech de 5 micrones, de 250 mm X 10 mm. Los disolventes usados se denominaron disolución A y disolución B. La disolución A contenía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,005 M ajustado hasta pH 2,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en metanol al 4%. La disolución B contenía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,10 M ajustado hasta pH 2,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en metanol al 4%. El tiempo de procesamiento de cada muestra estaba constituido por un programa de gradientes de etapas con un caudal del eluyente de 3 ml por minuto y un caudal del líquido de centelleo (marca registrada ATOMFLOW,° NEN-995 obtenido de Packard Instruments) de 9 ml por minuto. El perfil del disolvente de HPLC para distinguir [<sup>14</sup>C]-AMPA de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA en cada muestra analizada estaba representado por el disolvente A al 100% en el tiempo cero hasta los 5 minutos, a continuación el disolvente B al 100% a los 5 minutos hasta 15 minutos, a continuación el disolvente A al 100% hasta 20 minutos, momento en el que la columna se prepara para recibir otra muestra.

Primero se resuspendieron los sedimentos celulares en medio DF3S acidificado mediante la adición de HCl 0,65 N, se hirvió durante 5 minutos, a continuación se centrifugó brevemente para proporcionar una fase de disolución para el análisis por HPLC. Los sobrenadantes se trataron de manera similar previo al análisis por HPLC. También se sometió un control de glifosato acidificado al análisis por HPLC, y se determinó el tiempo de retención (TR) del glifosato en 10,8 minutos. La cantidad de radiactividad en el pico del glifosato que permaneció en el sobrenadante tras dos horas de incubación disminuyó hasta aproximadamente el 33% de los niveles iniciales, indicando que el glifosato se había metabolizado de manera extensa. Se encontró que aproximadamente el 3% del glifosato estaba dentro de la célula. El material que coeluyó con el patrón de metilamina con un TR de 6 minutos explicó aproximadamente el 5% de la cantidad de radiactividad inicial en el sobrenadante y aproximadamente el 1,5% de la cantidad de radiactividad inicial identificada en el contenido celular.

La vía de la degradación del glifosato mediada por GOX se dilucidó además en un experimento posterior donde se comparó el metabolismo de [<sup>14</sup>C]AMPA con el de [<sup>14</sup>C]glifosato como se indicó anteriormente en las células restantes recogidas a 165 unidades Klett y resuspendidas en el equivalente de 15 ml de células por 100 ml de medio DF3S. Las muestras se analizaron por HPLC y estaban constituidas por cultivos compuestos acidificados y tratados como se describió anteriormente. Se encontró que los cultivos expuestos a [<sup>14</sup>C]glifosato durante dos horas tenían 25% del

marcador en el pico de metilamina/N-metilamina con un tiempo de retención de 14,7 minutos, 12,5% como AMPA con un tiempo de retención de 6 minutos, 30% en un pico con un tiempo de retención de 13,2 minutos, y 30% como glifosato con un tiempo de retención de 10,8 minutos. El análisis de los cultivos expuestos a [<sup>14</sup>C]-AMPA durante dos horas indicó que el 15% del marcador se encontraba como N-acetil-metilamina/metilamina, 59% como AMPA, y 18% en el pico de 13,2 minutos. El material eluido a los 13,2 minutos se identificó como N-acetil-AMPA por espectrometría de masas por electrovaporización de iones negativos. El resultado mostró iones fuertes en m/e 152 y m/e 154, como se esperaba para este compuesto, que tiene un peso molecular de 153 Dalton. El ión m/e 154 fue por el átomo isotópico <sup>14</sup>C. N-acetil-metil-[<sup>14</sup>C]-AMPA surge de N-metil-[<sup>14</sup>C]-AMPA, que es una impureza conocida en las preparaciones de [<sup>14</sup>C]-AMPA.

Estos datos indicaron que la vía de la degradación del glifosato en la cepa LBAA de *Achromobacter* tiene lugar a partir de la hidrólisis del glifosato a AMPA, que se convierte a continuación en los productos metilamina presumiblemente a través de una etapa de desfosforilación, y N-acetil-AMPA presumiblemente a través de alguna etapa de transacilación previamente desconocida. Una pequeña cantidad de N-acetil-AMPA se convierte a continuación en N-acetil-metilamina. Se ha inferido una etapa de acilación similar a partir de los productos identificados en *E. coli* cuando se utilizan aminometilfosfonatos como única fuente de fosfato (Avila y col., 1987).

### Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la identificación de una actividad AMPA aciltransferasa en *E. coli*.

Avila y col. (1987) identificaron productos de biodegradación desfosforilados a partir del metabolismo de una diversidad de sustratos aminofosfonato usados como única fuente de fosfatos *in vivo* en *E. coli* mientras estudiaban la escisión del enlace C-P. Sus estudios indicaron que AMPA no era un sustrato para acilación en *E. coli* K-12. Además, Avila y col. estaban interesados en el efecto de sustituciones químicas unidas a N en la escisión del enlace C-P de los fosfonatos en *E. coli*, e identificaron productos N-acetilados derivados del metabolismo de algunos aminofosfonatos. Avila y col. también demostraron que las cepas K12 de *E. coli* “de tipo salvaje”, a diferencia de las cepas de *E. coli* B de tipo salvaje, eran incapaces de usar fosfonatos como una fuente de fosfato. Por consiguiente, considerando los efectos fitotóxicos de AMPA en el tejido de callos como se mostró en el Ejemplo 1 y la generación de AMPA a partir de la degradación del glifosato mediada por GOX como se mostró en el Ejemplo 2, los datos de *E. coli* en Avila y col. indicaron que podría haber una enzima o una vía presente en algunas especies bacterianas que es capaz de convertir el aminometilfosfonato (AMPA) en N-acetil-AMPA. Una enzima o vía con esas características conferirá, si se expresa en las plantas, una ventaja significativa a las plantas que expresan GOX cuando se tratan con glifosato.

Para probar esto, se cultivó una cepa K-12 de *E. coli* adaptada para crecer en AMPA en un medio conteniendo bajo fosfato para obtener lisados celulares para ensayar la presencia de una enzima de N-acilación de AMPA. El operón *phn* (*mpu*) es crítico en *E. coli* K-12 por una inserción de 8 pares de bases que causa una mutación de cambio de marco en el gen *phnE*. El cambio de marco inactiva *phnE* y crea un efecto polar en la traducción de otros genes secuencia abajo de *phnE* dentro del operón, que da lugar a la incapacidad de tales mutantes para usar los fosfonatos como fuentes de fosfato (Makino y col., J. Bacteriol. 173: 2665-2672, 1991). La selección de una mutación obtenida de manera espontánea restablece la función del operón *phn* (*phn+* o *mpu+*). Por consiguiente, las cepas K-12 adaptadas para crecer en AMPA, metil-fosfonato, o etil-fosfonato contienen tales mutaciones eficaces obtenidas espontáneamente.

Brevemente, se plaqueó una alícuota de un cultivo de cepa K-12 de *E. coli* JM101 (*mpu-*) en caldo L fresco en medio de agar completo MOPS (Neidhardt y col., 1974) conteniendo aminoácidos en una concentración de 25 mg/ml, vitamina B1 [tiamina] a 10 mg/ml, glucosa al 0,2%, y agar DIFCO “Purificado” al 1,5% junto con aminometilfosfonato (AMPA; 0,2 mM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como la única fuente de fosfato, y se incubó a 37°C durante tres días. Las colonias surgidas en este medio se seleccionaron y se sembraron en agar completo MOPS conteniendo AMPA o metilfosfonato (Alfa) como la única fuente de fosfato. Se eligió una colonia, denominada *E. coli* JM101 *mpu+*, de las que crecieron de manera uniforme e igual en ambos medios que contenían fosfonato, y se denominó posteriormente cepa GB993 de *E. coli*.

El operón *phn* se induce cuando *E. coli* se cultiva en un medio que carece o tiene limitada la fuente de fosfato. Por consiguiente, *E. coli* GB993 se comparó con la cepa JM101 original cuando creció en medio MOPS mínimo. GB993 y su cepa original *mpu-*, JM101, se cultivaron bajo condiciones idénticas, variando solamente la cantidad de fosfato disponible o suplementado con AMPA. Se hicieron crecer cultivos de 50 ml por duplicado en matraces Erlenmeyer con entrada lateral de 250 ml con agitación continua a 37°C en medio MOPS (5 ml de 10 X sales MOPS, 0,5 ml de tiamina 1 mg/ml, 0,5 ml de glucosa al 20%, hasta 50 ml con H<sub>2</sub>O destilada) conteniendo fosfato 0,1 ó 5 mM, o fosfato 0,1 mM suplementado con AMPA 0,2 mM, pH 7,0. Los cultivos crecieron en general hasta aproximadamente 220 unidades Klett y se sedimentaron las células por centrifugación, se resuspendieron en 1,5 ml de Tris 10 mM/DTT 1 mM, y se lisaron con dos pasajes a través de una prensa francesa a 68,96 bares (1.000 psi). Los lisados se centrifugaron para eliminar desechos y se hizo pasar el sobrenadante a través de una columna G-50 equilibrada con Tris 50 mM pH 7,0. La Tabla 2 muestra los resultados de los cultivos celulares cultivados de esta manera.

TABLA 2

Efectos del sustrato de fosfato en el cultivo celular

|  | Cepa              |                 |                |                   |                 |                |
|--|-------------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------|
|  | JM101             | JM101           | JM101          | GB993             | GB993           | GB993          |
|  | Fosfato<br>0,1 mM | Fosfato<br>5 mM | AMPA<br>0,2 mM | Fosfato<br>0,1 mM | Fosfato<br>5 mM | AMPA<br>0,2 mM |
| Período de crecimiento<br>(horas)        | 48                | 29              | 54             | 48                | 29              | 54             |
| Densidad de recogida<br>(Unidades Klett) | 155               | 240             | -              | 140               | 244             | 185            |

- indica crecimiento no medible

Se usó un ensayo de HPLC para determinar la presencia o ausencia de cualquier actividad AMPA aciltransferasa en el medio y en los lisados celulares. El ensayo controla la conversión de [<sup>14</sup>C] AMPA en N-acetil-[<sup>14</sup>C] AMPA. Generalmente, se mezclaron 100  $\mu$ l de una disolución de ensayo 2X constituida por 16,5 mg de acetil-CoA, 250  $\mu$ l de Tris 2M, pH 7,5, 4,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada y [<sup>14</sup>C]AMPA (30 mM) con 25-75  $\mu$ l de lisado y 1  $\mu$ l de cada uno de MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub> 0,5 M, y se llevó hasta 200  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O destilada. Se incubó el ensayo durante 30 minutos a 37°C y se extinguió con 200  $\mu$ l de NaOAc (acetato de sodio) 90-100 mM, pH 4,4 en etanol y a continuación se analizó inmediatamente por HPLC como se describió anteriormente, o se almacenó at -20°C. Sólo las muestras de lisado de GB993 derivadas de cultivos crecidos en presencia de AMPA o medio suplementado con fosfato 0,1 mM demostraron actividad AMPA aciltransferasa apreciable. Este resultado indica que estaba presente un gen que codifica una enzima aciltransferasa capaz de N-acilación de AMPA en GB993 y se regulaba para expresión cuando el crecimiento se producía en condiciones de bajo fosfato. Por consiguiente, la secuencia codificadora para la actividad enzimática parece ser parte del regulón *pho* y puede residir en el operón *phn*.

## Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la identificación de un gen del operón *phn* de *E. coli* que codifica una enzima capaz de acilar AMPA.

El Ejemplo 3 indicó que la actividad AMPA aciltransferasa observada en los lisados de *E. coli* puede estar codificada por un gen en el operón *phn*. El operón *phn* entero en *E. coli* B y en *E. coli* K12 se había clonado y secuenciado previamente (Wanner y col., Chen y col.). Se ha mostrado que la secuencia de ADN del operón *phn* de *E. coli* K-12 es idéntica a la secuencia de ADN publicada del operón *phn* de *E. coli* B con excepción de una inserción de ocho pares de bases en el gen *phnE* (Wanner y col.). Los clones que contienen diversas cantidades de los genes de operón *phn* de cualquier fondo genético bacteriano están disponibles fácilmente (Wanner y col., Chen y col., Dr. J. W. Frost en la Universidad Purdue). Los plásmidos que contienen diferentes cantidades del ADN del operón *phn* de JM101 se usaron para transformar JM101 (*mpu*-) para probar un gen *phn* localizado en un plásmido que, cuando se expresa, confiere a JM101 la capacidad para utilizar AMPA como una única fuente de fosfato.

Un plásmido obtenido de J. Frost (Dr. J. W. Frost, Departamento de Química, Universidad Purdue, West Lafayette, Indiana 47907), denominado en el presente documento como pF, contiene un fragmento de *EcoRI* de 8 kb de *E. coli* K-12 que codifica los genes del operón *phn* *phnG* hasta *phnQ*. Un único sitio *NcoI* está presente en el extremo 5' de la región que codifica *phnG*. Se digirió el plásmido pF con *EcoRI* y *NcoI*, liberando un fragmento de *NcoI-EcoRI* de 2 kb que contiene los genes *phnG* hasta *phnI*, y un segundo fragmento de *NcoI-EcoRI* de una longitud de aproximadamente 6 kb que contiene los genes *phnJ* hasta *phnQ*. Cada fragmento se purificó con gel y se unió en un vector de clonación y expresión en una orientación que permitirá la expresión de los genes del operón de *phn* presentes dentro de cada uno de los fragmentos de *NcoI-EcoRI* de un promotor inducible transportado por el plásmido. El fragmento de 2 kb se insertó en los sitios *NcoI-EcoRI* dentro del vector pMON7258, un vector de clonación de selección positiva idéntico a pUC118 con la excepción del dominio policonector (Viera y col., Methods Enzymol. 153: 3, 1987), siendo denominado el plásmido resultante p58-1. La orientación del fragmento de 2 kb en p58-1 permite la expresión de los genes *phnG-phnI* a partir del promotor lac dentro del vector. El fragmento de *NcoI-EcoRI* de 6 kb se insertó en los sitios de *NcoI* y *EcoRI* en un vector de selección positiva similar, pMON7259, produciendo el plásmido denominado pMON17195. pMON7259 es idéntico a pUC119 excepto por el dominio policonector, que contiene un sitio de clonación múltiple en orientación opuesta al que está dentro de pMON7258, y que también permite la expresión de los genes *phnJ-phnQ* a partir de un promotor lac. p58-1 y pMON7259 fueron transformados en la cepa K12 (*mpu*-) de *E. coli* JM101, y se mantuvieron con selección de resistencia al antibiótico ampicilina. pMON7259 y pF también se transformaron en JM101 como controles negativo y positivo, respectivamente.

## ES 2 325 874 T3

Se hicieron crecer los cultivos de cada transformante durante la noche en medio de caldo líquido M9 suplementado con casaminoácidos al 2%, tiamina, y glucosa al 0,2% con agitación a 37°C, y se diluyeron a continuación 1:50 en 50 ml de medio fresco precalentado de la misma composición en un matraz Erlenmeyer de entrada lateral de 250 ml. Los cultivos se incubaron con agitación a 37°C hasta alcanzar un densidad celular de aproximadamente 80-100 unidades Klett según se mide en un espectrofotómetro Klett-Summerson a través de un filtro verde número 2. La expresión a partir del promotor lac del plásmido se indujo por la adición de 100 microlitros de IPTG 500 mM de manera que la concentración final de IPTG era de aproximadamente 1 mM. El período de crecimiento de la fase de inducción se dejó progresar durante dos horas. La Tabla 3 muestra el perfil de densidad celular de cada cultivo de la dilución 1:50 a través del período de inducción de dos horas.

TABLA 3

*Perfil de inducción de cultivos de JM101 que llevan diversos plásmidos phn*

| Cultivo/Plásmido | IPTG | $I_0$ | $I_1$ | $I_2$ |
|------------------|------|-------|-------|-------|
| pMON7259         | +    | 13    | 75    | 222   |
| p58-1            | +    | 15    | 70    | 212   |
| pMON             | +    | 15    | 90    | 220   |
| pF               | +    | 17    | 97    | 290   |
| pF               | -    | 15    | -     | 260   |

$I_0$  indica la densidad del cultivo celular en el punto temporal de la dilución 1:50;  $I_1$  indica la densidad del cultivo celular en el momento de adición de IPTG; e  $I_2$  indica la densidad del cultivo celular en el momento de la recogida.

Se recogieron las células en cada cultivo por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman J2. Se lavó el sedimento celular una vez en disolución de NaCl 154 mM en agua helada, y a continuación se resuspendió en 1,5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5). Las suspensiones celulares se rompieron con dos pasajes a través de una Prensa Francesa a 68,96 bares (1000 psi). Se centrifugó el lisado resultante durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C en una microcentrífuga EPPENDORF™ modelo 5402 para eliminar los desechos. Se transfirió cada lisado aclarado a un tubo nuevo previamente enfriado y se ajustó el volumen del extracto hasta 2,5 ml con Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Se equilibró una columna PD10 con 25 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y a continuación se aplicó cada muestra a la columna de desalado. Se ajustó cada muestra eluida hasta 3,5 ml con Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Se distribuyó cada muestra en tubos de ensayo y se mezcló con los reactivos para ensayar la presencia de actividad AMPA aciltransferasa como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

*Condiciones de ensayo para lisados bacterianos que expresan los genes phn*

| Muestra  | IPTG | Volumen del extracto* | Volumen de Tris 50 mM * | 2X Volumen de la Mezcla de Ensayo* | Volumen total* |
|----------|------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| pMON7259 | +    | 25                    | 75                      | 100                                | 200            |
| pMON7259 | +    | 100                   | 0                       | 100                                | 200            |
| p58-1    | +    | 25                    | 75                      | 100                                | 200            |

## ES 2 325 874 T3

TABLA 4 (continuación)

| Muestra   | IPTG | Volumen del extracto* | Volumen de Tris 50 mM * | 2X Volumen de la Mezcla de Ensayo* | Volumen total* |
|-----------|------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| p58-1     | +    | 100                   | 0                       | 100                                | 200            |
| pMON17195 | +    | 25                    | 75                      | 100                                | 200            |
| pMON17195 | +    | 100                   | 0                       | 100                                | 200            |
| pF        | +    | 25                    | 75                      | 100                                | 200            |
| pF        | +    | 100                   | 0                       | 100                                | 200            |
| pF        | -    | 25                    | 75                      | 100                                | 200            |
| pF        | -    | 100                   | 0                       | 100                                | 200            |
| -         | nd   | 0                     | 100                     | 100                                | 200            |

\*todos los volúmenes están en microlitros.

Composición de las mezclas de cada muestra, denominadas por el contenido de plásmido, como se prepararon para el ensayo de AMPA aciltransferasa.

Se incubó cada mezcla a 37°C durante 30 minutos, y se extinguió con un volumen igual (200 microlitros) de NaOAc (acetato de sodio) 90-100 mM, pH 4,4 en etanol y si no se analizó inmediatamente por HPLC como se describió anteriormente, entonces se almacenó durante la noche a -20°C. Las porciones no utilizadas de cada lisado se almacenaron a 4°C, o se mezclaron con glicerol hasta 10% en volumen, y se almacenaron a -20°C.

Se analizó la presencia de [<sup>14</sup>C]AMPA y [<sup>14</sup>C]AMPA acilado por HPLC en las muestras de cada lisado sometidas al ensayo de AMPA transacilasa, como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

*Análisis de HPLC de conversión de AMPA en Acetil-AMPA en lisado bacteriano*

| Muestra   | Acetil AMPA% | AMPA%     |
|-----------|--------------|-----------|
| pMON7259  | sin datos    | sin datos |
| pMON7259  | 8            | 92        |
| p58-1     | 5            | 95        |
| p58-1     | 13           | 87        |
| pMON17195 | 100          | 0         |
| pMON17195 | 100          | 0         |
| pF        | 61           | 39        |
| pF        | 97           | 3         |
| pF        | 52           | 48        |
| pF        | 90           | 10        |
| -         | -            | 100       |

Resultados del análisis de HPLC de cada muestra, indicando la cantidad relativa de [<sup>14</sup>C]AMPA o acetil-[<sup>14</sup>C]AMPA como un porcentaje de la cantidad total de [<sup>14</sup>C] en ambos picos combinados.

Estos datos indicaron que el plásmido que contiene el fragmento de *NcoI-EcoRI* de 6 kb aislado de pF en pMON17195 contenía uno o más genes que, tras la inducción con IPTG del promotor *lac* en una cepa *mpu-* de *E. coli*, provocó la producción de una actividad aciltransferasa capaz de convertir todo el [<sup>14</sup>C]AMPA disponible en la mezcla de ensayo en acetil-[<sup>14</sup>C]AMPA. El gen o los genes necesarios para la N-acilación de AMPA se definieron además por análisis de delección de restricción.

## ES 2 325 874 T3

Se construyeron plásmidos conteniendo diversos segmentos del operón *phn* de *E. coli* B o *E. coli* K-12 para delinear más la naturaleza del gen o genes del operón *phn* involucrados en conferir la actividad AMPA aciltransferasa cuando se expresan en una *E. coli mpu-* JM101. pMON7333 contiene la inserción de ADN de *E. coli* equivalente de pMON17195, pero en pUC119, y es un único fragmento de *Hind*III de la cepa B de *E. coli* que contiene los genes del operón *phn* de tipo salvaje *phnG* hasta *phnQ*. pMON15020 se construyó clonando un fragmento de ADN de *E. coli* B de *Nco*I hasta *Eco*RI de 5.713 pares de bases de pMON7333 en pMON7259, y contiene los genes *phnJ* hasta *phnQ*. pMON15022 se construyó insertando un fragmento de *Eco*RI hasta *Sal*I de 1.686 pares de bases de pMON17195 en el vector de expresión y clonación de selección positiva pBlueScriptSP (Invitrogen), que contiene los genes de *E. coli* K-12 *phnO*, P y Q. pMON15023 se construyó delecionando un fragmento de *Sal*I de 1.820 pares de bases de pMON17195, dejando detrás de los genes del operón *phn* de *E. coli* K-12 *phnJ* y *phnK*, el extremo 5' de *phnL*, y todo el *phnO*, P y Q.

Los plásmidos pMON17195, pMON15020, pMON15022, pMON15023, y pMON7259 se transformaron en la cepa *mpu-* de *E. coli* K-12 JM101 y se mantuvieron por selección con el antibiótico ampicilina. Los cultivos crecidos durante la noche de cada uno de estos transformantes se cultivaron con selección de antibióticos y se diluyeron 1:50 en medio M9 fresco como se describió anteriormente, y se incubaron a 37°C con agitación en matraces Erlenmeyer de entrada lateral de 250 ml hasta una densidad celular de aproximadamente 100 unidades Klett. Cada cultivo se indujo con IPTG como en el ejemplo 3, y se incubó durante otras dos horas con agitación. Las células se recogieron por centrifugación en una centrífuga Beckman J2 a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se lavaron los sedimentos celulares una vez con 50 ml de NaCl 154 mM, y se almacenaron a -20°C.

Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de extracción como en el ejemplo 3 y se rompieron por medio de dos pasajes a través de una Prensa Francesa a 68,96 bares (1000 psi). Las suspensiones celulares rotas se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5402 durante 15 minutos a 14.000 rpm y a 4°C. Los lisados aclarados se decantaron en tubo nuevos previamente enfriados en hielo, y se ajustó el volumen total hasta 2,5 ml con adición de tampón de extracción. Estas muestras se desalaron en una columna PD10 previamente equilibrada con 25 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y se eluyeron con 3,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5. A continuación se sometieron las muestras a un ensayo de AMPA acilación como se describió anteriormente, se incubaron durante 30 minutos a 37°C, y se extinguió con 200 microlitros de NaOAc 90,9 mM pH 4,4. Los volúmenes de cada muestra usada en el ensayo se indican en la Tabla 6. Todos los volúmenes representan microlitros de cada disolución usada.

TABLA 6

*Condiciones de ensayo para lisados bacterianos que expresan genes phn de plásmidos*

| Plásmido   | Extracto | Tris 50 mM | 2X Mezcla de Ensayo | Volumen total |
|------------|----------|------------|---------------------|---------------|
| -          | -        | 100        | 100                 | 200           |
| pMON 17195 | 25       | 75         | 100                 | 200           |
| pMON 17195 | 100      | -          | 100                 | 200           |
| pMON 15020 | 75       | 75         | 100                 | 200           |
| pMON 15020 | 100      | -          | 100                 | 200           |
| pMON 15022 | 75       | 75         | 100                 | 200           |
| pMON 15022 | 100      | -          | 100                 | 200           |
| pMON 15023 | 75       | 75         | 100                 | 200           |
| pMON 15023 | 100      | -          | 100                 | 200           |
| pMON 7259  | 75       | 75         | 100                 | 200           |
| pMON 7259  | 100      | -          | 100                 | 200           |

Composición de mezclas de cada muestra, denominadas por el contenido de plásmido, como se prepararon para el ensayo de AMPA aciltransferasa

Las muestras extinguidas se sometieron al análisis de HPLC como se describió anteriormente. La Tabla 7 ilustra los resultados del análisis por HPLC de cada muestra, indicando la cantidad relativa de [<sup>14</sup>C] AMPA o acetil-[<sup>14</sup>C] AMPA como un porcentaje de la cantidad total de [<sup>14</sup>C] en ambos picos combinados.

TABLA 7

Análisis por HPLC de lisados bacterianos. Conversión de [<sup>14</sup>C]-AMPA en Acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA

| Muestra    | Volumen del extracto | [ <sup>14</sup> C]-AMPA % | Acetil-[ <sup>14</sup> C]-AMPA % | % del [ <sup>14</sup> C] Total |
|------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| -          | -                    | 100                       | -                                | 100                            |
| pMON 17195 | 25                   | 66                        | 34                               | 100                            |
| pMON 17195 | 100                  | 26                        | 74                               | 100                            |
| pMON 15020 | 75                   | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 15020 | 100                  | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 15022 | 75                   | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 15022 | 100                  | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 15023 | 75                   | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 15023 | 100                  | -                         | 100                              | 100                            |
| pMON 7259  | 75                   | 87                        | 13                               | 100                            |
| pMON 7259  | 100                  | 72                        | 28                               | 100                            |

Análisis por HPLC de cada muestra, indicando la cantidad relativa de [<sup>14</sup>C] AMPA o acetil-[<sup>14</sup>C]AMPA como un porcentaje de la cantidad total de [<sup>14</sup>C] en ambos picos combinados.

Los datos en la Tabla 7 indican que la actividad de AMPA acilación deriva de los marcos de lectura abiertos del operón *phn* constituidos por *phnO*, *phnP*, y *phnQ*, que son los únicos genes *phn* presentes en pMON15022. Otros plásmidos que confieren actividad de AMPA acilación tras la inducción también contenían al menos los genes *phnO*, P, y Q, proporcionando fuerte evidencia de que la actividad observada era el resultado de uno o más de estos productos genéticos. Por consiguiente, se construyeron otros plásmidos basándose en las secuencias de los genes *phnO*, P, y Q para determinar qué gen o genes eran necesarios para la función de acilación.

Los genes de acilasa, transacilasa y aciltransferasa bacterianos se han conocido en la bibliografía durante algún tiempo. La mayoría son proteínas pequeñas de 15-25 kdalton. Por consiguiente, basándose en la comparación por tamaño, sólo los productos de los genes *phnO* y *phnQ* caerían en esta categoría. Sin embargo, basándose en comparaciones de similitud con otras proteínas en la GENOTECA, SWISSPROT, y en las bases de datos de EMBL, el producto del gen *phnO* pareció asemejarse más a otras proteínas que tienen actividad acilasa. Por ejemplo, la proteína PhnO de *E. coli* se alineó bien con una gentamicina acetiltransferasa-3-I descrita en Wohlleben y col. (Mol. Gen. Genet. 217: 202-208, 1989). pMON15020 que contiene los genes del operón *phn* de *E. coli* B *phnJ* hasta *phnP* en un único fragmento de *NcoI-EcoRI* de 6,0 kb se digirió con *SalI* y *EcoRI* para liberar un fragmento de 2,0 kb que contiene los genes *phnO*, P y Q. Este fragmento de 2 kb se escindió y se purificó de un gel de TAE Agarosa al 0,7%, se trató con T4 ADN polimerasa para escindir los extremos 3' salientes, a continuación con Klenow y trifosfatos de desoxinucleótidos (dXTP) para proporcionar extremos romos y posteriormente se unió en el sitio de *EcoRV* de pBlueScriptSP para producir el plásmido pMON15024. pMON15024 se digirió con *NdeI* y *EcoRI*, delecionando un fragmento de 1200 pares de bases que contenía la mayor parte de las secuencias codificadoras de *phnP* y todas las secuencias codificadoras de *phnQ*. El fragmento restante del plásmido pMON15024 conteniendo aún el gen *phnO* se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa en presencia de los didesoxinucleótidos según las instrucciones del fabricante para rellenar los extremos 3' expuestos por la digestión con enzima de restricción, a continuación se unieron juntos para producir el plásmido pMON15027. pMON15027 contiene sólo el gen *phnO* flanqueado en 3' por una pequeña porción de *phnP*. El fragmento de *NcoI-EcoRI* de 1200 pares de bases obtenido de pMON15024 se clonó en pMON2123 para producir pMON15026, que contiene los dos tercios 3' del gen *phnP* flanqueado en 3' por *phnQ*. Los plásmidos pMON15024, 15026 y 15027 se introdujeron en JM101 *mpu-*, y se analizó la presencia de actividad AMPA aciltransferasa en los lisados celulares de los transformantes como anteriormente tras el cultivo y la inducción. Sólo pMON15024 y pMON15027 exhibieron actividad aciltransferasa, indicando que el producto del gen *phnO* era responsable de la acilación de AMPA.

Se produjo un fragmento de ADN que contenía sólo el gen *phnO* con los sitios de endonucleasas de restricción vecinos convenientes para uso en otras manipulaciones de clonación usando procedimientos de ciclización térmica. Se sintetizaron cebadores de oligonucleótidos sintéticos por medio de reactivos Midland Certified Reagents, Co. (Midland Texas) basándose en el gen *phnO* y la secuencia vecina publicados para amplificar el gen *phnO* (Chen y col., J. Biol. Chem. 256: 4461-4471, 1990). La secuencia AAACACCATGGCTGCTTGTG (SEC. ID N°: 5), denominada AATPCR6, representa un oligonucleótido sintético que es homólogo a la hebra molde del gen *phnO*. El residuo de adenosina 5' de SEC. ID N°: 5 corresponde al par de bases 13.955 de la secuencia publicada del operón *phn*, inmediatamente en posición 5' del codón de iniciación ATG de *phnO* en la posición 13.962-13.964 (Chen y col.,

J. Biol. Chem. 256: 4461-4471, 1990). SEC. ID N°: 5 incorpora un único acoplamiento erróneo de la secuencia publicada de *phnO* en la posición 13.965 representado por una inversión de C por G, que genera un codón de alanina en lugar de un codón de prolina en la posición 2 y también crea un único sitio de restricción de *NcoI* que abarca el codón de iniciación ATG. La secuencia GTGACGAATTCGAGCTCATTACAGCGCCTTGGTGA (SEC. ID N°: 6), denominada AATPCR7, representa un oligonucleótido sintético que es homólogo a la hebra codificadora del gen. El residuo de adenosina 3' de SEC. ID N°: 6 corresponde al par de bases 14.380 del operón de *phn* publicado (Chen y col., J. Biol. Chem. 256: 4461-4471, 1990). La timidina en la posición número diecinueve de SEC. ID N°: 6 corresponde a la adenosina en la posición 14.396 de la secuencia publicada de *phnO* (Chen y col.). Una porción de SEC. ID N°: 6 solapa el codón de terminación de *phnO* nativo, introduce un segundo codón de terminación en el marco inmediatamente en posición 3' de y adyacente al codón e terminación nativo, y también introduce sitios de restricción únicos de *EcoRI* y *SacI* en posición 3' de estos codones de terminación.

pMON15024 se usó como un molde para la amplificación del gen *phnO* en una reacción de amplificación térmica convencional. Brevemente, se preparó una muestra de reacción de 100 microlitros que contenía 0,1 ng del molde de ADN, tampón de reacción, cada cebador 200 pM, dNTP 200 mM, Taq ADN polimerasa 1,25 U y se recubrió con aceite mineral. Esta muestra de reacción se sometió a treinta y cinco ciclos a 94°C durante un minuto, 50°C durante dos minutos, y 72°C durante tres minutos dando como resultado la amplificación de un producto de ADN de 459 pares de bases según se determinó por análisis de cinco microlitros de la muestra de reacción en un gel de TAE agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio. Se purificó un producto de 444 pares de bases usando procedimientos convencionales a partir de gel de TAE agarosa al 1% tras la digestión de una muestra del producto de amplificación de 459 pares de bases con endonucleasas de restricción *NcoI* y *EcoRI*. El producto de 444 pares de bases se unió en sitios compatibles en pMON7259 para generar pMON15028. Los lisados celulares preparados como anteriormente a partir de cultivos de JM101 conteniendo pMON15028 inducidos con IPTG se analizaron para verificar la presencia de actividad AMPA aciltransferasa y se compararon con cultivos que contenían pMON15027. Los resultados fueron indistinguibles, confirmando de esta manera que *phnO* codificaba una enzima capaz de acilar AMPA. Además, este resultado indicó que la mutación P2A en la proteína, que se introdujo en la secuencia codificadora del gen como resultado de la amplificación térmica usando el cebador de oligonucleótidos AATPCR6 (SEC. ID N°: 5), no tuvo efecto en la actividad aciltransferasa de la proteína PhnO resultante cuando se expresó en *E. coli*.

#### Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la producción de anticuerpos policlonales dirigidos al péptido *PhnO*.

Otros estudios del producto del gen *phnO* requirieron el uso de anticuerpos dirigidos a la proteína PhnO. Por consiguiente, se produjo PhnO en exceso en *E. coli* JM 101 para uso como un inmunógeno en la estimulación de la producción de anticuerpos tras la inyección en una cabra. Se introdujo el gen *phnO* conteniendo la mutación P2A en el plásmido pMON15028 dentro del plásmido pMON17061 en un fragmento de ADN de *NcoI* hasta *EcoRI*, produciendo pMON15032. La expresión de *phnO* en pMON15032 está bajo el control del promotor *recA* de *E. coli* vecino a la secuencia de unión de ribosomas 10L del gen del bacteriófago T7. Las células se cultivaron hasta la fase logarítmica media y se indujeron añadiendo ácido nalidíxico al cultivo hasta aproximadamente 50 partes por millón, de una disolución madre de 50 mg de polvo de ácido nalidíxico disuelto en 1 ml de NaOH 0,1 N. Se mantuvo el cultivo bajo condiciones de inducción durante doce horas a 37°C. Se recogieron las células como se describió en el ejemplo 3, y se sonicó en disolución salina tamponada de fosfato. Se determinó que aproximadamente el 23% de la proteína soluble total en los lisados de *E. coli* inducidos era PhnO y el aproximadamente el 60% de la proteína PhnO total se había liberado en la fase soluble como se evaluó por medio de SDS-PAGE y tinción de azul de Coomassie. La proteína se purificó además por medio de SDS-PAGE preparativa proporcionando una cantidad suficiente de PhnO para uso en la producción del anticuerpo que se une o que reacciona antigénicamente con PhnO o proteínas relacionadas con AMPA transacilasa. Brevemente, se separó la proteína PhnO por tamaño de otras proteínas en un gel SDS-PAGE al 15%. Se escindió una porción de gel conteniendo la proteína PhnO, se pesó, y se homogeneizó usando un politrón en un volumen de disolución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,0) igual a la masa de la porción de gel. Se mezcló el homogenizado con un volumen igual de medio completo de Freund hasta obtener una mezcla coloidal. Se usó un inóculo de 8 ml de esta mezcla para la primera inyección en una cabra. Dos semanas después de la inyección, se recogieron 50 ml de sangre y se separó el suero de los elementos sólidos de la sangre por centrifugación. Se administró una inyección de estímulo de proteína PhnO purificada del gel en una mezcla coloidal de adyuvante incompleto de Freund al 50% a las cuatro semanas, y a las seis semanas se obtuvo una segunda muestra de sangre.

El suero de la segunda muestra de sangre se usó para analizar la presencia de suficientes valores de anticuerpos específicos para la proteína PhnO. Los extractos de células JM101 conteniendo pMON15032 se sometieron a análisis de transferencia western. Se determinó que la concentración de proteína en el extracto era de aproximadamente de 55 mg/ml por el ensayo de Bradford, y se sometió un gel previamente teñido de Coomassie usando este mismo extracto a una exploración de densitómetro que indicó que aproximadamente el 23% de la proteína celular total era PhnO. Se desaló el extracto en una columna PD10, se eluyó con Tris 10 mM pH 7,5, y se diluyó con un volumen igual de tampón de muestra 2X SDS. Se prepararon diluciones en serie usando tampón de muestra 1X y se cargaron en pocillos de un gel SDS PAGE al 15%. Se mezclaron otras muestras con un extracto de proteína de hoja de tabaco conteniendo 10 microgramos adicionales de proteína por carril además de los extractos de PhnO de *E. coli*. Los extractos de proteínas

## ES 2 325 874 T3

de hoja de tabaco se usaron para analizar la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada a las proteínas de las plantas. Las proteínas se separaron según el tamaño por electroforesis a 7,5 mA constantes durante catorce horas a 4°C y el gel se electrotransfirió a un filtro de nitrocelulosa MSI de 0,45 micrómetros a 0,5 amperes en tampón de transferencia Tris-Glicina durante una hora. A continuación se bloqueó la membrana con TBST (Tris, BSA, NaCl, Tween-20, Short Protocols in Molecular Biology, 3° Ed., Wiley and Sons, Pub.) durante dos horas a temperatura ambiente, se incubó cuarenta y cinco minutos con una dilución 1:500 del segundo suero extraído a temperatura ambiente, se lavó dos veces en TBST, se incubó otros cuarenta y cinco minutos con IgG anti cabra de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim Biochemicals, Inc.), se lavó tres veces con TBST y una vez con tampón de fosfatasa alcalina, y finalmente se incubó durante dos minutos y medio con una disolución de desarrollo de color convencional conteniendo NBT y BCIP. La reacción se detuvo lavando la membrana con abundantes cantidades de agua destilada. El anticuerpo fue capaz de detectar la proteína PhnO en una concentración tan pequeña como 50 nanogramos de extracto de *E. coli* independientemente de la presencia de otras proteínas de plantas en la mitad de las muestras. Además, se detectaron muy pocas bandas de reactividad cruzada en todas las series de muestras, indicando que la muestra de suero contiene muy poco IgG que reacciona de manera cruzada con proteínas de *E. coli* o de la planta de tabaco cuando se prueba usando este procedimiento de transferencia western.

También se utilizó una fuente alternativa para generar un anticuerpo capaz de unirse específicamente o reaccionar antigénicamente con la proteína PhnO. Se colocó un gen *phnO* en un vector comercial (Invitrogen) que contenía una secuencia codificadora de aminoácido de unión a metales (His6) secuencia arriba de y en marco con la secuencia codificadora de *phnO*. Esta secuencia de ADN His6-*phnO* se insertó en el vector de expresión de *E. coli* pMON6235 en un fragmento de *NcoI* hasta *EcoRI*, bajo el control de un promotor *araBAD* del operón de arabinosa de *E. coli*, produciendo el plásmido pMON32909. La proteína His6 se produjo tras la inducción con arabinosa de las células W3110 de *E. coli* que contenían pMON32909, y se purificó sobre una columna de afinidad de metales según las instrucciones del fabricante.

Se inyectó patrón de proteína His6-PhnO purificado marcado con His en 6 conejos blancos de Nueva Zelanda usando un procedimiento de inmunización similar al utilizado para la cabra, descrito anteriormente. Se mostró también que el antisuero surgido en estos conejos era específico para unir la proteína PhnO y mostró reacción cruzada con otras proteínas bacterianas de *E. coli* o de plantas de tabaco.

### Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra propiedades de una enzima AMPA transacilasa usando aminometilfosfonato y acetil-CoA como sustratos en un ensayo enzimático según se mide por medio de análisis cinético de punto final.

Se determinaron las constantes  $K_m$  ( $K_m$ ) y  $V_{m\acute{a}x}$  ( $V_{m\acute{a}x}$ ) aparentes de la enzima PhnO para los sustratos aminometilfosfonato y acetil-CoA. La determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de PhnO se realizó por medio de análisis cinéticos de punto final, determinando la velocidad de la enzima para consumir cada sustrato en concentraciones variables del sustrato, y graficando la inversa de la velocidad de la enzima versus la inversa de la concentración de sustrato para producir un gráfico de cinética enzimática de Lineweaver-Burk. La conversión de [<sup>14</sup>C]-AMPA en N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA se controló como en el ejemplo 2, usando la enzima en un lisado bruto desalado de *E. coli* que expresa *phnO* de pMON15032, producido como en el ejemplo 4. Se determinó la proteína total por ml de extracto por el método de Bradford que indicó aproximadamente 22,5 mg/ml. La exploración densitométrica de los geles de SDS-poliacrilamida teñidos con Coomassie resolviendo la proteína PhnO a partir de estos lisados indicó que PhnO representa aproximadamente el 23% de la proteína total, por consiguiente se determinó que el extracto celular contenía aproximadamente 5,2 mg de proteína PhnO por ml. En un primer ensayo para determinar la  $K_m$  y la  $V_{m\acute{a}x}$  aparentes de PhnO para AMPA, las concentraciones de [<sup>14</sup>C]-AMPA variaron desde 2 hasta 38 mM. Las reacciones de la enzima se incubaron a 37°C durante 5 minutos y se extinguieron con 1 volumen de acetato de sodio (NaOAc) 100 mM, pH 4,4, en etanol. Las muestras se analizaron por medio de HPLC para determinar la cantidad de [<sup>14</sup>C]-AMPA convertido en N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Las condiciones de ensayo y los resultados para cada serie de reacciones se muestran en la Tabla 8.

ES 2 325 874 T3

TABLA 8

*Cinética de la enzima PhnO para el sustrato AMPA*

| Muestra | S <sup>1</sup> | Recambio % <sup>2</sup> | Velocidad <sup>3</sup> | 1/S   | 1/V    | V/S   |
|---------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|--------|-------|
| 1       | 200            | 39,5                    | 79                     | 1,0   | 0,0127 | 79,00 |
| 2       | 400            | 35,1                    | 140                    | 0,5   | 0,0071 | 70,00 |
| 3       | 800            | 32,9                    | 263                    | 0,25  | 0,0038 | 65,75 |
| 4       | 1200           | 26,8                    | 322                    | 0,166 | 0,0031 | 53,67 |
| 5       | 1600           | 26,2                    | 426                    | 0,125 | 0,0023 | 53,25 |
| 6       | 2000           | 22,1                    | 442                    | 0,100 | 0,0023 | 44,20 |
| 7       | 2400           | 19,2                    | 461                    | 0,083 | 0,0022 | 38,42 |
| 8       | 2800           | 17,6                    | 493                    | 0,071 | 0,0020 | 35,21 |
| 9       | 3200           | 17,3                    | 554                    | 0,063 | 0,0018 | 34,63 |
| 10      | 3600           | 14,5                    | 522                    | 0,056 | 0,0019 | 29,00 |
| 11      | 4000           | 13,6                    | 544                    | 0,050 | 0,0018 | 27,20 |
| 12      | 6000           | 12,7                    | 762                    | 0,033 | 0,0013 | 25,15 |
| 13      | 7600           | 10                      | 760                    | 0,026 | 0,0013 | 19,76 |

1 – Concentración del sustrato AMPA en la reacción en nm (nanomoles).

2 – Recambio % medido por el porcentaje de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA formado en relación con la cantidad de [<sup>14</sup>C]-AMPA restante en la muestra.

3 – Velocidad de la enzima en unidades de AMPA (nm) convertidas en N-acetil-AMPA por minuto por mg de proteína

Un gráfico de Linweaver-Burk de los datos de 1/V vs 1/S de la Tabla 8 indica que la Km aparente de PhnO para AMPA como un sustrato es de aproximadamente 9 mM, y la Vmáx aparente es de aproximadamente 824 U/mg de proteína.

La Km aparente de PhnO para el sustrato acetil-CoA se determinó en experimentos similares. Tras varios intentos para obtener cinética de punto final, se determinó que el número de recambio era demasiado bajo para ser fiable en las concentraciones de AMPA de aproximadamente 30 mM y las cantidades de enzima de aproximadamente 1-10 ng. Se intentó un enfoque alternativo usando acetil-CoA marcado con tritio. La actividad específica del marcador fue aproximadamente 40 X más elevada que con [<sup>14</sup>C], proporcionando una ganancia en la sensibilidad que permitió la determinación de Km aparente de PhnO para Acetil CoA. La actividad específica de [<sup>3</sup>H]-acetil-CoA (Amersham, Inc.) era de 360 mCi/mg o 250 μCi/ml.

La transacilación mediada por PhnO de [<sup>3</sup>H]-acetil-CoA a [<sup>3</sup>H]-acetil-AMPA se controló por medio de cromatografía HPLC de intercambio aniónico débil, con los tiempos de retención de acetil-CoA y acetil-AMPA ajustados para que estos compuestos estuvieran separados por aproximadamente tres minutos. Esto se llevó a cabo ajustando la concentración del tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,5) hasta 40 mM con un caudal de 1 ml por minuto a través de una columna de intercambio aniónico débil AX100. Se hizo reaccionar cada muestra con PhnO y AMPA 30 mM durante cinco minutos a 37°C y se extinguió con NaOAc 100 mM pH 4,4 en etanol, a continuación se analizó por HPLC. El sustrato [<sup>3</sup>H]-acetil-CoA varió desde 25 micromolar hasta 1,3 mM en cada reacción junto con aproximadamente PhnO 5 ng, Tris 50 mM pH 7,5, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y AMPA 30 mM. Las muestras se analizaron por HPLC para determinar las cantidades de N- [<sup>3</sup>H]-acetil- AMPA producido y [<sup>3</sup>H]-acetil-CoA restante. Las condiciones del ensayo y los resultados para estas reacciones se muestran en la Tabla 9.

## ES 2 325 874 T3

TABLA 9

*Cinética de la enzima PhnO enzima para el sustrato donador de Acetil-CoA*

| Muestra N° | [Acetil-CoA] <sup>1</sup> | Velocidad <sup>2</sup> | 1/[S] <sup>3</sup> | 1/V <sup>4</sup> | V/S <sup>5</sup> |
|------------|---------------------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------|
| 1          | 25                        | 34                     | 0,0400             | 0,0294           | 1,3600           |
| 2          | 50                        | 66                     | 0,0200             | 0,0152           | 1,3200           |
| 3          | 75                        | 94                     | 0,0133             | 0,0106           | 1,2533           |
| 4          | 100                       | 125                    | 0,0100             | 0,0080           | 1,2500           |
| 5          | 125                       | 150                    | 0,0080             | 0,0067           | 1,2000           |
| 6          | 150                       | 173                    | 0,0066             | 0,0058           | 1,1533           |
| 7          | 175                       | 193                    | 0,0057             | 0,0052           | 1,1029           |
| 8          | 200                       | 219                    | 0,0050             | 0,0046           | 1,0950           |
| 9          | 225                       | 240                    | 0,0044             | 0,0042           | 1,0667           |
| 10         | 250                       | 259                    | 0,0040             | 0,0039           | 1,0360           |
| 11         | 375                       | 339                    | 0,0027             | 0,0030           | 0,9040           |
| 12         | 390                       | 287                    | 0,0026             | 0,0035           | 0,7359           |
| 13         | 520                       | 331                    | 0,0019             | 0,0030           | 0,6365           |
| 14         | 650                       | 352                    | 0,0015             | 0,0028           | 0,5415           |
| 15         | 780                       | 372                    | 0,0013             | 0,0027           | 0,4769           |
| 16         | 910                       | 397                    | 0,0011             | 0,0025           | 0,4363           |
| 17         | 1040                      | 411                    | 0,0009             | 0,0024           | 0,3952           |
| 18         | 1170                      | 425                    | 0,0008             | 0,0024           | 0,3632           |
| 19         | 1300                      | 434                    | 0,0007             | 0,0023           | 0,3338           |

1 – concentración del sustrato en unidades micromolares

2 – velocidad de la enzima como se mide por la cantidad de [<sup>3</sup>H] incorporado en [<sup>3</sup>H]-acetil-AMPA por unidad de tiempo

3 – inversa de la concentración del sustrato

4 – inversa de la velocidad

5 – relación de velocidad a concentración del sustrato

Un gráfico de Linweaver-Burk de los datos de 1/V vs 1/S de la Tabla 9 indica que la Km aparente de PhnO para acetil-CoA como un sustrato está entre 375 y 390 micromolar, y la V<sub>máx</sub> aparente es de aproximadamente 824 U/mg de proteína.

Se determinó un intervalo de pH de actividad aproximado para la enzima PhnO usando la enzima en un lisado bruto de *E. coli* que expresa *phnO* de pMON15032. Se determinó la capacidad de la enzima para producir N-acetil AMPA a partir de una mezcla conteniendo acetil-CoA y AMPA a través de un intervalo de valores de pH. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón MES/MOPS/Tricina equilibrado hasta un valor de pH desde 4,5 hasta 9,0, con valores de pH reales que varían desde 5,2 hasta 9,0. Brevemente, se mezclaron 95 microlitros de un tampón adecuado con 100 microlitros de 2X mezcla de ensayo como se describe en el ejemplo 4, y 5 microlitros de lisado de *E. coli* desalado conteniendo aproximadamente proteína PhnO 400 ng/microlitros. Se incubó la reacción a 37°C durante cinco minutos y se extinguió con NaOAc 100 mM pH 4,4 en etanol, y se analizó por HPLC como se describe en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

## ES 2 325 874 T3

TABLA 10

Perfil de pH de la enzima PhnO

| pH del tampón | <sup>1</sup> pH de la reacción de Mock | <sup>2</sup> Recambio % | N-Acetil CoA (nmol) | <sup>3</sup> Velocidad (nmol/min/microgramo) |
|---------------|--|-------------------------|---------------------|--|
| 5,0           | 5,23                                   | 3,7                     | 222                 | 22,2   |
| 5,5           | 5,62                                   | 3,9                     | 234                 | 23,4   |
| 6,0           | 5,92                                   | 4,2                     | 252                 | 25,2   |
| 6,5           | 6,47                                   | 13,3                    | 798                 | 79,8   |
| 7,0           | 7,0                                    | 27,0                    | 1620                | 162,0  |
| 7,5           | 7,48                                   | 32,0                    | 1920                | 192,0  |
| 8,0           | 8,05                                   | 34,3                    | 2058                | 205,8  |
| 8,5           | 8,46                                   | 33,5                    | 2010                | 201,0  |
| 9,0           | 9,0                                    | 33,9                    | 2034                | 203,4  |

1- indica el valor de pH real tras combinar todos los reactivos para cada valor dado de pH inicial del tampón

2- determinado como en la Tabla 9 para Km y V<sub>máx</sub>

3- determinado como en la Tabla 9 para V<sub>máx</sub>

Los resultados indican que la actividad transacilasa de PhnO óptima usando AMPA y acetil-CoA como sustratos está aproximadamente en pH 8.0. Sin embargo PhnO convierte eficazmente AMPA en N-acetil AMPA usando acetil-CoA como el donador de acetilo a través de un intervalo de pH desde aproximadamente 6,5 hasta al menos 9,0.

Se llevaron a cabo otros experimentos con proteína PhnO purificada para caracterizar más el alcance de la preferencia de sustrato de la enzima para compuestos de Acil-CoA donadores de acilo. Se ha establecido en el presente documento que al menos un donador de sustrato de acilo o grupo saliente puede ser un compuesto ácido de dos carbonos tal como el resto acetilo en el compuesto Acetil-CoA. No se sabía qué variedad de moléculas de acilo que comprenden diferentes longitudes de cadena de carbono funcionaría o podría funcionar como grupo saliente del donador de acilo de Acil-CoA al reaccionar con PhnO transacilasa y AMPA como la molécula receptora de acilo. Por consiguiente, se desarrolló un ensayo de HPLC similar al descrito en el Ejemplo 2 para determinar el alcance de la capacidad de la enzima para transferir un grupo acilo de un donador de acilo de Acil-CoA a [<sup>14</sup>C]-AMPA.

Se purificó PhnO de un litro de cultivo en caldo Luria Bertani de *E. coli* JM101 que expresa un gen *phnO* recombinante de pMON15032 tras la inducción de ácido nalidíxico durante tres horas a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 40 ml de tampón Tris frío (Tris-HCl 0,1 M pH 8) y se colocaron en hielo. La suspensión celular se llevó a DTT 1 mM y PMSF 0,5 mM. Se lisó la suspensión por medio de 2 pasajes a través de una célula de presión francesa a 75,86 bares (1.100 psi), se centrifugó a 12.000 rpm (10.000 rpm en un rotor Sorvall SA600) durante 40 minutos a 4°C, a continuación se colocó en hielo. Los sobrenadantes aclarados se vertieron en tubos de polipropileno de 15 ml nuevos. Se separaron las muestras nuevamente en dos partes iguales y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso para purificar la proteína PhnO. Se ensayó la actividad enzimática en 20 microlitros de la fracción soluble usando el procedimiento de HPLC descrito anteriormente en el Ejemplo 2, excepto en que tras detener el ensayo con la adición de ácido, la muestra se almacenó a -80°C. Se preparó una columna Sephacryl S200 según las instrucciones del fabricante y se equilibró con una disolución que contenía Tris 20 mM pH 8,0 y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Se colocó el extracto soluble total completo en la parte superior del lecho de la columna tras descongelar en hielo. Se recogieron cuarenta fracciones de 9 ml del eluido de la columna y se analizaron treinta microlitros de cada fracción por transferencia western usando antisuero anti-PhnO tras la resolución en un gel SDS-PAGE al 15%. También se analizaron treinta microlitros de cada fracción para analizar la actividad AMPA aciltransferasa usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las muestras que exhibían actividad aciltransferasa y que correspondían a datos positivos de transferencia western se combinaron. Estas se representaron por medio de las fracciones 7 hasta 19 en este ejemplo, y se combinaron en un volumen de 100 ml, se distribuyeron en 10 tubos cada uno conteniendo volúmenes de 10 ml, y se almacenaron a -80°C para uso posterior.

Se usó cromatografía de intercambio aniónico para determinar el patrón de elución de PhnO fuera de las otras proteínas contaminantes que eluyen conjuntamente durante el fraccionamiento en Sephacryl S200. Uno de los tubos de las fracciones positivas de PhnO combinadas se descongeló en hielo y se inyectó en una columna Mono Q 5/5 previamente equilibrada con tampones A (un litro de Tris-HCl 20 mM pH 8,0, agua desionizada destilada Mili-Q) y

## ES 2 325 874 T3

B (un litro de Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0,1 M). La muestra que contenía la proteína PhnO activa se inyectó en la columna y se recogieron fracciones de un mililitro. Se lavó la columna durante 5 minutos con un caudal de 1,8 ml por minuto de Tampón A tras cargar la muestra que contenía PhnO. A los cinco minutos, se añadió Tampón B al volumen de flujo a 0,5 ml por minuto durante cuatro minutos. El Tampón B se aumentó hasta el 22% del volumen de flujo a los 10 minutos, al 30% a los 12 minutos, al 36% a los 13 minutos, al 41% a los 14 minutos, al 46% a los 15 minutos, al 74% a los 16 minutos, y al 100% a los 16 minutos hasta los 22 minutos, momento en el que se detuvo el flujo de Tampón B y se reinició el Tampón A al 100% para equilibrar la columna. Los volúmenes de 10 microlitros de fracciones individuales recogidas de la columna Mono-Q se analizaron por transferencia western y para la actividad transacilasa como se describe en el Ejemplo 2. Las fracciones que exhibían actividad AMPA aciltransferasa positiva y que correlacionaban con los datos de transferencia Western se combinaron y se mantuvieron como una muestra de proteína purificada. Se usaron muestras de esta proteína PhnO purificada para determinar la especificidad de sustrato del donador de acilo de la enzima.

Las reacciones enzimáticas se prepararon de la siguiente manera. Las reacciones de 100 microlitros estaban constituidas por Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 3 microlitros de [<sup>14</sup>C]-AMPA 1,3 mM (115.392 dpm por microlitro), Acil-CoA donador de acilo 0,1 mM ó 1 mM, y 2,5 microlitros de muestra de enzima purificada. Se preparó una premezcla de ensayo de las que se usaron 45 microlitros en cada reacción de 100 microlitros. Esta muestra de premezcla de 45 microlitros estaba constituida por 40 microlitros de agua destilada y desionizada, 2 microlitros de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, y 3 microlitros de [<sup>14</sup>C]-AMPA 1,3 mM (115.392 dpm por microlitro). Las reacciones se iniciaron mezclando 40 microlitros de Tris-HCl 125 mM pH 8,0, 2,5 microlitros de muestra de proteína y 10 microlitros de compuesto de Acil-CoA donador de acilo en un tubo de microcentrífuga a temperatura ambiente. Cada compuesto de Acil-CoA donador de acilo se preparó como una disolución madre de patrones de 1 mM, 5 mM ó 10 mM. A continuación se mezcló cada tubo con 45 microlitros de la premezcla de ensayo que contenía el sustrato receptor de [<sup>14</sup>C]-AMPA, se mezcló suavemente y se transfirió a un baño de agua a 30°C durante 5 minutos. Cada reacción se detuvo con la adición de 4 microlitros de HCl 1 M, se mezcló por medio de vórtex, y se colocó en hielo y se almacenó a -20°C hasta realizar el ensayo para evidenciar la presencia de [<sup>14</sup>C]-AMPA o compuestos relacionados por HPLC.

El análisis de HPLC se realizó usando un sistema de HPLC de bomba dual Waters 510 con un detector de UV de longitud de onda máx. 481 y una bomba de centelleo, una columna de HPLC SAX sílice Phenomenex PHENOSPHERE 5 micrómetros 80Å (250 X 4,6 mm, presión máxima 241,4 bares (3500 psi), Tampón A constituido por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, metanol al 4%, ajustado hasta pH 2,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, y Tampón B constituido por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM, metanol al 4,4% ajustado hasta pH 2,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, y Atomflow HAZARD (Packard) conteniendo 1,2,4 trimetilbenceno al 64%, dicotilsulfosuccinato de sodio al 7,5%, diaminosulfosuccinato de sodio al 3,5%, y polietilén(4)lauril éter al 6%. Las condiciones de gradiente de HPLC para cada análisis de muestra eran similares a las descritas en el Ejemplo 2, con variaciones menores. Los caudales se proporcionan en la Tabla 11.

TABLA 11

| <b>Condiciones de gradiente de HPLC</b> |                 |     |     |                     |
|---|-----------------|-----|-----|---------------------|
| Tiempo (min)                            | Caudal (ml/min) | A%  | B%  | Caudal <sup>1</sup> |
| 0,0                                     | 1               | 100 | 0   | 3                   |
| 2,0                                     | 1               | 100 | 0   | 3                   |
| 5,0                                     | 1               | 50  | 50  | 3                   |
| 15,0                                    | 1               | 0   | 100 | 3                   |
| 17,0                                    | 1               | 0   | 100 | 3                   |
| 17,3                                    | 1               | 100 | 0   | 3                   |
| 21,0                                    | 1               | 100 | 0   | 3                   |
| 21,3                                    | 0,1             | 100 | 0   | 0                   |

1 – Caudal del líquido de centelleo en mililitro por minuto

Las disoluciones madre de los compuestos de Acil-CoA donadores de acilo se prepararon como se describió anteriormente, y éstas se presentan aquí: Na Acetil-CoA, Li n-propionil-CoA, Li glutaril-CoA, Li metilmalonil CoA, Li crotonoil-CoA, Li isobutiril-CoA, Na succinil-CoA, Li tiglil-CoA, Li n-valeril-CoA, y Li desulfo-CoA. Todos los compuestos se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. La actividad por ciento de la enzima purificada para transferir el resto acilo asociado a CoA a [<sup>14</sup>C]-AMPA se determinó midiendo el porcentaje del área del pico del cromatograma de HPLC de [<sup>14</sup>C]-AMPA convertido en otro compuesto de [<sup>14</sup>C], tal como N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA, estableciéndose la cantidad de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA producido durante la reacción en la que [<sup>14</sup>C]-AMPA y acetyl-CoA 1 mM son sustratos para PhnO como el 100% de referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

## ES 2 325 874 T3

TABLA 12

*Eficacia de la enzima AMPA transacilasa para el sustrato Acil-CoA donador de acilo*

| Acil-CoA donador de acilo | % de conversión de [ <sup>14</sup> C]-AMPA <sup>1</sup> | Actividad % |
|---------------------------|---|-------------|
| Acetil-CoA 0,1 mM         | 79,2  | 79,2        |
| Acetil-CoA 0,5 mM         | 98,7  | 98,7        |
| Acetil-CoA 1 mM           | 100,00  | 100,00      |
| Propionil-CoA 0,1 mM      | 78,2  | 78,2        |
| Propionil-CoA 0,5 mM      | 97,8  | 97,8        |
| Propionil-CoA 1 mM        | 100,00  | 100,00      |
| Glutaril-CoA 0,1 mM       | 0,81  | 0,81        |
| Glutaril-CoA 0,5 mM       | 0,00  | 0,00        |
| Glutaril-CoA 1 mM         | 0,57  | 0,57        |
| Metilmalonil-CoA 0,1 mM   | 1,11  | 1,11        |
| Metilmalonil-CoA 0,5 mM   | 2,08  | 2,08        |
| Metilmalonil-CoA 1 mM     | 2,21  | 2,21        |
| Crotonoil-CoA 0,1 mM      | 0,80  | 0,80        |
| Crotonoil-CoA 0,5 mM      | 0,00  | 0,00        |
| Crotonoil-CoA 1 mM        | 0,00  | 0,00        |
| Isobutiril-CoA 0,1 mM     | 2,10  | 2,10        |
| Isobutiril-CoA 0,5 mM     | 0,20  | 0,20        |
| Isobutiril-CoA 1 mM       | 0,00  | 0,00        |
| Succinil-CoA 0,1 mM       | 5,06  | 5,06        |
| Succinil-CoA 0,5 mM       | 3,38  | 3,38        |
| Succinil-CoA 1 mM         | 1,56  | 1,56        |
| Tigilil-CoA 0,1 mM        | 0,00  | 0,00        |
| Tigilil-CoA 0,5 mM        | 0,00  | 0,00        |
| Tigilil-CoA 1 mM          | 0,99  | 0,99        |
| Valeril-CoA 0,1 mM        | 0,24  | 0,24        |
| Valeril-CoA 0,5 mM        | 0,00  | 0,00        |
| Valeril-CoA 1 mM          | 0,33  | 0,33        |
| Desulfo-CoA 0,1 mM        | 0,95  | 0,95        |
| Desulfo-CoA 0,5 mM        | 1,25  | 1,25        |
| Desulfo-CoA 1 mM          | 0,52  | 0,52        |

1 – porcentaje del área del pico del cromatograma de HPLC de [<sup>14</sup>C]-AMPA convertido en otro compuesto de [<sup>14</sup>C], tal como N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA, estableciéndose la cantidad de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA producido durante la reacción en la que [<sup>14</sup>C]-AMPA y acetil-CoA 1 mM son sustratos para PhnO como el 100% de referencia.

Estos resultados indican que la enzima PhnO es capaz de utilizar de manera eficaz los compuestos asociados a Acil-CoA que tienen un grupo acilo con una longitud de cadena de carbonos de no más de tres para transacilar AMPA. Otros compuestos que tienen una longitud de cadena de carbonos mayor que propionil- y que no son amplios o voluminosos, tales como los compuestos metilmalonil-, isobutiril-, y succinil-CoA son también Acil-CoA donadores de acilo eficaces, pero con una menor eficacia enzimática.

## Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la expresión *in vitro* y la dirección de una proteína AMPA aciltransferasa en cloroplastos aislados.

Muchas proteínas localizados en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen hacia el cloroplasto por medio de un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP). El CTP se elimina durante las etapas implicadas en la importación de la proteína dirigida en el cloroplasto. Los ejemplos de tales proteínas de cloroplastos incluyen la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RUBISCO), 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS), ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, el complejo proteína I y proteína II de captación de luz y la tiorredoxina F. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son del cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto por medio del uso de fusiones con un CTP y que una secuencia de CTP es suficiente para dirigir a una proteína al cloroplasto (Della-Cioppa y col., 1987). La enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) está localizada en el cloroplasto y es la diana del glifosato en las plantas. Se ha encontrado que dirigir la glifosato oxidoreductasa al cloroplasto proporciona tolerancia a las plantas al glifosato, aunque la GOX localizada al citoplasma también es capaz de proporcionar tal tolerancia. Generalmente, la enzima GOX recombinante se localiza al cloroplasto. El metabolismo del glifosato mediado por GOX produce AMPA, que se ha demostrado que es fitotóxico. En el presente documento se ha mostrado que PhnO es capaz de realizar N-acilación de AMPA y que N-acetil-AMPA no es fitotóxico. Por consiguiente, será necesario inactivar el AMPA en las plantas. Esto supone que la AMPA aciltransferasa puede expresarse en las plantas como una enzima activa, y que tales aciltransferasas tienen la capacidad de ser importadas en el cloroplasto y de retener la actividad enzimática. En vista de la fitotoxicidad del AMPA según se describe en el Ejemplo 1, se introdujo un gen de AMPA aciltransferasa en vectores de expresión de plantas para probar la expresión en las plantas. Además, también se probó la importación de aciltransferasa en los cloroplastos.

Se unió una secuencia de ADN que codifica un péptido dirigido al cloroplasto en posición 5' y en marco con una secuencia de ADN que codifica una AMPA aciltransferasa. Se escindió una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa-1-bisfosfato carboxilasa de *Arabidopsis* (CTP, SEC. ID N°: 9) de pMON17058 usando las endonucleasas de restricción *Bgl*III y *Nco*I y se insertó en sitios de restricción complementarios en pMON15028 para producir pMON15029, de manera que la secuencia codificadora de CTP estaba unida en posición 5' y en marco con la secuencia codificadora de *phnO* en pMON15028. El gen *phnO* quimérico resultante en pMON15029 es capaz de producir una proteína PhnO dirigida al cloroplasto. Se insertó una casete de ADN de *Eco*RI hasta *Bgl*III conteniendo la secuencia codificadora de CTP-PhnO, SEC. ID N°: 11, de pMON15029 en sitios de *Eco*RI y *Bam*HI en pBlueScript KS (-) para producir pMON15036. La secuencia codificadora de CTP-PhnO en pMON15036 puede expresarse en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* a partir de un promotor del fago T3. Se construyó un plásmido de expresión transitoria en plantas similar, pMON15035, pero sin la secuencia de dirección al cloroplasto. Se escindió un fragmento de ADN de *Eco*RI hasta *Bgl*III conteniendo sólo la secuencia codificadora de *phnO* de pMON15028 y se insertó en sitios de *Eco*RI y *Bam*HI en pBlueScript KS (+) de manera que pudiera producirse PhnO a partir de un promotor del fago T7 en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*. Se escindió una secuencia de ADN de *Nco*I hasta *Eco*RI que codifica PhnO de pMON15028 y se insertó en pMON17061, produciendo pMON15032. pMON15032 proporciona la expresión de *phnO* a partir de un promotor *recA* de *E. coli*. Se escindió un fragmento de ADN de *Bgl*III hasta *Eco*RI que codifica PhnO de pMON15028 y se insertó en pBlueScript SK (-) para producir pMON15033. pMON15033 proporciona la expresión de *phnO* a partir de un promotor *lac* de *E. coli*. Se escindió un fragmento de ADN de *Bgl*III hasta *Eco*RI que codifica CTP-PhnO de pMON15029 y se insertó en sitios compatibles en pBlueScript SK (-), proporcionando la expresión de proteína PhnO dirigida al cloroplasto a partir de un promotor *lac* de *E. coli* de pMON15034.

pMON15032, pMON15033, y pMON15034 se introdujeron en *E. coli* JM101. Los cultivos se hicieron crecer y se indujeron como se describió anteriormente, excepto en que la expresión a partir de células que contenían pMON15032 se indujo con la adición de 50 partes por millón de ácido nalidíxico en NaOH 0,1 M. Se prepararon lisados aclarados de cada cultivo y se sometieron a un ensayo de AMPA aciltransferasa como se describió anteriormente para determinar la presencia de actividad AMPA aciltransferasa. Todos los lisados contenían cantidades sustanciales de actividad aciltransferasa por encima de los niveles de control. De manera más importante, el péptido CTP-PhnO (SEC. ID N°: 12) expresado de pMON15034 pareció retener la actividad enzimática aciltransferasa completa.

pMON15035 (PhnO) y pMON15036 (CTP-PhnO) se usaron *in vitro* para generar la proteína PhnO marcada con [<sup>35</sup>S]-metionina para uso en un ensayo de importación de cloroplastos. Brevemente, el procedimiento usado para la transcripción y traducción *in vitro* fue como se describió en Short Protocols In Molecular Biology, Third Edition, Ed. Ausubel y col., Wiley & Sons Pub., (1995), que se incorpora en el presente documento por referencia. Se digirieron aproximadamente 20 microgramos de ADN del plásmido hasta completar con endonucleasa de restricción *Hind*III en una reacción de 100 microlitros. Se usaron 20 microlitros del digerido del plásmido, o aproximadamente 4 microgramos del ADN del plásmido linealizado, en una reacción de transcripción *in vitro* para generar ARNm para producir el producto proteico PhnO o CTP-PhnO en posteriores reacciones de traducción. Las reacciones de transcripción estaban constituidas por 20 microlitros de ADN del plásmido linealizado, 20 microlitros de un tampón de transcripción 5X (TrisHCl 200 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, espermidina 10 mM y NaCl 250 mM), 20 microlitros de mezcla de trifosfato de ribonucleósidos 5X (ATP, CTP, UTP cada uno 5 mM, trifosfato de diguanosina (G-5'ppp5'-G)TP 5 mM, GTP 5 mM), 10 microlitros de ditioneitol (DTT) 0,1 M, 10 microlitros de RNasin<sup>TM</sup> (una mezcla inhibidora de ribonucleasa pancreática de Promega), 4 microlitros de ARN polimerasa (T7 ó T3, New England Biolabs, Inc.), y agua destilada,

## ES 2 325 874 T3

desionizada hasta 100 microlitros. Cada reacción se incubó a 37°C durante una hora. Se analizaron 4,5 microlitros de cada reacción en un gel de agarosa formaldehído al 1,4% para asegurar que cada reacción producía el molde de ARN adecuado para la siguiente etapa de traducción.

5 Se usaron 20 microlitros de las reacciones de transcripción para producir las proteínas PhnO marcadas con [<sup>35</sup>S]-metionina para uso en un ensayo e importación de cloroplasto. Brevemente, se mezcló ARN con 6 microlitros de una mezcla acuosa de aminoácidos sin metionina, 15 microlitros de [<sup>35</sup>S]-metionina (1400 Ci/mmol, Amersham), y 200 microlitros de lisado de reticulocitos de conejo. Estas reacciones se incubaron a 37°C durante dos horas y se colocaron en hielo seco para almacenamiento. Se analizó una muestra de 10 microlitros de cada reacción en un gel SDS-PAGE  
10 al 15%. Los geles se secaron al vacío y se colocaron directamente en el lado de la emulsión de la película KODAK™ X-O-MAT™ para autorradiografía. Los resultados indicaron que cada plásmido produjo los péptidos respectivos de masa molecular prevista para PhnO (pMON15035) y CTP-PhnO (pMON15036) en cantidad suficiente para probar la captación en los cloroplastos en un ensayo de importación.

15 Los cloroplastos intactos se aislaron de una lechuga Romana desvenada según Edelman y col., *Procedimientos in Cloroplasto Molecular Biology*, Elsevier Biomedical Press, Capítulo 86, 1982. Se preparó un litro de patrón de tampón de pulverización (tampón GR) (NaEDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, Hepes-KOH 50 mM pH 7,5, y sorbitol 0,33 mM). Inmediatamente antes de usar, se añadieron 890 mg de ácido ascórbico a 900 ml de disolución madre de tampón GR. Se mezcló una lechuga Romana, rota, desvenada con 900 ml de tampón GR y se maceró mezclando en  
20 una licuadora Waring tres veces durante tres segundos cada vez a alta velocidad. La suspensión se filtró a través de cuatro capas de Miracloth, y el filtrado se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en un rotor SORVALL™ GS-3. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con una varilla de vidrio en 4 mililitros de tampón GR. Los cloroplastos se aislaron por centrifugación a través de un gradiente de Percoll. Se preparó Percoll al 80% mezclando 16 ml de PBF-Percoll con 4 ml de Tampón 5X (EDTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, Hepes-KOH  
25 250 mM, 30 g de sorbitol, 490 ml de ascorbato de sodio, 85,5 mg de glutatión, hasta 100 ml con H<sub>2</sub>Odd). Se preparó una disolución de Percoll al 40% combinando 8 ml de PBF-Percoll con 4 ml de Tampón 5X y 8 ml de H<sub>2</sub>Odd. Se preparó un gradiente de Percoll en un tubo Corex de 30 ml colocando 10 ml de Percoll al 40% sobre 10 ml de Percoll al 80%. Los cloroplastos se aislaron colocando los cloroplastos resuspendidos en el gradiente de percoll, centrifugando a  
30 9.500 rpm durante diez minutos en una centrífuga con rotor basculante SS-34 SORVALL™ a 4°C durante diez minutos con el freno activado. Los cloroplastos rotos permanecen en la capa superior y se retiraron con pipeta. Los cloroplastos intactos estaban localizados en la interfase del gradiente de Percoll al 40/80% y se retiraron a un tubo COREX™ de 30 ml nuevo. Los cloroplastos aislados se lavaron dos veces con tampón GR y se centrifugaron para recogida tras cada lavado en un rotor SS-34 a 6.000 rpm durante diez minutos a 4°C con el freno desactivado. Los cloroplastos aislados, lavados se resuspendieron en 1 ml de Hepes-KOH 50 mM estéril pH 7,7, sorbitol 330 mM agitando suavemente  
35 con una varilla de vidrio, y se determinó la concentración de clorofila de la suspensión. Se añadieron 5 ml de una disolución de acetona al 80% a 20 microlitros de la suspensión de cloroplastos y se agitó suavemente por medio de vórtex. La mezcla resultante se filtró a través de un papel de filtro Whatman™ N° 1 en un tubo de cultivo. Se determinó la absorbancia del filtrado a 645nm y 663 nm frente a un blanco de acetona al 80%. La concentración de clorofila en microgramos por ml se determinó según la ecuación N° 1 como [clorofila μg/ml] = [A<sub>645</sub> + [A<sub>663</sub> \* (8,02)].  
40 La masa de la clorofila en μg se calcula tomando la cantidad de clorofila medida en μg/ml y multiplicando por el volumen en que se han resuspendido los cloroplastos (ecuación N° 2), que en este ejemplo es 5 ml. Por consiguiente, la concentración de clorofila en μg/μl en la muestra medida es equivalente al valor determinado en la ecuación N° 2 dividido por el volumen de la muestra medida, que en este ejemplo es 20 μl. En este ejemplo, se determinó que A<sub>645</sub> era 0,496, y se determinó que A<sub>663</sub> era de 1,0814. Por consiguiente, la concentración de clorofila en la muestra medida  
45 era de 4,67 μg/μl. La concentración de clorofila en la suspensión de cloroplastos se ajustó hasta 4,0 μg/μl con Hepes-KOH pH 7,7, disolución de sorbitol 330 mM y la suspensión de cloroplastos resultante se almacenó en hielo seco en la oscuridad.

Un típico experimento de captación de 300 microlitros contenía ATP 5 mM, metionina no marcada 8,3 mM, sorbitol 322 mM, Hepes-KOH 58,3 mM (pH 8,0), 50 microlitros de productos de la traducción del lisado de reticulocitos, y cloroplastos intactos (aproximadamente 200 microgramos de clorofila). Las mezclas de captación se agitaron suavemente a temperatura ambiente en tubos de vidrio de 10 X 75 mm, directamente frente a un equipo iluminación de fibra óptica a intensidad máxima de luz usando una bombilla de 150 vatios. Se retiraron dos muestras de 70 microlitros de cada mezcla de captación a los 0, 5, 10 y 15 minutos. Se centrifugó una muestra sobre 100 microlitros de gradientes  
55 de aceite de silicona en tubos de polietileno de 150 microlitros por centrifugación a 11.000 X g durante 30 segundos, e inmediatamente se congeló en hielo seco. Bajo estas condiciones, los cloroplastos intactos forman un sedimento bajo la fase de aceite de silicona y el medio de incubación que contiene el lisado de reticulocitos permanece flotando en la superficie de la interfase. La otra muestra se trató con proteasa (un décimo del volumen o 7 microlitros de mezcla de proteasas tripsina y quimiotripsina en concentración de 0,25 mg/ml cada una) durante treinta minutos en hielo, a continuación se sometió a la separación en aceite de silicona y se congeló en hielo seco. Posteriormente se resuspendieron los sedimentos de cloroplastos en 50-100 microlitros de un tampón de lisis (Hepes-KOH 10 mM pH 7,5, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, ácido ε-amino-n-caproico 5 mM s, y aprotinina 30 microgramos por ml) y se centrifugó a 15.000 X g durante 20 minutos para sedimentar las membranas tilacoides. Se mezcló el sobrenadante aclarado (proteínas del estroma) de esta centrifugación, y una alícuota del medio de incubación del lisado de reticulocitos de cada experimento  
60 de captación, con un volumen igual de tampón de muestra 2X SDS-PAGE y se analizó en un gel SDS-PAGE al 15%, se secó, y se expuso a la película como se describió anteriormente. Los cloroplastos expuestos a CTP-PhnO marcada con [<sup>35</sup>S]-metionina contenían la proteína marcada con [<sup>35</sup>S] de un tamaño coherente con la forma de PhnO procesada con CTP prevista, mientras que los cloroplastos expuestos a PhnO marcada con metionina estaban desprovistos de

la proteína marcada. La proteína marcada importada en los cloroplastos también era resistente a las proteasas. Estos resultados indicaron que PhnO podía dirigirse a los cloroplastos cuando estaba fusionada a una secuencia de péptido dirigido a plastidios.

## 5 Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la identificación y caracterización de plantas transformadas con una AMPA aciltransferasa.

10 Una amplia diversidad de especies de plantas ha sido transformada de manera exitosa usando una serie de procedimientos de transformación de plantas bien conocidos en la técnica. En particular, la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el procedimiento de preferencia actualmente en uso, sin embargo, los procedimientos balísticos que aumentan la administración de ADN desnudo directamente a las células de las plantas a través del bombardeo de microproyectiles son también muy eficaces para producir plantas transformadas de manera recombinate. Además, los procedimientos que implican el uso de liposomas, electroporación, compuestos químicos que aumentan la captación de ADN libre, y la transformación usando virus o polen son alternativas que pueden usarse para insertar construcciones de ADN de esta invención en células de plantas. Las plantas que pueden transformarse por medio de la práctica de la presente invención incluyen pero no se limitan a, maíz, trigo, algodón, arroz, soja, remolacha, canola, lino, cebada, colza oleaginosa, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, lechuga, manzana, álamo, pino, eucalipto, acacia, álamo, liquidambar, pino radiata, pino taeda, píce, teca, alfalfa, tréboles y otros cultivos de forrajes, céspedes, palma de aceite, caña de azúcar, plátano, café, té, cacao, manzanas, nueces, almendras, uvas, cacahuets, semillas de legumbres, petunia, caléndulas, vinca, begonias, geranios, pensamiento, impatiens, avenas, sorgo, y mijo. Las moléculas de ADN para uso en la presente invención pueden ser genes nativos o que se presentan naturalmente o genes quiméricos contruidos a partir de secuencias de polinucleótidos útiles incluidos promotores, potenciadores, líderes traducidos o no traducidos, secuencias que codifican péptidos señal, secuencias que codifican péptidos de tránsito, genes estructurales, fusiones de genes estructurales, terminadores, intrones, repeticiones invertidas o repeticiones indirectas, conectores y secuencias de poliadenilación. Las secuencia de ADN contempladas en esta invención incluyen secuencias de polinucleótidos de hebra única o doble, secuencias lineales, y secuencias circulares de polinucleótidos cerradas de manera covalente, plásmidos, bácmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levaduras (YAC), y viral secuencias de ADN y ARN virales. En consideración con la transformación de plantas mediada con *Agrobacterium*, los vectores de transformación de plantas adecuados incluyen los derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, así como los desvelados, por ejemplo por Herrera-Estrella (1983), Bevan (1984), Klee (1985) y la publicación EPO 120.516 (Schilperoort y col.). Además de los vectores de transformación de plantas derivados de los plásmidos Ti o de inducción de raíces (Ri) de *Agrobacterium*, pueden usarse procedimientos alternativos como se describió anteriormente para insertar las construcciones de ADN de esta invención en células de plantas.

Los plásmidos usados para la transformación de plantas se construyeron generalmente a partir de vectores que se habían descrito en otros documentos, en particular en la Patente de EEUU N° 5.463.175 (Barry y col., 1995), que se incorpora en el presente documento por referencia. Los plásmidos se construyeron y mantuvieron en *E. coli* usando resistencia a la aminoglicósido adeniltransferasa *Tn7* (gen aad, denominado comúnmente resistencia a la estreptomycina/espectinomycina o Spc/Str), que es también un determinante para la selección y mantenimiento en *Agrobacterium*. También se usaron otros marcadores seleccionables y de mantenimiento de plásmidos bien conocidos en la técnica para uso en *E. coli*, constituidos esencialmente por genes de neomicina fosfotransferasa, gentamicina acetiltransferasa, y beta lactamasa solos o presentes en combinación en un único replicón o vector. Los plásmidos contienen generalmente *oriV*, un origen de replicación derivado del plásmido de RK2 de gran variedad de huéspedes, y de las secuencias *ori322* y *bom* (origen de replicación para mantenimiento en *E. coli*, y base de la movilidad para la transferencia de conjugación respectivamente) derivadas del plásmido pBR322.

50 Se insertó un gen *phnO* que codifica una AMPA aciltransferasa en casetes de expresión en vectores de transformación de plantas. Estas casetes contienen por lo general los siguientes elementos en orden de secuencia 5' a 3': una secuencia que comprende un promotor funcional de planta, una secuencia que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto o plastidio, un sitio o sitios de clonación contenidos dentro de un policonector, y una región 3' no traducida funcional de planta. Las casetes de expresión se construyen frecuentemente para contener sitios de restricción únicos vecinos al dominio de la casete de manera que la casete completa pueda escindirse de un plásmido y colocarse en otros vectores de plásmidos contruidos de manera similar. Resultan de preferencia los sitios de restricción que comprenden secuencias de reconocimiento de ocho pares de bases y la mayoría de las casetes en la presente invención están flanqueadas al menos en un extremo por un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción *NorI*. Los promotores de preferencia son el promotor del Virus del Mosaico de Figwort, P-FMV (Gowda y col., 1989), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S (Odell y col., 1985), o el promotor 35S de CaMV potenciado (Patente de EEUU N° 5.196.525; Kay y col., 1987). En la bibliografía se ha descrito una serie de otros promotores que son activos en células de plantas. Tales promotores pueden obtenerse de plantas o virus de plantas e incluyen, pero no se limitan a los promotores de la nopalina sintasa (NOS) y de la octopina sintasa (OCS) que son transportados en plásmidos inductores de tumores que se encuentran generalmente dentro de cepas virulentas y no virulentas de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor del virus amarillo de comalina, el promotor del virus baciliforme de ADN de la caña de azúcar, el promotor del virus del moteado clorótico del cacahuete, el promotor de actina del arroz, y el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO). Estos promotores pueden usarse para crear diversos

tipos de construcciones de ADN útiles para la expresión genética en plantas (véase por ejemplo Barry y col. Patente de EEUU N° 5.463.175). Los promotores particularmente deseables que están contemplados por su naturaleza constitutiva son los promotores 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV35S) y 35S del Virus del Mosaico de Figwort (FMV35S) que se ha demostrado previamente que producen altos niveles de expresión en la mayoría de los órganos de las plantas. Otros promotores que podrían dirigir la expresión específica o dirigida a tejidos están también contemplados, por ejemplo en tejido tales como hojas, meristema, flor, fruto y órganos de carácter reproductor. Además, también están contemplados los promotores quiméricos. También se usaron secuencias de poliadenilación y de terminación 3' no traducidas del gen de la nopalina sintasa (NOS 3') y del gen E9 de la ribulosa bisfosfato carboxilasa sintasa del guisante (E9 3').

Las casetes de expresión constituidas por un gen estructural de AMPA aciltransferasa insertado secuencia abajo de un promotor y entre una secuencia que codifica un péptido dirigido al cloroplasto y una secuencia 3' no traducida estaban generalmente presentes en un vector de transformación de plantas. Las casetes de expresión estaban generalmente flanqueadas en cada extremo de la casete por una región de borde derecho del ADN-T de tipo nopalina en un extremo y una región de borde izquierdo en el otro extremo, ambas regiones de borde derivadas de pTiT37 (Fraley y col., 1985). Algunos vectores de transformación de plantas contenían solo la región de borde derecho, necesaria para la iniciación de la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a la célula huésped. La mayoría de los vectores de transformación de plantas también contenían un gen de GOX (glifosato oxidorreductasa), como se describió anteriormente, y en la Patente de EEUU N° 5.463.175. Cuando se insertó en el genoma de la planta, la enzima GOX expresada a partir de estos vectores estaba dirigida generalmente al cloroplasto.

Los vectores de transformación de plantas se movilizaron dentro de la cepa A208 de ABI *Agrobacterium* llevando el plásmido Ti desarmado pTiC58 (pMP90RK) (Koncz and Schell, 1986). El plásmido Ti no lleva los genes del ADN-T de fitohormona que inducen la formación de tumor de cuello. La unión del vector de la planta en la cepa ABI se realizó por el sistema de conjugación triparental usando el plásmido ayudante pRK2013 (Ditta y col., 1980). Como alternativa, el plásmido de transformación de planta puede introducirse en la cepa ABI por electroporación como está descrito por Mattanovich y col. (Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation., *Nucleic Acids Res.* (1989), 17(16), 6747). Cuando se incubaba el tejido de la planta con el conjugado ABI::vector de la planta, el vector recombinante se transfiere a las células de la planta por las funciones *vir* codificadas por el plásmido pTiC58 desarmado. De manera ideal, el vector recombinante se abre en la región del borde derecho del ADN-T, y el ADN entre las secuencias del borde derecho e izquierdo se transfiere de manera direccional y se inserta en el genoma de la planta huésped, aunque puede no transferirse ni insertarse la secuencia completa del vector de transformación de planta recombinante. El plásmido pTiC58 Ti no se transfiere a las células de la planta sino que permanece en el donador *Agrobacterium*.

Pueden regenerarse plantas recombinantes a partir de células de plantas o tejidos de plantas que se han transformado con un gen estructural de AMPA aciltransferasa funcional. La elección del procedimiento para la etapa de regeneración no es crítica, estando disponibles protocolos adecuados para huéspedes de Leguminosae (alfalfa, soja, trébol, etc.), Umbelliferae (zanahoria, apio, chirivía), Cruciferae (repollo, rábano, canola, etc.), Cucurbitaceae (melones y pepino), Gramineae (trigo, arroz, maíz, etc.), Solanaceae (patata, tabaco, tomate, pimientos), y diversos cultivos florales. Véase por ejemplo, Ammirato, 1984; Shimamoto, 1989; Fromm, 1990; y Vasil, 1990). Las plantas recombinantes que han sido transformadas con AMPA aciltransferasa pueden también seleccionarse en medio que contiene AMPA. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración inhibitoria adecuada de AMPA para cualquier huésped particular analizando la toxicidad del AMPA como se describe en el ejemplo 1. Como alternativa, cuando se transforma la AMPA aciltransferasa en plantas previamente transformadas con GOX y seleccionadas para crecer en glifosato, puede usarse tanto AMPA como glifosato como el compuesto de selección para seleccionar los sucesos de transformación que expresan niveles suficientes de la enzima AMPA aciltransferasa. El glifosato debe aplicarse en niveles que de otra manera serían inhibidores para una planta recombinante que expresa GOX y seleccionada para crecer en glifosato, por el nivel aumentado de AMPA que podría producirse como resultado de la degradación del glifosato mediada por GOX. En las plantas que expresan la enzima GOX recombinante se ha mostrado que la exposición a niveles crecientes de glifosato induce el amarilleo o clorosis de las hojas, características de crecimiento atrofiado e infertilidad. La AMPA aciltransferasa expresada de manera coordinada o en combinación con la expresión de GOX pueden solucionar estos efectos perjudiciales. También es posible usar AMPA como un marcador seleccionable de transformación de plantas como una alternativa a la selección con glifosato.

#### Tabaco

Se transformaron plantas de tabaco con un gen *phnO*. Un procedimiento de transformación de discos de hoja de tabaco utilizó tejido sano de una hoja de aproximadamente un mes de edad. Tras una esterilización de superficie de 15-20 minutos con CLOROX™ al 10% más un tensioactivo, se aclararon las hojas tres veces en agua estéril. Se perforaron los discos de las hojas con una perforadora de papel estéril, y se colocaron al revés en medio MS 104 (sales MS 4,3 g/l, sacarosa 30 g/l, vitaminas B5 500X 2 ml/l, NAA 0,1 mg/l, y BA 1,0 mg/l), y se precultivaron durante un día. A continuación se inocularon los discos con un cultivo nocturno diluido 1:5 de *Agrobacterium* ABI desarmada conteniendo el vector del tema (la densidad del cultivo final fue de aproximadamente DO 0,6 según se determina a 550 nm). La inoculación se realizó colocando los discos en tubos de centrifuga estériles junto con el cultivo. Tras treinta a sesenta segundos, se drenó el líquido y se transfirieron los discos entre papel de filtro estéril. A continuación se colocaron los discos al revés en un disco de filtro en placas de cultivo MS 104 y se incubaron durante 2-3 días. Tras este período de cocultivo, se transfirieron los discos, aún al revés, a placas de selección que contenían medio

## ES 2 325 874 T3

MS 104. Tras 2-3 semanas, se formaron callos, y los grupos individuales se separaron de los discos de hojas. Los brotes se cortaron limpiamente del callo cuando eran suficientemente grandes para distinguirlos de tallos. Los brotes se colocaron en medio de enraizado libre de hormonas (MSO: sales MS 4,3 g/l, sacarosa 30 g/l, y vitaminas B5 500X 2 ml/l) con selección. Las raíces se formaron en 1-2 semanas. Cualquiera de los ensayos de callos de hojas se realiza de preferencia en brotes enraizados mientras están estériles. Los brotes enraizados se colocaron en la tierra y se mantuvieron en un medio de alta humedad (es decir: recipientes o bolsas de plástico). Los brotes se endurecieron exponiéndolos gradualmente a condiciones de humedad ambiental.

Se seleccionaron tres sucesos de transformación de tabaco, denominados líneas 33476, 36779 y 37235 para otro análisis. pMON17226 (Barry y col., Patente de EEUU N° 5.463.175, 1995) se usó para producir la línea 33476 de la planta que contiene una construcción del gen FMV-CTP-GOX. Las líneas 36779 y 37235 se produjeron usando pMON17261, que es un plásmido derivado de pMON17226 que contiene la casete *NotI* que contiene la secuencia del gen FMV-CTP-PhnO (SEC. ID N°: 11) además de FMV-CTP-GOX. La casete *NotI* se construyó de la siguiente manera. Se escindió la secuencia que codifica CTP, representada por SEC. ID N°: 9, de pMON17058 como un fragmento de *BgIII* hasta *NcoI* y se insertó en pMON15028, formando una secuencia representada por SEC. ID N°: 11 en la que la secuencia que codifica CTP estaba arriba y en marco con la secuencia codificadora de PhnO representada dentro de SEC. ID N°: 7. La construcción resultante se denominó pMON15029. Se escindió la secuencia codificadora de CTP-PhnO de pMON15029 en un fragmento de *BgIII* hasta *SacI* y se combinó con fragmentos de pMON17063 para producir pMON15038. pMON17063 se desmontó usando digestión de restricción para proporcionar las partes necesarias para la construcción de pMON15038. pMON17063 se dirigió con *SacI* y *HindIII* para producir una estructura de vector en la que se insertó un fragmento promotor y la secuencia CTP-PhnO. pMON17063 también se dirigió en una reacción separada con *HindIII* y *BgIII* para producir un fragmento que contiene una secuencia del promotor FMV. El fragmento del promotor y el fragmento de CTP-PhnO se unieron juntos en una reacción junto con el fragmento de estructura del vector para producir pMON15038, que contiene una casete *NotI* que lleva una secuencia que codifica un péptido PhnO dirigido al cloroplasto expresado de un promotor de FMV y flanqueado secuencia abajo por una secuencia de poliadenilación y de terminación de la transcripción NOS 3' E9. Esta secuencia *NotI* se escindió de pMON15038 y se insertó en un sitio único de *NotI* en pMON17241 para producir pMON17261, que contiene una secuencia codificadora de GOX dirigida al cloroplasto expresada de un promotor de FMV flanqueada secuencia abajo por una secuencia E9 3', junto con una secuencia codificadora de CTP-PhnO y la casete de expresión. Se espera que los sucesos de transformación derivados de este vector no solo sean resistentes al glifosato, sino que proporcionen también resistencia a la fitotoxicidad del AMPA. Se analizó la presencia de genes que codifican glifosato oxidoreductasa y AMPA aciltransferasa por PCR, la presencia enzimas GOX y PhnO por transferencia western y la presencia de metabolitos producidos como un resultado de la degradación de [<sup>14</sup>C]-glifosato por HPLC en las líneas 36779 y 37235 derivadas de pMON17261.

La línea 33476, obtenida como un suceso de transformación derivado de pMON17226, se seleccionó como un control de "solo GOX". Las líneas 36779 y 37235 demostraron diferentes fenotipos tras la exposición al glifosato y se seleccionaron como sucesos resistentes al glifosato surgidos tras la transformación con pMON17261. La línea 37235 se blanqueó o se amarilleó tras la exposición al glifosato, mostrando un fenotipo similar a la línea 33476 de solo GOX. Sin embargo, la línea 36779 no exhibió tal efecto de blanqueado. Se extrajo ADN del tejido de la hoja para cada uno de estos sucesos como para la hoja de tabaco Samsun de tipo salvaje, y se sometió a PCR para determinar la presencia o ausencia del gen *phnO* transformante.

El ADN genómico aislado de las líneas de tabaco transformadas se usó como el ADN molde ADN en una reacción de PCR y los productos de reacción se compararon con el tabaco Samsun de tipo salvaje. Las reacciones de PCR estaban constituidas por un volumen total de 50 microlitros conteniendo tampón de amplificación 10X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mezcla de desoxinucleótidos con cada uno a una concentración 1 mM, ADN genómico 50-100 ng, cebadores, cada uno a una concentración final de 16,8 pM, y 1,5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq (Cetus/Perkin Elmer). Los cebadores (sintetizados según lo especificado por GENOSYS) estaban constituidos por las secuencias según se exponen en SEC. ID N°: 21 y SEC. ID N°: 22. SEC. ID N°: 21 es una secuencia de 20 pares de bases capaz de cebar la síntesis de la secuencia del gen *phnO* de P2A (SEC. ID N°: 7) e hibrida con los primeros veinte nucleótidos de la secuencia codificadora en ese gen. SEC. ID N°: 22 es también una secuencia de 20 pares de bases, pero es capaz de cebar la síntesis de un gen de *phnO* de la secuencia codificadora terminal en la región codificadora estructural e hibrida con los veinte nucleótidos terminales de la secuencia que codifica PhnO. Las condiciones de amplificación estaban constituidas por tres ciclos de 97°C durante un minuto, 60°C durante dos minutos, y 72°C durante dos minutos, seguidos por 37 ciclos de 94°C durante un minuto, 60 durante dos minutos, y 72°C durante dos minutos, seguidos generalmente por un remojo a 4°C. Se analizaron muestras de 10 microlitros generalmente por electroforesis en gel de TAE agarosa al 1% para resolver las bandas relevantes de los cebadores residuales. Tras la tinción con bromuro de etidio de los geles del producto, apareció un producto de amplificación del gen *phnO* de aproximadamente 432 pares de bases según se evalúa por la posición de migración frente a los marcadores lambda de peso molecular digeridos con *HindIII* sólo en los extractos de la línea 33779, indicando la presencia del gen *phnO* en esa línea.

Se obtuvieron semillas de los sucesos de transformación Ro tras el autocruzamiento en condiciones de cámara de crecimiento. Se curaron las semillas Ro y se plantaron para generar la progenie R1. Las hojas fuente de la progenie R1 en el estadio de cinco hojas se expusieron a [<sup>14</sup>C]-glifosato salpicando una muestra de 2 microlitros en cada vena (50 microlitros de sal de Na+ de [<sup>14</sup>C]-glifosato, 517.000 dpm/microgramo, 0,42 microgramo/microlitro mezclados con 10 microlitros de glicerol). Cada hoja recibió varias manchas según el número de venas en la hoja. Tres días más tarde se aplicaron otras 15 manchas de 2 microlitros a cada hoja. Dos semanas más tarde, se aplicaron cinco

manchas de 2 microlitros a cada una de dos hojas en cada planta. Éstas eran hojas nuevas y no eran las hojas viejas a las que se les había aplicado glifosato inicialmente. Cinco días después de la última aplicación, se tomaron muestras de 300 miligramos de tejido de dos hojas inferiores en cada planta. Las muestras de cada planta se homogeneizaron en volúmenes de 1 ml de agua desionizada separados, se centrifugaron a 9.000 rpm en una microcentrífuga y los volúmenes acuosos se recogieron y se almacenaron en hielo. Los extractos se analizaron por HPLC para evidenciar la presencia de metabolitos marcados con [<sup>14</sup>C] como en el Ejemplo 2. El extracto obtenido de la línea 33476 (GOX) contenía sólo [<sup>14</sup>C]-AMPA. El extracto obtenido de la línea 37235 contenía [<sup>14</sup>C]-glifosato no metabolizado así como una cantidad medible pero traza de [<sup>14</sup>C]-AMPA. En extracto obtenido de la línea 36779 sólo se observó N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Estos resultados son coherentes con los datos de PCR que indicaron que la línea 36779 contenía al menos una copia del gen *phnO*. Además, la falta de efecto de blanqueado en la línea 36779 tras la exposición al glifosato es coherente con la presencia de enzimas GOX y PhnO funcionales y la ausencia de [<sup>14</sup>C]-AMPA detectable.

### Algodón

Se transformó un gen *phnO* recombinante en la variedad de algodón Coker 312 (*Gossypium hirsutum* L.). Las líneas de algodón tolerantes al glifosato se produjeron por transformación de plantas mediadas por *Agrobacterium* usando vectores de plásmidos binarios de doble borde que contenían (1) *gox*, un gen de la cepa LBAA de *Achromobacter* *sp.* que codifica una enzima que metaboliza el glifosato, la glifosato oxidorreductasa (GOX), (2) el gen *gox* y un gen *phnO* de *E. coli* que codifica PhnO, o (3) la construcción del gen doble *goxphnO* junto con un gen de la cepa CP4 de *Agrobacterium* que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Todos los vectores son capaces de replicar tanto en huéspedes de *Agrobacterium tumefaciens* como de *E. coli*, y contienen un gen de aminoglicósido adeniltransferasa (*aad*) que confiere resistencia a los aminoglicósidos tales como la espectinomicina o la estreptomycinina y proporcionan un procedimiento para el mantenimiento de plásmidos.

pMON17241 contiene un gen recombinante constituido por un promotor 35 S FMV unido en posición 5' a la secuencia del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (SSU1A) de *Arabidopsis thaliana* que codifica un péptido dirigido a plastidios o cloroplastos (Timko y col., 1988) que está unido de manera traduccional a una secuencia codificadora del gen *gox*, que está unida en posición 3' a una región 3' no traducida, denominada E9, de un gen de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa del guisante.

pMON17213 es un vector de transformación de plantas de doble gen que contiene casetes de expresión que comprenden (1) un promotor 35S FMV unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido a cloroplastos de EPSPS *Arabidopsis thaliana* unida en marco a una secuencia codificadora de EPSPS de la cepa CP4, que está unida en posición 3' a una región 3' no traducida E9; y (2) un promotor 35S FMV unido a una secuencia del gen SSU1A que codifica un péptido dirigido a plastidio unido en marco a una secuencia codificadora de GOX, que está unida en posición 3' a una secuencia de terminación NOS 3'.

pMON17261, descrito anteriormente, un vector de transformación de plantas de doble gen que contiene casetes de expresión que comprenden (1) un promotor 35S FMV unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido a cloroplastos SSU1A unida en marco a una secuencia codificadora de GOX, que está flanqueada secuencia abajo por la región 3' no traducida E9; y (2) un promotor 35S FMV unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido al cloroplasto SSU1A (SEC. ID N°: 9) unida en marco a una secuencia codificadora de PhnO (SEC. ID N°: 7) que está unida en posición 3' a una secuencia NOS 3'.

pMON10151 un vector de transformación de plantas de doble gen que contiene casetes de expresión que comprenden (1) un promotor 35S FMV unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido a cloroplastos SSU1A (SEC. ID N°: 9) unida en marco a una secuencia codificadora de PhnO (SEC. ID N°: 7), que está flanqueada secuencia abajo por una secuencia NOS 3'; y (2) un promotor 35S potenciado unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido al cloroplasto SSU1A unida en marco a una secuencia codificadora de GOX que está flanqueada secuencia abajo por una secuencia NOS 3'.

pMON10149 es un vector de transformación de plantas de triple gen que contiene casetes de expresión que comprenden (1) un promotor 35S FMV y una secuencia líder 5' no traducida HSP70 de petunia unida a una secuencia que codifica un péptido dirigido a cloroplastos SSU1A unida en marco a una secuencia codificadora de EPSPS, que está flanqueada secuencia abajo por la secuencia de poliadenilación y terminación E9 3'; (2) un promotor 35S FMV unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido al cloroplasto SSU1A (SEC. ID N°: 9) unida en marco a una secuencia codificadora de PhnO (SEC. ID N°: 7), que está flanqueada secuencia abajo por una secuencia NOS 3'; y (3) un promotor 35S de CaMV potenciado unido a una secuencia que codifica un péptido dirigido al cloroplasto SSU1A unida en marco a una secuencia codificadora de GOX que está flanqueada secuencia abajo por una secuencia de poliadenilación de nopalina sintasa 3' (NOS 3').

Los vectores de plásmidos se montaron en cepas K12 de *E. coli* y se unieron en una cepa ABI de *Agrobacterium* desarmada. Se usaron cepas de *Agrobacterium* resistentes a aminoglicósidos para transformar secciones de hipocótilos derivados de Coker 312 con modificaciones como está descrito por Umbeck y col. (1987) y Umbeck (Patente de EEUU N° 5.159.135 (1992), incorporada en el presente documento por referencia), excepto en que las plantas se regeneraron con las modificaciones descritas por Trolinder y Goodin (1987). La selección por resistencia al glifosato produjo varias líneas de callo de algodón, que posteriormente se determinó por PCR del ADN genómico que contenían los genes respectivos que codifican EPSPS, GOX o PhnO transferidos de *Agrobacterium*. Además, se determinó por análisis de

## ES 2 325 874 T3

transferencia Western que estas mismas líneas de callos expresaban los genes deseados. Tras la regeneración de las plantas, se recogieron las plantas de algodón completas que contenían las secuencias codificadoras indicadas.

Se determinó que las plantas transformadas con una casete de resistencia al glifosato de doble gen que comprendía genes que codifican EPSPS y GOX previamente identificadas eran resistentes al glifosato cuando se aplicaba a 3,36 kg/ha (48 onzas por acre) a lo largo de un estadio de 6-7 hojas, sin embargo se observó un blanqueado importante de las hojas. Se presume que este efecto fitotóxico se debió a la formación de AMPA como un resultado de la degradación de glifosato mediada por GOX. Para probar esto, se pulverizó AMPA en tres tasas diferentes sobre plantas Coker 312 de tipo salvaje. Se observó clorosis de las hojas y crecimiento atrofiado en las plantas a los 4 días posteriores a la aplicación del glifosato a 44,80 kg/ha (640 onzas por acre) y a los ocho días posteriores a la aplicación de 4,48 kg/ha (64 onzas por acre). Estos resultados sugirieron que el efecto fitotóxico observado en las líneas de plantas de algodón transformadas con EPSPS/GOX era el resultado de la producción de AMPA mediada por GOX en las plantas, y que el efecto fitotóxico podía obviarse por medio de la expresión de una AMPA aciltransferasa junto con GOX. Para probar esto, se trataron plantas de algodón que expresaban GOX o GOX más EPSPS solas o en combinación con la expresión de PhnO con [<sup>14</sup>C]-glifosato, y se controló el metabolismo del glifosato marcado con el isótopo en el tejido de las hojas siete días después de la aplicación.

La línea 4416 de algodón Coker 312 recombinante resistente al glifosato se seleccionó como una línea de algodón resistente al glifosato tras la transformación con pMON10149, un vector de transformación de plantas de doble borde mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de triple gen que contiene EPSPS, GOX, y PhnO dirigidas al cloroplasto, cada una expresada independientemente a partir de promotores 35S separados. De las semillas R2 surgieron varias plantas 4416 R3. Se trató una hoja de cada plántula en el estadio de tres o cuatro con la mezcla de herbicida comercial ROUNDUP ULTRA™ (Lote N° GLP9701-7428-F) que se había fortificado con [<sup>14</sup>C]-glifosato (Código N° C-2251). Se mostró que el ROUNDUP ULTRA™ era 30,25% ácido de glifosato en peso y el [<sup>14</sup>C]-glifosato tenía una pureza radioquímica de 97,3% y una actividad específica de 36,36 mCi/mmol. La disolución de tratamiento estaba constituida por aproximadamente 38 µl conteniendo 1,60 x 10<sup>6</sup> dpm con una actividad específica de [<sup>14</sup>C]-glifosato de 1,713 x 10<sup>3</sup> dpm/µg de ácido de glifosato. Tres o siete días tras la aplicación tópica se aclararon las hojas tratadas con agua, se congelaron en nitrógeno líquido, se fracturaron con una espátula y a continuación se trituraron en una trituradora de tejidos TEKMAR™ en 10 ml de agua. Se ajustó el pH de los extractos de hojas hasta 3,5-4,0 con HCl 1 N y se analizó la presencia de metabolitos marcados con [<sup>14</sup>C] en aproximadamente 4-8000 dpm por HPLC con recogida y detección del en vial de centelleo líquido (HPLC/LSC) como se describe en el ejemplo 2. El nuevo crecimiento, incluidos el meristema y las hojas nuevas que surgieron tras la aplicación tópica también se extrajeron y analizaron para evidenciar metabolitos marcados con [<sup>14</sup>C]. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13

*Metabolismo del [<sup>14</sup>C]-glifosato en algodón resistente al glifosato*

| Línea<br>4416<br>planta N° | % de metabolito marcado con<br>[ <sup>14</sup> C] en extracto de hojas<br>tratadas con glifosato...* |      |                   | % de metabolito marcado con<br>[ <sup>14</sup> C] en extracto de crecimientos<br>nuevos...* |      |                   |
|----------------------------|--|------|-------------------|---|------|-------------------|
|                            | Glifosato  | AMPA | N-Acetil-<br>AMPA | Glifosato   | AMPA | N-Acetil-<br>AMPA |
| MD03                       | 55,2   | 2,5  | 37,4              | nd**  | nd   | 93,4              |
| MD04                       | 94,6   | 2,1  | 1,7               | 97,9  | nd   | nd                |
| A01                        | 48,6   | 2,1  | 44,7              | 0,9   | 0,2  | 95,8              |
| A02                        | 67,3   | 2,0  | 29,1              | 0,7   | 0,2  | 96,5              |
| A03                        | 48,8   | 2,0  | 43,4              | 1,2   | nd   | 94,0              |
| A04                        | 19,4   | 1,6  | 73,9              | 1,5   | nd   | 94,0              |
| A05                        | 59,9   | 2,2  | 31,1              | 2,2   | 0,2  | 95,2              |
| A06                        | 38,2   | nd   | 60,9              | 1,5   | 0,2  | 93,5              |
| A07                        | 64,1   | nd   | 26,8              | 1,4   | 0,5  | 93,9              |
| A08                        | 90,9   | 2,0  | 1,9               | 91,2  | 2,5  | 1,9               |

\* [<sup>14</sup>C]-Glifosato, [<sup>14</sup>C]-AMPA, y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA como un porcentaje del isótopo [<sup>14</sup>C] total observado por HPLC/LSC en cada muestra.

\*\* nd indica que el metabolito no se detectó por HPLC/LSC

El análisis de las hojas tratadas con glifosato aclaradas con agua indicó la presencia de niveles significativos de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA en ocho de las diez plantas probadas. Estos niveles representaron el 27-74% del isótopo extraído de las hojas tratadas. La actividad restante fue casi completamente [<sup>14</sup>C]-glifosato. Muy poco isótopo [<sup>14</sup>C] estaba presente como [<sup>14</sup>C]-AMPA. Las dos plantas restantes tenían una capacidad muy limitada para metabolizar el glifosato como lo indican los altos niveles de [<sup>14</sup>C]-glifosato restantes sobre o en las hojas. Una de estas plantas también mostró signo de atrofia siete días después del tratamiento, indicando fitotoxicidad por glifosato.

El análisis del crecimiento nuevo en las diez plantas probadas mostró que la forma predominante de metabolito marcado con [<sup>14</sup>C] presente era N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA en más del 90% del radioisótopo total en las muestras. En contraste, más del 90% del isótopo en las dos plantas restantes estaba en la forma de [<sup>14</sup>C]-glifosato, coherente con el análisis del extracto de la hoja de tratamiento para estas dos plantas.

También se estudió el metabolismo del [<sup>14</sup>C]-glifosato en líneas de algodón recombinante 4268 (GOX/PhnO) y 3753 (EPSPS/GOX). Las plantas en este estudio se trataron como se indicó anteriormente para la línea de algodón 4416, aplicando pequeñas gotas de ROUNDUP ULTRA fortificado con [<sup>14</sup>C]-glifosato a una única hoja en cada planta en el estadio de tres a cuatro hojas. Las hojas tratadas se recogieron y se aclararon con agua, a continuación se trituraron y extrajeron, y los extractos se analizaron por HPLC como se describió anteriormente para evidenciar la presencia de [<sup>14</sup>C]-glifosato, [<sup>14</sup>C]-AMPA, y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. También se extrajeron y analizaron crecimientos nuevos, incluidos el meristema y hojas nuevas que surgieron después de la aplicación. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

TABLA 14

*Metabolismo del [<sup>14</sup>C]-glifosato en algodón resistente al glifosato*

| Planta                   | % de metabolito marcado con [ <sup>14</sup> C] en extracto de hojas tratadas con glifosato... |      |               | % de metabolito marcado con [ <sup>14</sup> C] en extracto de crecimientos nuevos... |      |               |
|--------------------------|---|------|---------------|--|------|---------------|
|                          | Glifosato   | AMPA | N-Acetil-AMPA | Glifosato  | AMPA | N-Acetil-AMPA |
| <b>Plantas GOX/PhnO</b>  |   |      |               |  |      |               |
| B01                      | 76,7  | 3,0  | 14,0          | 3,4  | 1,0  | 89,9          |
| B02                      | 63,9  | 4,8  | 25,0          | 1,1  | 1,5  | 91,5          |
| B03                      | 54,4  | 3,2  | 36,4          | 0,8  | nd   | 94,7          |
| B04                      | 58,3  | 5,7  | 28,9          | 1,1  | 1,2  | 91,0          |
| <b>Plantas EPSPS/GOX</b> |   |      |               |  |      |               |
| C01                      | 59,8  | 26,6 | nd            | 3,72   | 85,7 | nd            |
| C02                      | 92,7  | 2,1  | 0,8           | 92,8   | 0,8  | nd            |
| C03                      | 81,2  | 10,7 | nd            | 13,5   | 72,0 | 1,9           |
| C04                      | 86,2  | 6,4  | 1,0           | 13,9   | 76,2 | nd            |

\* [<sup>14</sup>C]-Glifosato, [<sup>14</sup>C]-AMPA, y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA como un porcentaje del isótopo [<sup>14</sup>C] total observado por HPLC/LSC en cada muestra.

\*\* nd indica que el metabolito no se detectó por HPLC/LSC

Niveles significativos de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA estaban presentes en las hojas tratadas de las cuatro plantas de la línea 4268 plantas (GOX/PhnO; B01-B04). En contraste, el N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA no era detectable en los extractos obtenidos de las plantas de la línea 3753 (EPSPS/GOX; C01-C04). Tres de estas plantas contenían niveles significativos de [<sup>14</sup>C]-AMPA en los extractos de hojas tratadas, variando desde 6 hasta 27%. Una planta de la línea 3753 fue deficiente en la conversión de [<sup>14</sup>C]-glifosato en N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA, y esta planta también pareció estar atrofiada.

90-95% del isótopo [<sup>14</sup>C] en los extractos de crecimiento nuevo de las plantas de la línea 4268 se determinó que estaba en la forma de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Sin embargo, se determinó que el 72-86% del isótopo [<sup>14</sup>C] en los extractos de crecimiento nuevo de tres de las plantas de la línea 3753 era [<sup>14</sup>C]-AMPA, representando el [<sup>14</sup>C]-glifosato el resto de isótopo en estos tejidos. Se determinó que el 93% del isótopo obtenido de la planta número C02 de la línea 3753 era [<sup>14</sup>C]-glifosato, coherente con la falta de metabolismo del glifosato en la hoja de aplicación así como con la atrofia observada. Además, las regiones de crecimiento de todas las plantas de la línea 3753 estaban descoloridas o amarillas tras el tratamiento, pero mejoraron con el tiempo. En la recogida, las hojas de nuevo crecimiento se volvieron moteadas.

Estos resultados son coherentes con la presencia de productos activos de genes *gox* y *phnO* en las plantas indicadas. Las proteínas GOX y PhnO están metabolizando el glifosato a AMPA y N-acetil-AMPA en la manera prevista, y los

## ES 2 325 874 T3

extractos de las plantas de la línea 4268 proporcionan un patrón metabólico similar al observado con los extractos de las plantas de la línea 4416 como se evalúa por HPLC y por la observación fenotípica. En ambas líneas, el producto [<sup>14</sup>C] predominante en los extractos de tejido de nuevo crecimiento tras la aplicación del [<sup>14</sup>C]-glifosato es N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. La fitotoxicidad observada por la decoloración de las hojas de las plantas en la línea 3753 tras la aplicación del glifosato está asociada con la falta de una actividad AMPA N-aciltransferasa. En contraste, la presencia de una actividad AMPA N-aciltransferasa en ambas líneas de plantas, 4416 y 4268, dio como resultado una falta de los efectos fitotóxicos observados en las plantas de la línea 3753.

### Canola

Las plantas de canola se transformaron con los vectores pMON17138 y pMON17261 y se obtuvieron un número de líneas de plantas de la canola transformada que exhibieron tolerancia al glifosato. Las plantas se transformaron según el procedimiento descrito en Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.633.435). Brevemente, se cultivaron plantas de *Brassica napus* variedad Westar en condiciones controladas de cámara de cultivo como se describen. Se extrajeron cuatro internodos terminales de las plantas justo antes de la floración o de las plantas en el proceso de floración pero antes de florecer y se esterilizaron en superficie en etanol al 70% v/v durante un minuto, a continuación en hipoclorito de sodio al 2% p/v durante veinte minutos, a continuación se aclararon tres veces con agua destilada, desionizada y estéril. Los tallos con hojas unidas podían refrigerarse en bolsas de plástico húmedas durante hasta tres días previo a la esterilización. Se cortaron seis a siete segmentos de tallos en discos de 5 mm con un Redco Vegetable Slicer 200 manteniendo la orientación del extremo basal. Se inocularon los discos de tallos (explantos) con 1 mililitro de cepa A208 de *Agrobacterium tumefaciens* ABI que contenía un plásmido de transformación de plantas recombinante preparado como se describió anteriormente. Los explantes se colocaron del lado basal hacia abajo en placas de petri que contenían sales MS convencionales 0,1 X, vitaminas B5, sacarosa al 3%, agar al 0,8%, pH 5,7, BA (6-benciladenina) 1 mg/l. Se añadió a las placas 1,5 ml de medio que contenía sales MS convencionales, vitaminas B5, sacarosa al 3%, pH 5,7, ácido p-clorofenoxiacético 4 mg/l, cinetina 0,005 mg/l y se cubrieron con papel de filtro estéril.

Tras un cocultivo de 2,3 días, se transfirieron los explantes a placas de petri profundas (siete explantes por placa) que contenían sales MS, vitaminas B5, sacarosa al 3%, agar al 0,8%, pH 5,7, BA 1 mg/l, carbenicilina 500 mg/l, cefotaxima 50 mg/l, kanamicina 200 mg/l o gentamicina 175 mg/l para selección, y se transfirieron tras tres semanas a medio fresco, cinco explantes por placa. Los explantes se cultivaron en una sala de cultivo a 25°C con luz continua (Blanca Fría). Tras otras tres semanas, se escindieron los brotes de los explantes, y se iniciaron los ensayos de regeneración de callos de hojas para confirmar la modificación de los brotes R<sub>0</sub>. Se colocaron tres pequeñas porciones de tejido de hoja en el medio de regeneración de callos que contenía sales MS, vitaminas B5, sacarosa al 3%, agar al 0,8%, pH 5,7, BA 5 mg/l, ácido naftalenacético (NAA) 0,5 mg/l, carbenicilina 500 mg/l, cefotaxima 50 mg/l, kanamicina o gentamicina 200 mg/l o glifosato 0,5 mM. Los ensayos de hojas se incubaron en una sala de cultivo bajo las mismas condiciones que el cultivo de explantes. Tras otras tres semanas, los ensayos de regeneración de callos de hojas se puntuaron para tolerancia al herbicida (callo o tejido de hoja verde) o sensibilidad (blaqueado).

Se sumergió cada tallo de brote en ROOTONE en el momento de la escisión, se colocaron en un recipiente de 5,1 cm (dos pulgadas) que contenía Metro-MIX 350, y se mantuvieron en un ambiente húmedo cerrado en una cámara de cultivo a 24°C, con períodos de luz de 16/8 horas, 400 uE por metro cuadrado por segundo (lámparas de alta intensidad "HID") durante un período de endurecimiento de aproximadamente tres semanas.

El plásmido pMON17138 es un vector de borde único de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* mantenido en la bacteria por selección en estreptomycin o espectinomycin. pMON17138 contiene un único borde derecho Ti vecino al extremo 3' de los elementos genéticos que se desea transferir en el genoma de la planta. Este vector contiene dos casetes de expresión funcionales de plantas. Una casete está comprendida por un promotor 35S de caulimovirus que dirige la expresión de un gen de neomicina fosfotransferasa (*nptII*), flanqueado secuencia abajo por una secuencia de poliadenilación y determinación de la transcripción de la nopalina sintasa 3' (NOS 3'). La otra casete está comprendida por un promotor del Virus del Mosaico de Figwort (descrito en Rogers, Patente de EEUU N° 5.678.319) secuencia arriba de una secuencia de poliadenilación y de terminación de la transcripción de la subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa del guisante. Una secuencia codificadora de glifosato oxidoreductasa (GOX) dirigida al cloroplasto se inserta entre el promotor y la secuencia 3' del guisante.

El plásmido pMON17261 es un vector de doble borde de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* similar al pMON17138. Una casete que codifica la GOX dirigida al cloroplasto idéntica a la de pMON17138 está presente secuencia abajo de un borde derecho de Ti, y secuencia arriba de otra casete expresión funcional de planta que comprende un promotor del Virus del Mosaico de Figwort (P-FMV) unido a una secuencia NOS 3'. Una secuencia que codifica la PhnO dirigida al cloroplasto se inserta entre las segundas secuencias de P-FMV y NOS 3'.

Las plantas R<sub>1</sub> derivadas de los sucesos de transformación usando pMON17261 y pMON17138 se evaluaron usando una prueba de pulverización de glifosato descrita en Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.633.435).

### Maíz

También se ha introducido un gen de AMPA aciltransferasa en células del maíz de la línea Black Mexican Sweet con expresión del gen y resistencia al glifosato detectada en el callo. Se transformó el tejido del callo según un proce-

dimiento descrito en Barry y col. (Patente de EEUU N° 5.463.175). Se usaron diversos plásmidos para introducir genes de resistencia al glifosato que codifican GOX y EPSPS en combinación con un gen de AMPA aciltransferasa en las células de maíz. Estos plásmidos diferían uno del otro con respecto a los promotores usados, a las secuencias de péptidos dirigidos a cloroplastos o plastidios usadas, a las secuencias líder no traducidas usadas, a la presencia o ausencia de un intrón, y al tipo de terminador 3' usado, sin embargo todos los plásmidos contenían un gen de AMPA aciltransferasa obtenido sintéticamente que codifica la PhnO que contiene la mutación P2A. El gen sintético se construyó a partir de tres secuencias de polinucleótidos más pequeñas sintetizadas para Monsanto y caracterizadas por la presencia de la secuencia codificadora de ADN y la traducción de la secuencia de aminoácidos deseados por Stratagene, Inc., La Jolla, CA. El gen que no se presenta en la naturaleza se montó a partir de tres secuencias más pequeñas que comprenden las SEC. ID N°: 16, SEC. ID N°: 17, y SEC. ID N°: 18, en el que el gen completamente montado está representado por SEC. ID N°: 19, y está presente en cada uno de los plásmidos usados para la transformación de callos del maíz. La secuencia codificadora del gen que no se presenta en la naturaleza se estableció basándose en el procedimiento descrito en Fishhoff y col. en la Patente de EEUU N° 5.500.365 en el que se usaron codones de monocotiledóneas de preferencia en lugar de los preferidos por *E. coli*. El gen completamente montado codifica una proteína PhnO de longitud total idéntica a la secuencia de la proteína nativa con la excepción de la mutación P2A introducida por PCR usando SEC. ID N°: 5 y SEC. ID N°: 6 para generar los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción adecuados en los extremos vecinos de la secuencia codificadora. Los plásmidos que se usaron en la generación de los datos de callos de maíz se muestran en la Tabla 15 junto con las diferencias con respecto a elementos genéticos vecinos a la secuencia codificadora de la AMPA aciltransferasa.

TABLA 15

*Plásmidos de transformación de callos del maíz y elementos genéticos relevantes*

| Plásmido  | Elementos genéticos relevantes*  |
|-----------|--|
| pMON32926 | [Pe35S / I-Zm.Hsp70 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX → EPSPS             |
| pMON32931 | [Pe35S/ I-Zm.Hsp70 / phnO / T-At.Nos] → GOX → EPSPS                    |
| pMON32932 | [Pe35S/ I-Zm.Hsp70 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX → EPSPS              |
| pMON32936 | [P-Os.Act1 / I-Os.Act1 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX → EPSPS          |
| pMON32938 | [P-Os.Act1 / I-Os.Act1 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX → EPSPS          |
| pMON32946 | [Pe35S / L-Ta.Cab / CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX → EPSPS             |
| pMON32947 | [Pe35S / L-Ta.Hsp70 / CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX → EPSPS           |
| pMON32948 | EPSPS → [Pe35S / I-Zm.Hsp70 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX             |
| pMON32950 | EPSPS → [Pe35S / I-Zm.Hsp70 / CTP / phnO / T-At.Nos] → GOX             |
| pMON32570 | EPSPS → [Pe35S / L-Ta.Cab / I-Os.Act1 / CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX |
| pMON32571 | EPSPS → [Pe35S / L-Ta.Cab / I-Os.Act1 / CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX |
| pMON32572 | EPSPS [Pe35S / L-Zm.Hsp70 / I-Os.Act 1/ CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX |
| pMON32573 | EPSPS [Pe35S / L-Ta.Cab / I-Os.Act1 / CTP / phnO / T-Ta.Hsp70] → GOX   |

\* Elementos genéticos contenidos dentro de las casetes de expresión de PhnO según se indican en cada plásmido. Los elementos se muestran en el orden en que aparecen en el plásmido, junto con la presencia de otros genes que codifican resistencia a herbicidas, si están presentes, vecinos a la casete de expresión de PhnO.

→ indica la dirección de transcripción de cada gen o genes vecinos a la casete de expresión de PhnO. En el texto se describe los elementos individuales.

Los promotores que se utilizaron incluyeron el promotor e35S de CaMV y el promotor de actina del arroz (P-Os.Act1). Los intrones que se utilizaron incluyeron los obtenidos de genes de plantas tales como Hsp70 del arroz (I-Zm.Hsp70) y actina del arroz (I-Os.Act1). Las secuencias líder no traducidas que se utilizaron incluyeron la proteína de unión a la clorofila a/b del trigo (L-Ta.Cab) y Hsp70 del maíz (L-Zm.Hsp70). Las secuencias de poliadenilación y terminación que se utilizaron incluyeron NOS 3' de *Agrobacterium tumefaciens* (T-At.Nos) y Hsp70 del trigo (T-Ta.Hsp70). En todas las casetes de expresión de PhnO se utilizó la misma secuencia de dirección al cloroplasto, representada por SEC. ID N°: 9.

Se utilizó un ensayo del metabolismo del [<sup>14</sup>C]-glifosato usado para determinar si los tejidos de callos de maíz transformados contenían formas funcionantes de estas enzimas. El ensayo se desarrolló para analizar grandes cantidades de muestras de callos de maíz. El callo se obtuvo de los grupos de transformación de maíz Monsanto Company y Dekalb Seed Company. Las muestras de callo de Monsanto, denominadas individualmente como líneas de callo "19nn-nn-nn" en la Tabla 16, se produjeron a partir de embriones de maíz HI II X B73. Las muestras de callos se bombardearon con ADN de plásmido del vector de transformación de planta recombinante circular completo cerrado de manera covalente o con fragmentos de ADN lineal aislados de tales plásmidos 25-50 días tras el aislamiento de los embriones. Las líneas transformadas se identificaron 8-14 semanas después del bombardeo. Estas líneas se subcultivaron en medio fresco cada 2 semanas y tenían 5-7 meses de edad cuando se usaron en el ensayo de metabolismo. Las líneas de callos Dekalb OO, OR, OW, OX, y OY se obtuvieron a partir de embriones HI II x AW. Todas las denominaciones de las líneas corresponden al plásmido recombinante o al fragmento lineal usado para la transformación balística del tejido de callo como se indica en la leyenda para la Tabla 16.

Se obtuvieron 4,5 mCi de N-fosfona-[<sup>14</sup>C]-metilglicina ([<sup>14</sup>C]-glifosato) del grupo Monsanto Radiosynthesis en una disolución acuosa 1,5 mM, que tiene una radiactividad específica de 39,4 mCi/mM (5,2 X 10<sup>5</sup> dpm/microgramo). La muestra se identificó con el número de código C-2182.2. Se preparó una disolución madre esterilizada por filtración a través de un Acrodisk de 0,2 micrómetros (Gelman N° 4192) combinando 2,5 ml de [<sup>14</sup>C]-glifosato (3,3 X 10<sup>8</sup> dpm) con 2,5 ml de medio de crecimiento de callos de maíz (medio N6) y 5,0 mg de tensioactivo Mon 0818. La concentración de [<sup>14</sup>C]-glifosato en la disolución de dosis resultante era de 0,75 mM. El medio N6 fue descrito por Chu y col. (1975) y se preparó usando sales y vitaminas obtenidas de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. El tensioactivo Mon 0818 es seboamina etoxilada, el tensioactivo usado en el herbicida Roundup. La disolución de la dosis se sometió a análisis de HPLC como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en un cromatograma ilustrado en la Figura 1. Se resolvieron tres picos de radiactividad, de los que el más largo correspondió al glifosato (11,3 minutos, 98,8%). Los picos de impurezas correspondientes a [<sup>14</sup>C]-AMPA (5,8 min, 0,16%) y a un material no identificado (10,2 min, 1,0%) también estaban presentes en la disolución de la dosis. No se presentaron picos correspondientes a N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA en la disolución de la dosis. Se prepararon otras dos disoluciones de dosis usando estos reactivos, cada una de las cuales se aumentó tres veces hasta volúmenes de 15 ml basándose en el procedimiento de preparación descrito anteriormente.

Se sintetizó N-acetil-[<sup>14</sup>C]AMPA para uso como un patrón de tiempo de retención de HPLC. Se añadió 1 ml de piridina y 2 ml de anhídrido acético a un tubo de cultivo con tapón de rosca de 20 ml y se enfrió en hielo. A la disolución enfriada se añadió 0,1 ml de una disolución acuosa de [<sup>14</sup>C]-AMPA (6,2 X 10<sup>6</sup> dpm, código C-2127.2). A continuación se retiró el tubo del baño de hielo y se calentó hasta aproximadamente 50-60°C. Tras aproximadamente 30 minutos se retiró una muestra de 10 µl y se combinó con 0,5 ml de agua y se analizó según el procedimiento de HPLC expuesto anteriormente. No se detectó [<sup>14</sup>C]-AMPA, sin embargo se identificaron dos nuevos picos de radiactividad; un pico a los 13,9 minutos (68%) y el otro a los 15,4 minutos (32%). Se aisló una muestra del material eluido a los 13,9 minutos y se analizó por espectrometría de masas por electrovaporización de iones negativos. El resultado mostró iones fuertes en m/e 152 y 154, como se esperaba para este compuesto, que tiene un peso molecular de 153 Dalton; el ión de m/z 154 fue por el átomo isotópico [<sup>14</sup>C]. El pico radiactivo que eluye a los 15,4 minutos no se aisló. Sin embargo, en un experimento de HPLC separado, se mostró que eluye conjuntamente con N-acetil-N-metil-AMPA sintético. Previamente se mostró que N-metil-[<sup>14</sup>C]-AMPA es una impureza en el material [<sup>14</sup>C]-AMPA inicial.

Bajo condiciones asépticas, se transfirieron las muestras de callo de maíz a pocillos individuales de grupos de cultivo celular COSTAR™ de 48 pocillos estériles (N° de cat. 3548). No se pesaron las muestras de callos individuales. Sin embargo, en varios casos se determinó el peso total de las muestras de callos en una placa de 48 pocillos. Típicamente, el peso promedio de las muestras de callos individuales fue de aproximadamente 200-250 mg. En cada ensayo, se incluyó como control, una muestra de callo no transformado, HI II X B73. Se añadieron 50 µl de disolución de dosis conteniendo 3,3 X 10<sup>6</sup> dpm de [<sup>14</sup>C]-glifosato a cada muestra de callo. Las placas de 48 pocillos se sellaron con parafilm y se colocaron en una bolsa de plástico que contenía una toalla de papel húmeda para proporcionar una atmósfera húmeda. Se cerraron las bolsas y se colocaron en un cajón oscuro a 25°C durante 10 días. Cada muestra de callo se transfirió posteriormente a un tubo de microcentrífuga etiquetado (VWR, 1,7 ml, N° de cat. 20170-620). Se añadió 1,0 ml de agua desionizada a cada tubo, se cerraron los tubos y se colocaron en soportes de microcentrífuga redondos flotantes de 20 tubos (Nalge, N° de cat. 5974-1015). Estos tubos de microcentrífuga se hicieron flotar en agua hirviendo durante 30 minutos, se agitaron usando un mezclador vórtex, y se centrifugaron durante 5 minutos usando una microcentrífuga de marca Fisher. Se retiraron muestras de 120 µl de sobrenadante para análisis por HPLC como se describe a continuación. Las muestras se inyectaron usando un autoinyector WISP de Waters. Se obtuvieron perfiles cromatográficos para cada muestra analizada y se obtuvo información cuantitativa extrapolando el área bajo los picos de elución radiactiva para [<sup>14</sup>C] total en cada muestra. La figura 2 muestra un perfil de HPLC de una mezcla de patrones de los metabolitos radiactivos observados [<sup>14</sup>C]-AMPA, [<sup>14</sup>C]glifosato, y N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA y la impureza identificada como N-acetil-N-metil-[<sup>14</sup>C]-AMPA.

## ES 2 325 874 T3

El análisis de HPLC se completó típicamente usando una columna SPHERISORB™ S5 SAX de 250 mm x 10 mm para la mayoría de los análisis. Algunas muestras se analizaron en una columna SAX de 250 x 10 mm, ALLTECH™ de 5 micrómetros, que proporcionó un rendimiento similar. Se prepararon dos disolventes. El disolvente A estaba constituido por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,005 M, ajustado hasta pH 2,0 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y contenía metanol al 4%. El disolvente B estaba constituido por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,10 M, ajustado hasta pH 2,0 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y también contenía metanol al 4%. El caudal del eluyente se estableció en 3 ml/min, y caudal de centelleo se estableció en 9 ml/ min usando un líquido de centelleo ATOMFLOW™ (Nº NEN-995, de Packard Instruments). Todas las etapas de disolventes de columna fueron lineales, con los flujos de inyección y disolvente de columna como se indicaron en el ejemplo 2. La columna se prepara para otra inyección de 20 minutos.

Se combinaron muestras de callos de 359 líneas de maíz transformadas con alícuotas de disolución de dosis de  $^{14}\text{C}$ -glifosato de 50- $\mu\text{l}$  y se incubaron durante 10 días en la oscuridad. Cada muestra de callo posterior a la incubación, junto con su material de dosis adherido, se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml junto con 1 ml de agua, y se colocó cada tubo en agua hirviendo. Esta etapa causa la lisis celular, liberando los compuestos intracelulares solubles incluidos cualquier compuesto marcado con isótopo, tal como el glifosato, el AMPA y el N-acetil-AMPA. Durante el desarrollo del procedimiento se determinó que si los callos posteriores a la incubación se aclaraban minuciosamente con agua, el 85-95% de la radiactividad se eliminaba, y el análisis de HPLC mostró que virtualmente toda la radiactividad en los aclarados era por  $^{14}\text{C}$ -glifosato y ninguna pudo atribuirse a los metabolitos marcados con  $^{14}\text{C}$ . En estos experimentos, los callos aclarados dieron extractos que contenían metabolitos marcados con  $^{14}\text{C}$  además de  $^{14}\text{C}$ -glifosato. Esto indicó que la radiactividad en los aclarados era principalmente, sino exclusivamente, por el  $^{14}\text{C}$ -glifosato de superficie no absorbido. Es importante tener esto en cuenta cuando se consideran los porcentajes más bien bajos de la dosis convertida en metabolitos, porque el cálculo del porcentaje incluye grandes cantidades de radiactividad de superficie no absorbida. El trabajo de desarrollo del procedimiento también mostró que simplemente hirviendo los callos incubados en agua se liberaba tanta radiactividad como podía liberarse por medio de un procedimiento convencional de trituración/extracción. Los experimentos se llevaron a cabo para mostrar que el hervir no altera el perfil de metabolitos. Los procedimientos racionalizados hicieron posible analizar grandes cantidades de muestras (por ejemplo, 96) de una vez. La Tabla 16 muestra datos representativos de las muestras de callos que producen los niveles más altos de N-acetil- $^{14}\text{C}$ -AMPA o  $^{14}\text{C}$ -AMPA obtenidos tras el análisis por HPLC. En la Figura 3 se muestra un cromatograma representativo de una muestra de extracto de callo, transformada con GOX más AMPA aciltransferasa, tratada con glifosato.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 325 874 T3

TABLA 16

*Líneas de callos de maíz transformadas que producen cantidades de AMPA o N-acetil-AMPA*

| Callo que produce N-acetil-[ <sup>14</sup> C]-AMPA |                     |   | Callo que produce [ <sup>14</sup> C]-AMPA |                     |                                      |
|--|---------------------|---|---|---------------------|--------------------------------------|
| Callo*   | Transformado con... | N-acetil-[ <sup>14</sup> C]-AMPA por ciento** | Callo*                                    | Transformado con... | [ <sup>14</sup> C]-AMPA por ciento** |
| 1978-05-02   | pMON32570           | 0,27  | 1980-28-03                                | pMON32571           | 2,89                                 |
| 1978-08-01   | pMON32570           | 0,94  | OR523                                     | pMON32926           | 2,00                                 |
| 1978-20-02   | pMON32570           | 0,57  | OR534                                     | pMON32926           | 5,00                                 |
| 1978-21-02   | pMON32570           | 0,23  | OR537                                     | pMON32926           | 2,00                                 |
| 1978-22-01   | pMON32570           | 0,90  | OR539                                     | pMON32926           | 5,08                                 |
| 1978-24-02   | pMON32570           | 1,80  | 1971-08-01                                | pMON32932           | 2,64                                 |
| 1978-35-01   | pMON32570           | 0,22  | 1971-27-03                                | pMON32932           | 3,63                                 |
| 1980-01-01   | pMON32570           | 0,27  | OO505                                     | pMON32932           | 2,73                                 |
| 1980-03-01   | pMON32571           | 0,22  | OO509                                     | pMON32932           | 2,86                                 |
| 1981-28-01   | pMON32571           | 0,25  | OO510                                     | pMON32932           | 2,34                                 |
| 1981-02-01   | pMON32572           | 0,65  | OO512                                     | pMON32932           | 2,31                                 |
| 1981-03-01   | pMON32572           | 0,74  | OO514                                     | pMON32932           | 1,98                                 |
| 1981-18-01   | pMON32572           | 0,22  | OO535                                     | pMON32932           | 2,88                                 |
| 1981-23-01   | pMON32572           | 0,48  | OO538                                     | pMON32932           | 2,70                                 |
| 1981-24-02   | pMON32572           | 0,29  | OO539                                     | pMON32932           | 1,97                                 |
| 1981-32-02   | pMON32572           | 1,08  | OO553                                     | pMON32932           | 3,56                                 |
| 1977-05-03   | pMON32573           | 0,39  | OO576                                     | pMON32932           | 3,49                                 |
| OR516  | pMON32926           | 1,91  | OO579                                     | pMON32932           | 2,85                                 |
| 1972-14-01   | pMON32931           | 0,40  | 1986-17-01                                | pMON32936           | 2,29                                 |
| 1972-32-01   | pMON32931           | 0,75  | 1986-18-03                                | pMON32936           | 3,05                                 |
| 1972-33-01   | pMON32931           | 0,55  | 1986-18-04                                | pMON32936           | 2,15                                 |
| OO544  | pMON32932           | 0,28  | 1986-28-02                                | pMON32936           | 2,06                                 |
| 1986-06-01   | pMON32936           | 0,30  | 1983-12-02                                | pMON32938           | 2,41                                 |
| 1986-08-01   | pMON32936           | 1,13  | 1983-31-01                                | pMON32938           | 2,90                                 |
| 1986-08-03   | pMON32936           | 0,70  | 1985-03-02                                | pMON32946           | 2,51                                 |
| 1986-12-01   | pMON32936           | 0,33  | 1985-38-01                                | pMON32947           | 1,99                                 |
| 1986-18-02   | pMON32936           | 0,40  | OX512                                     | pMON32948           | 2,43                                 |
| 1986-18-03   | pMON32936           | 0,51  | OX533                                     | pMON32948           | 3,91                                 |
| 1986-18-04   | pMON32936           | 1,09  | OX556                                     | pMON32948           | 12,11                                |
| 1986-22-04   | pMON32936           | 0,64  | OY504                                     | pMON32950           | 2,25                                 |
| 1983-11-01   | pMON32938           | 0,21  | OY511                                     | pMON32950           | 2,53                                 |
| OW534  | pMON32946           | 0,77  | OY528                                     | pMON32950           | 2,58                                 |
| OW542  | pMON32946           | 0,85  | OY532                                     | pMON32950           | 2,24                                 |
| 1985-26-01   | pMON32947           | 0,60  | OY534                                     | pMON32950           | 4,02                                 |
| 1985-26-03   | pMON32947           | 0,71  | OY535                                     | pMON32950           | 2,34                                 |
| 1985-11-04   | pMON32952           | 0,37  | OY540                                     | pMON32950           | 5,57                                 |

\* Todas las líneas se transformaron usando procedimientos balísticos. Las líneas denominadas por medio de 19xx-yy-zz se transformaron con fragmentos de plásmidos lineales aislados. Los fragmentos lineales se aislaron para que estuvieran separados de la estructura central del plásmido.

\*\* radiactividad por ciento detectada para los picos de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA o [<sup>14</sup>C]-AMPA determinada como una fracción de la cantidad de radiactividad total en la muestra, incluido el [<sup>14</sup>C]-glifosato residual como se describe en el texto.

19 de las 359 muestras de callos probadas produjeron extractos que contenían N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA en un nivel claramente más alto que las otras muestras de callos. El callo OR516 fue el más fuerte en este sentido y se analizó cinco veces durante un período de dos meses, proporcionando valores que varían desde 0,50 hasta 4,54% (promedio 1,91%). Se desconoce la base para la amplitud relativamente grande en el porcentaje de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA formado en diversos tiempos. En cuatro de los cinco análisis de OR516, el porcentaje de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA presente fue más elevado que el de [<sup>14</sup>C]-AMPA, indicando una conversión eficaz de [<sup>14</sup>C]-AMPA a N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. El siguiente callo más eficaz para producir N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA fue 1978-24-02, que fue el otro único callo además de OR 516 que contenía más N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA que [<sup>14</sup>C]-AMPA en su extracto. Cien de las 359 muestras de callos probadas produjeron extractos que contenían [<sup>14</sup>C]-AMPA en un nivel claramente más alto que las otras muestras de callos. OX556 fue un productor excepcional de [<sup>14</sup>C]-AMPA, dando más de dos veces la cantidad de metabolito que cualquier otro callo en el estudio. El callo control, HI II X B73, que no contenía genes insertados, no produjo niveles detectables de N-acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA y solamente niveles de fondo de [<sup>14</sup>C]-AMPA. Este resultado indica que la expresión de una AMPA aciltransferasa en maíz es eficaz en la conversión de AMPA producido como un resultado de la degradación de glifosato mediada por GOX a N-acetil-AMPA.

15 *Trigo*

Se ha mostrado que la degradación de glifosato mediada por GOX produce AMPA, y previamente se ha mostrado que AMPA es la fuente de los efectos fitotóxicos. Por consiguiente, se determinaron los efectos de la exposición de plantas de trigo a los compuestos AMPA o N-acetil-AMPA como en el ejemplo 2 para observar cualquier sensibilidad o insensibilidad del trigo a cualquiera de estos compuestos. La observación de cualquier efecto fitotóxico indicaría que el metabolismo del glifosato mediado por GOX sería perjudicial para la especie *Tritium*.

Se expusieron embriones inmaduros de trigo a diferentes concentraciones de AMPA y N-acetil-AMPA en un ensayo de germinación de embriones de trigo. Se preparó el medio base MMSO conteniendo maltosa 40 gramos por litro, GELRITE™ 2 gramos por litro, sales MS, y vitaminas. Las sales, vitaminas, y maltosa se disolvieron en 3500 ml de agua y se ajustó el pH hasta 5,8. 500 ml se colocaron en una botella separada junto con 1 gramo de GELRITE™ y se sometió a autoclave durante 17 minutos. Una vez que el medio se enfrió hasta aproximadamente 45°C, se añadió AMPA o N-acetil-AMPA hasta una concentración definida. La mezcla se vertió en copas hexaédricas de Sundae bajo condiciones estériles y se dejó solidificar.

Se aislaron embriones inmaduros de trigo de plantas de semillero de veinte días de edad (tras la formación de la antera) y se inocularon en cada medio MMSO. Cada copa de Sundae contenía nueve embriones inmaduros. Se usaron tres placas separadas para cada concentración de AMPA (0, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, y 1,0 mM) o N-acetil-AMPA (0, 0,1, 0,3, 1,0, y 3,0 mM). Las copas de Sundae se incubaron durante diez días y se determinó y comparó la longitud y las raíces los brotes. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

TABLA 17

*Comparación de AMPA y N-acetil AMPA en la longitud de brotes y raíces germinados*

| Compuesto de fosfonato | Brote (cm) | Raíz (cm) |
|------------------------|------------|-----------|
| AMPA (mM)              |            |           |
| 0,00                   | 12,6 ± 2,6 | 7,0 ± 1,9 |
| 0,10                   | 11,7 ± 2,5 | 8,0 ± 2,0 |
| 0,15                   | 11,3 ± 2,1 | 6,3 ± 1,7 |
| 0,20                   | 9,2 ± 1,8  | 4,6 ± 2,1 |
| 0,25                   | 8,5 ± 1,8  | 3,1 ± 1,6 |
| 0,30                   | 6,6 ± 1,8  | 2,6 ± 1,6 |
| 1,00                   | 0,9 ± 0,1  | 0,4 ± 0,1 |
| N-Acetil-AMPA          |            |           |
| 0,00                   | 12,6 ± 2,6 | 7,0 ± 1,9 |
| 0,10                   | 12,0 ± 2,4 | 5,9 ± 1,4 |
| 0,30                   | 11,7 ± 3,5 | 5,2 ± 1,2 |
| 1,00                   | 12,2 ± 3,2 | 5,4 ± 1,5 |
| 3,00                   | 11,2 ± 2,6 | 5,9 ± 1,6 |

El AMPA no fue sustancialmente inhibitor para el crecimiento y la elongación de los embriones inmaduros en concentraciones inferiores a 0,2 mM. Sin embargo, las concentraciones superiores a 0,2 mM fueron inhibitoras de manera importante tanto para la elongación de brotes como de raíces, indicando que el AMPA puede también ser fitotóxico para el trigo y, considerando la naturaleza de las especies de cultivos de monocotiledóneas como un todo, fitotóxico para otros cultivos de monocotiledóneas así como para los céspedes. La germinación de los embriones inmaduros se vio afectada de manera significativa cuando el nivel de AMPA fue superior a 0,20 mM. AMPA 1,00 mM eliminó la germinación de los embriones inmaduros en el trigo. En contraste, el N-acetil-AMPA no fue inhibitor para los brotes y resultó sólo levemente inhibitor para la elongación de las raíces en cualquiera de las concentraciones probadas en este experimento. La mayor concentración de N-acetil-AMPA probada fue superior a diez veces la concentración no inhibitor mínima determinada para AMPA. No hay efectos significativos para la germinación de embriones inmaduros cuando la concentración de N-acetil-AMPA es inferior a 3,0 mM. Este resultado indica que la N-acetilación de AMPA en el trigo prevendrá la fitotoxicidad del AMPA surgida como resultado del metabolismo del herbicida glifosato mediado por GOX.

Las plantas de trigo recombinantes tolerantes al glifosato se generaron según el procedimiento de Zhou y col. (Plant Cell Reports 15: 159-163, 1995). Brevemente, se usó trigo de primavera, *Triticum aestivum* variedad Bobwhite, como la línea de transformación diana. La población de plantas se cultivó en una cámara de cultivo de ambiente controlado con un período de luz de 16 horas a 800 microJulios por metro cuadrado por segundo proporcionados por luces de descarga de alta intensidad (Sylvania, GTE Products Corp., Manchester, NH). Las temperaturas de día/noche fueron 18/16°C. Se recogieron cariósides inmaduras de las plantas 14 días después de la antesis. Se disecaron los embriones inmaduros de manera aséptica y se cultivaron en medio MMS2, un medio base de Murashige y Skoog (Physiol. Plant 15: 473-497, 1962) suplementado con maltosa 40 gramos por litro y 2,4-D 2 miligramos por litro. En algunos experimentos, se usó medio CM4. El contenido del medio CM4 es medio MMS2, pero contiene sólo 2,4-D 0,5 miligramos por litro e incluye picloram 2,2 miligramos por litro. Los embriones inmaduros se cultivaron a 26°C en la oscuridad.

Los embriones inmaduros se transfirieron cinco días después del inicio del cultivo a un medio CM4 de tratamiento osmótico que contenía manitol 0,35 M cuatro horas antes del bombardeo según el procedimiento de Russell y col. (*In vitro* Cell Devel. Biol., 28P: 97-105, 1992). Se colocaron treinta a cuarenta embriones en el centro de cada placa y se bombardearon en un aparato DuPont PDS 1000. El ADN del plásmido ADN se adsorbió sobre partículas de tungsteno de 1 µm según el procedimiento de Sanford y col. (Particle Sci. Technol., 5: 27-37, 1987). Los embriones se bombardearon dos veces a una distancia de 13 mm de la placa de parada. Se colocó una pantalla de acero inoxidable de 100 µm inmediatamente por debajo de la placa de parada.

Tras un tratamiento en el medio osmótico de 16 horas posterior al bombardeo, se transfirieron los embriones al medio MMS2 o CM4. Tras un período de una semana, los embriones se transfirieron al medio MMS2 o CM4 que contenía glifosato 2 mM. Tras 9-12 semanas de proliferación de los callos en el medio de selección, se transfirieron los callos a un medio de regeneración MMS0.2 que contenía 2,4-D 0,2 mg/l y glifosato 0,1 mM. Los brotes obtenidos del medio de regeneración se transfirieron a MMSO sin 2,4-D pero que contenía glifosato 0,02 mM.

Las plantas R<sub>0</sub> tolerantes a glifosato así como la progenie R<sub>1</sub> se transfirieron a recipientes de 15 centímetros de diámetro y se cultivaron en una cámara de ambiente controlado como se describió anteriormente. Dos semanas más tarde, las plantas se pulverizaron con ROUNDUP 3 ml/litro (componente activo al 41%, Monsanto Company) en una cámara de pulverización, que se diseñó para imitar una aplicación de dosis de campo de 0,6 kilogramos de glifosato por hectárea. Se observaron y registraron los síntomas de deterioro en diferentes estadios tras la pulverización.

El ADN genómico del tejido de hoja de R<sub>0</sub> y de la progenie R<sub>1</sub> siguiendo el procedimiento de Shure y col. (Cell 35: 225-233, 1983). Se digirieron quince microgramos de ADN genómico con la endonucleasa de restricción *Bgl*III y se fraccionó en un gel de agarosa al 0,8%. Se transfirió el ADN a membranas Hybond N (Amersham) según el procedimiento convencional descrito en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Se probaron las membranas de manera independiente para evidenciar la presencia de genes que codifican EPSPS y GOX. Se liberó un fragmento de ADN de 3,4 kb que contenía el gen de EPSPS y un fragmento de ADN de 4,8 kb que contenía el gen de GOX de pMON19574 por digestión con la endonucleasa de restricción *Bgl*III, aislados por electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, y marcados con [<sup>32</sup>P] dCTP usando un kit de marcación aleatoria de cebadores Stratagene PRIME-IT II. Las sondas estaban marcadas hasta una actividad específica de 3 X 10<sup>9</sup> conteos por minuto por microgramo y 1,3 X 10<sup>9</sup> conteos por minuto por microgramo, respectivamente. Las membranas se hibridaron durante 14 horas a 42°C en una disolución que contenía formamida al 50%, 5X SSC, 5X Denhardt, SDS al 0,5%, y ARNt 100 microgramos por mililitro. La condición del lavado final fue al SSC 0,1% y SDS al 0,1% a 60°C durante quince minutos.

Los ensayos de las proteínas EPSPS y GOX se realizaron usando extractos brutos de proteínas de tejido de hojas de las plantas R<sub>0</sub> y se cuantificaron las proteínas totales siguiendo el procedimiento de Bradford (Anal. Biochem. 72: 248-256, 1976). El porcentaje de proteína EPSPS y GOX representado en los extractos se cuantificó usando un procedimiento de ELISA y se calculó como proteína extraíble total por ciento.

Se aislaron embriones inmaduros de las plantas transgénicas R<sub>0</sub> y de control Bobwhite veinte días después de la antesis y se cultivaron en el medio MMSO con glifosato 0,02 mM para una prueba de germinación. Se registraron los embriones germinados y no germinados diez días más tarde y los datos se analizaron por la prueba de X<sup>2</sup> para

segregación 3:1. Las plantas tolerantes de la prueba de germinación se transfirieron a la tierra y se pulverizaron con ROUNDUP tres mililitros por litro como se describió anteriormente.

Se usaron cinco plásmidos que llevan genes de resistencia al glifosato para transformar embriones inmaduros de trigo como se describió anteriormente. pMON19338 contiene una casete de nucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto EPSPS de petunia en marco con una secuencia de la enzima EPSPS de la cepa CP4 de *Agrobacterium*. La casete de nucleótidos se inserta secuencia abajo de un promotor 35 S potenciado del virus del mosaico de la coliflor unido en posición 3' a una secuencia del intrón HPS70 del maíz y intrón secuencia arriba de una secuencia de poliadenilación y terminación de la transcripción de la nopalina sintasa 3'. Se colocan sitios de restricción convenientes entre la secuencia del intrón y la secuencia de terminación 3' para insertar los elementos genéticos. pMON19643 es idéntico a pMON19338 excepto en que se usa una secuencia que codifica la enzima GOX en lugar de la secuencia que codifica la enzima EPSPS de *Agrobacterium*. pMON19574 es idéntico a pMON19338 pero además contiene una casete de expresión de glifosato oxidorreductasa dirigida al cloroplasto idéntica a la de pMON19643 secuencia abajo e inmediatamente vecina a la casete de expresión de EPSPS. pMON32570 es similar a pMON19574 en que están presentes las casetes de expresión que codifican una EPSPS dirigida al cloroplasto y GOX dirigida al cloroplasto, sin embargo, también está presente una casete de expresión que codifica una enzima AMPA aciltransferasa dirigida al cloroplasto entre las casetes de expresión de EPSPS y GOX. Otros elementos que están presentes en pMON19574 y no en otros plásmidos son también dignos de mención. Por ejemplo, un líder 5' no traducido del gen de la proteína principal de unión a la clorofila a/b del trigo está presente entre el promotor 35S potenciado y el intrón en ambas casetes de expresión, la de EPSPS y la de AMPA aciltransferasa (McElroy y col., Plant Cell 2: 163-171, 1990). También, está presente una secuencia de poliadenilación y terminación de la transcripción 3' del gen hsp 17 del trigo en lugar de la secuencia de la nopalina sintasa 3' para ambas casetes de expresión, la de EPSPS y la de AMPA aciltransferasa. Todos los plásmidos produjeron plantas de trigo recombinantes tolerantes al glifosato usando el procedimiento de transformación balística descrito anteriormente. Sin embargo, los plásmidos que fueron capaces de expresar GOX sola o GOX junto con una AMPA aciltransferasa no produjeron plantas de trigo recombinantes tolerantes al glifosato o produjeron plantas que experimentaron problemas con crecimiento atrofiado, segregación aberrante de fenotipos e infertilidad y no se analizaron más. Los datos obtenidos tras la transformación biolística usando los plásmidos descritos se muestran en la Tabla 18.

TABLA 18

*Datos de la transformación biolística del trigo*

| Gen(es) de tolerancia al glifosato | Nº de Explantes | Nº de sucesos transgénicos | Eficacia de transformación <sup>1</sup> |
|------------------------------------|-----------------|----------------------------|---|
| GOX                                | 120             | 0                          | 0                                       |
| GPX + PhnO                         | 434             | 6                          | 1,4                                     |
| EPSPS                              | 120             | 6                          | 5,0                                     |
| EPSPS + GOX                        | 120             | 1                          | 0,8                                     |
| EPSPS + PhnO + GOX                 | 10.068          | 314                        | 3,1                                     |

1 – eficacia de transformación basada en el porcentaje de sucesos transgénicos identificados de una población total de explantes surgidos de una combinación de experimentos en los que se ha bombardeado una construcción de un vector particular en embriones inmaduros.

Las plantas transformadas tolerantes al glifosato surgidas de estas transformaciones se autofertilizaron y permitieron producir semillas R1, que se usaron para generar plantas R1. La tolerancia al glifosato se segregó generalmente en la proporción esperada de 3:1 en las plantas R1 como se evalúa por las sensibilidades de las planta R1 tras pulverizar con glifosato en el estadio de tres hojas. Las planta R1 tolerantes al glifosato se autofertilizaron y permitieron producir semillas R2. Las semillas R2 germinaron a partir de un número de líneas tolerantes al glifosato diferentes para producir plantas R2 tolerantes al glifosato a las que se aplicó [<sup>14</sup>C]-glifosato como se describió anteriormente. Se recogieron tejidos de hojas y tallos de las plantas a las 48 horas después de la aplicación del glifosato, y se extrajeron los compuestos solubles en agua como se describió anteriormente y se analizaron por HPLC como en el ejemplo 2 para evidenciar la presencia de metabolitos de [<sup>14</sup>C]-glifosato. Se sumó el área total bajo los picos marcados con isótopo [<sup>14</sup>C] que eluyeron de la columna para proporcionar una base de identificación de compuestos marcados con [<sup>14</sup>C] al 100% para cada muestra analizada. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

TABLA 19

*Metabolismo del glifosato en extractos de plantas de trigo<sup>1</sup>*

| Muestra y gen(es) de tolerancia al glifosato | Nº de línea de planta | [ <sup>14</sup> C]-glifosato | [ <sup>14</sup> C]-AMPA | Acetil-[ <sup>14</sup> C]-AMPA | [ <sup>14</sup> C]-Otro <sup>4</sup> |
|--|-----------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Patrón <sup>2</sup>                          | nd                    | 30                           | 26                      | 31                             | 13                                   |
|  | nd                    | 29                           | 24                      | 29                             | 18                                   |
|  | nd                    | 35                           | 29                      | 36                             | 0                                    |
| Medio de cultivo <sup>3</sup>                | nd                    | 60                           | 32                      | 0,2                            | 8                                    |
|  | nd                    | 48                           | 25                      | 2                              | 25                                   |
|  | nd                    | 87                           | 7                       | 0                              | 6                                    |
| EPSPS  | 24756                 | 43                           | 25                      | 1                              | 31                                   |
|  | 24756                 | 53                           | 46                      | 0                              | 1                                    |
|  | 25697                 | 61                           | 38                      | 0                              | 1                                    |
|  | 25397                 | 37                           | 19                      | 1,2                            | 43                                   |
|  | 25397                 | 64                           | 20                      | 0                              | 16                                   |
| EPSPS + PhnO +GOX                            | 27249                 | 6                            | 7                       | 85                             | 2                                    |
|  | 27249                 | 14                           | 12                      | 61                             | 13                                   |
|  | 27249                 | 5                            | 24                      | 33                             | 38                                   |
| EPSPS + PhnO +GOX                            | 25462                 | 48                           | 21                      | 0                              | 31                                   |
|  | 25462                 | 44                           | 5                       | 0                              | 51                                   |
|  | 25462                 | 54                           | 35                      | 0                              | 11                                   |
|  | 26281                 | 48                           | 14                      | 17                             | 21                                   |
|  | 26281                 | 64                           | 11                      | 13                             | 12                                   |
|  | 26281                 | 38                           | 7                       | 7                              | 48                                   |
|  | 28598                 | 20                           | 7                       | 5                              | 68                                   |
|  | 28598                 | 25                           | 7                       | 5                              | 63                                   |
| Bobwhite                                     | nd                    | 74                           | 26                      | 0                              | 0                                    |
|  | nd                    | 17                           | 15                      | 0                              | 32                                   |
|  | nd                    | 34                           | 24                      | 0                              | 42                                   |

1 – Los extractos de tejidos de plantas se analizaron por HPLC tras la aplicación de [<sup>14</sup>C]-glifosato como en el Ejemplo 1, y se sumaron las áreas bajo los gráficos para cada pico para proporcionar una base de identificación de compuestos marcados con [<sup>14</sup>C] al 100% para cada muestra.

2 – Disolución patrón que contiene proporciones molares de [<sup>14</sup>C] aproximadamente iguales de cada compuesto conocido relacionado con el metabolismo del glifosato.

3 – Medio de cultivo que incluye [<sup>14</sup>C]-glifosato; previamente se ha mostrado que el glifosato se degrada por un proceso fotolítico a AMPA, que puede autoacilarse en presencia de algunos compuestos de acilo (MSL-0598).

4 – Compuestos marcados con [<sup>14</sup>C] no caracterizados que se resuelven usando el procedimiento cromatográfico desvelado. El tiempo de retención para el glifosato es de aproximadamente 9,6 minutos, para AMPA es de aproximadamente 5,4 minutos, para N-acetil-AMPA es de aproximadamente 12,5 minutos, y para la principal impureza marcada con [<sup>14</sup>C] en la muestra de [<sup>14</sup>C]-glifosato es de aproximadamente 4,7 minutos.

La disolución patrón contiene proporciones molares aproximadamente iguales de los compuestos glifosato, AMPA y N-acetil-AMPA, así como una cantidad de impureza que están presentes como un resultado de la síntesis química de estos compuestos marcados con isótopo. El medio de cultivo al que se añadió [<sup>14</sup>C]-glifosato se trató con las mismas condiciones que las plantas de trigo, es decir, el medio se expuso a las intensidades de luz incidente que recibieron las plantas. Como se esperaba, se observó fotodegradación del glifosato a AMPA, y un pequeño porcentaje de AMPA pareció convertirse en acetil-AMPA, probablemente como resultado de la exposición en el medio de cultivo a otros compuestos acilados. Previamente se ha observado la fotodegradación del glifosato por exposición a la luz visible a AMPA como el principal producto de degradación (Lund-Hoeie y col., Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36: 723-729, 1986). Las plantas de trigo recombinantes transformadas con un plásmido de sólo EPSPS no produjeron [<sup>14</sup>C]-AMPA ni acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA a partir de [<sup>14</sup>C]-glifosato. El [<sup>14</sup>C]-AMPA y las cantidades trazas de acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA que se observaron estaban dentro de los límites observados como resultado de la fotodegradación en el control del medio de cultivo. Las plantas no recombinantes Bobwhite de control tratadas con [<sup>14</sup>C]-glifosato tampoco produjeron AMPA ni acetil-AMPA. Las plantas transformadas con el plásmido de la construcción de triple gen que contenía genes capaces de expresar EPSPS, PhnO y GOX produjeron resultados variables. Aproximadamente un tercio de estas plantas parecieron convertir de manera eficaz el glifosato a acetil-AMPA, indicando que las enzimas GOX y PhnO estaban presentes y eran funcionales. Los análisis de transferencia Southern demostraron que los transgenes estaban integrados en los genomas del trigo y se transmitieron a las siguientes generaciones. El análisis de transferencia Western usando antisuero anti-EPSPS, anti-GOX, o anti-PhnO para detectar estas proteínas en los extractos de las plantas transformadas con el gen triple proporcionó otro punto de vista en la base para la observación del metabolismo variable del [<sup>14</sup>C]-glifosato. El análisis de transferencia Western indicó que todas las líneas estaban produciendo EPSPS, sin embargo sólo la línea 27249 estaba produciendo GOX y proteína PhnO. Este resultado es coherente con los datos en la Tabla 19, que muestran que la línea 27249 metaboliza de manera eficaz el [<sup>14</sup>C]-glifosato a acetil-[<sup>14</sup>C]-AMPA. Esta línea de planta tampoco demostró atrofia, fertilidad parcial ni los fenotipos de segregación alterada asociados con otras líneas. Estos resultados indican que la coexpresión de GOX y AMPA aciltransferasa en plantas de trigo que expresan EPSPS recombinante proporciona tolerancia mejorada al herbicida.

#### Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la transformación de cloroplastos de tabaco con un gen *phnO*.

Pueden producirse plantas recombinantes en las que sólo se ha alterado el ADN de los mitocondrios o cloroplasto para incorporar las moléculas contempladas en esta solicitud. En la técnica se han conocido promotores que funcionan en los cloroplastos (Hanley-Bowden y col., Trends in Biochemical Sciences 12: 67-70, 1987). Se han descrito procedimientos y composiciones para obtener células que contienen cloroplastos en los que se ha insertado ADN heterólogo, por ejemplo por Daniell y col. (Patente de EEUU N° 5.693.507; 1997) y Maliga y col. (Patente de EEUU N° 5.451.513; 1995). Puede construirse un vector que contiene una casete de expresión a partir de la cual podría producirse una proteína aciltransferasa. Una casete podría contener un secuencia de un promotor funcional en cloroplastos que dirija la expresión de, por ejemplo, un gen *phnO*, construido casi de la misma manera que otros polinucleótidos en el presente documento, usando procedimientos de PCR, digestión y unión con endonucleasas de restricción, etc. Un gen expresable en cloroplastos proporcionará un promotor y una región 5' no traducida de un gen heterólogo o gen de cloroplasto tal como *psbA*, que proporcionará la transcripción y traducción de una secuencia de ADN que codifica una proteína aciltransferasa en el cloroplasto; una secuencia de ADN que codifica una proteína aciltransferasa; y una región de terminación de la transcripción y de la traducción tal como una región repetida 3' invertida de un gen de cloroplasto que podría estabilizar un ARNm expresado que codifica una proteína aciltransferasa. La expresión desde dentro del cloroplasto potenciará la acumulación del producto del gen. Una célula huésped que contiene cloroplastos o plastidios puede transformarse con la casete de expresión y a continuación la célula resultante que contiene los cloroplastos transformados puede cultivarse para expresar la proteína aciltransferasa. Una casete también puede incluir un gen de tolerancia a antibióticos, herbicidas, u otro gen de un marcador seleccionable además del gen de aciltransferasa. La casete de expresión puede estar flanqueada por secuencias de ADN obtenidas de un ADN de cloroplasto que facilitará la integración estable de la casete de expresión en el genoma del cloroplasto, particularmente por recombinación homóloga. Como alternativa, la casete de expresión puede no integrarse, pero al incluir un origen de replicación obtenido de un ADN de cloroplasto, será capaz de proporcionar la replicación de, por ejemplo, un gen *phnO* heterólogo u otro gen de aciltransferasa dentro del cloroplasto.

Pueden generarse plantas a partir de células que contienen cloroplastos transformados y a continuación pueden cultivarse para producir semillas, de las que pueden generarse otras plantas. Tales procedimientos de transformación son ventajosos sobre la transformación del genoma nuclear, en particular donde se efectúa la transformación de cloroplastos por integración del genoma del cloroplasto, porque los genes de los cloroplastos en general se heredan por vía materna. Esto proporciona plantas transgénicas "más seguras" desde el punto de vista ambiental, eliminando virtualmente la posibilidad de escapes en el ambiente. Además, los cloroplastos pueden transformarse múltiples veces para producir genomas funcionales de cloroplastos que expresen múltiples proteínas recombinantes deseadas, mientras que se ha mostrado que la transformación genómica nuclear está bastante limitada cuando se desean múltiples genes. De esta manera, se evitan los sucesos de segregación usando transformación de cloroplastos o plastidios. A diferencia de la expresión del genoma nuclear de la planta, la expresión en cloroplastos o plastidios puede iniciarse a partir de un único promotor y continuar a lo largo de una región policistronica para producir múltiples péptidos a partir de un único ARNm.

La casete de expresión se producirá casi de la misma manera en que se construyen otros vectores de transformación de plantas. Las secuencias de ADN funcionales de cloroplastos de plantas pueden insertarse en un plásmido bacteriano y unirse a secuencias de ADN que expresan los productos genéticos deseados, tales como proteínas PhnO u otras aciltransferasas similares, de manera que la proteína aciltransferasa se produce dentro del cloroplasto, obviando la necesidad de regulación nuclear del gen, remate, empalme, o poliadenilación de genes nucleares regulados, o secuencias dirigidas a cloroplastos o plastidios. Una casete de expresión que comprende un gen *phnO* o un gen de aciltransferasa similar, que se construye sintéticamente o un gen nativo derivado directamente de un genoma de *E. coli*, podrá insertarse en un sitio de restricción en un vector construido para el objeto de transformar cloroplastos o plastidios. La casete se flanqueará secuencia arriba por un promotor funcional de cloroplasto o plastidio y secuencia abajo por una secuencia de terminación de la traducción y transcripción funcional de cloroplasto o plastidio. La casete resultante podría incorporarse en el genoma del cloroplasto o plastidio usando procedimientos de recombinación homóloga bien conocidos.

Como alternativa, la transformación de cloroplastos o plastidios podría obtenerse usando un plásmido de replicación autónomo u otro vector capaz de propagarse dentro del cloroplasto o plastidio. Un medio para llevar a cabo este procedimiento será utilizar una porción del genoma del cloroplasto o plastidio necesaria para la iniciación de la replicación del cloroplasto o plastidio como medio para mantener el plásmido o el vector en los cloroplastos o plastidios transformados. Una secuencia que permita la replicación estable de un elemento epigenético de cloroplasto o plastidio podría identificarse fácilmente a partir de la clonación aleatoria de un genoma de cloroplasto o plastidio en un vector bacteriano convencional que contenga también un gen marcador seleccionable de cloroplasto o plastidio, seguido por la transformación de los cloroplastos o plastidios y la selección de las células transformadas en un medio de selección adecuado. La introducción de una casete de expresión como se describe en el presente documento en un elemento epigenético replicable de cloroplasto o plastidio proporcionará un medio eficaz para localizar un gen de aciltransferasa y la proteína al cloroplasto o plastidio.

#### 25 Bibliografía referenciada

- Avila y col., *J. Am. Chem. Soc.* 109: 6758-6764, 1987.
- 30 Berlyn, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62: 814-984, 1998.
- Chen y col., *J. Biol. Chem.* 265: 4461-4471, 1990.
- Dumora y col., *Biochim. Biophys. Acta* 997: 193-198, 1989.
- 35 Franz, Discovery, development and chemistry of glyphosate, in *The Herbicide Glyphosate*. Eds. E. Grossbard and D. Atkinson. *Butterworths*. pág. 3-17, 1985.
- 40 Hanley-Bowden y col., *Trends in Biochemical Sciences* 12: 67-70, 1987.
- Hilderbrand y col., *The role of phosphonates in living systems*; Hilderbrand, R. L., Ed, pág. 5-29, *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, FL, 1983.
- 45 Jacob y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2953-2958, 1988
- Jiang y col., *J. Bacteriol.* 177: 6411-6421, 1995.
- Kishore y col., *J. Biol. Chem.* 262: 12.164-12.168, 1987.
- 50 Lacoste y col., *J. Gen. Microbiol.* 138: 1283-1287, 1992.
- Lee y col., *J. Bacteriol.* 174: 2501-2510, 1992.
- 55 Maier, *Phosphorous Sulfur* 14: 295, 1983.
- Makino y col., *J. Bacteriol.* 173: 2665-2672, 1991.
- McGrath y col., *Eur. J. Biochem.* 234: 225-230, 1995.
- 60 Metcalf y col., *J. Bacteriol.* 173: 587-600, 1991.
- Metcalf y col., *Gene* 129: 27-32, 1993.
- 65 Ohtaki y col., *Actinomyceteol.* 8: 66-68, 1994.
- Pipke y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1293-1296, 1987.

**Shinabarger** y col., *J. Bacteriol.* 168: 702-707, 1986.

**Tanaka** y col., *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 30: 209-223, 1986.

5 **Wackett** y col., *J. Bacteriol.* 169: 710-717, 1987a

**Wackett** y col., *J. Bacteriol.* 169: 1753-1756, 1987b.

10 **Wanner** y col., *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 133-140, 1992.

**Wanner**, *Biodegradation* 5: 175-184, 1994.

**Wohlleben** y col., *Mol. Gen. Genet.* 217: 202-208, 1989.

15 **Documentos de Patentes referenciados**

Barry y col., Patente de EEUU N° 5.463.175, 1995.

20 Barry y col., Patente de EEUU N° 5.633.435, 1997

Comai, Patente de EEUU N° 4.535.060, 1985.

Daniell y col., Patente de EEUU N° 5.693.507; 1997.

25 Maliga y col., Patente de EEUU N° 5.451.513; 1995.

McBride y col., documento WO 95/24492.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína aminometil fosfonato (AMPA)-N-aciltransferasa, en la que dicha proteína AMPA-N-aciltransferasa transfiere un grupo acilo desde un compuesto donador acilado hasta la amina terminal del AMPA, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a la SEC. ID N°: 4, y en la que la expresión de dicha proteína en dicha planta permite a dicha planta ser tolerante al AMPA.
- 10 2. La planta de la reivindicación 1, en la que la secuencia de polinucleótidos está unida de manera operativa a una secuencia de un promotor que es funcional en las plantas, y una secuencia 3' que funciona en las plantas para causar la terminación de la transcripción.
- 15 3. La planta de la reivindicación 2 en la que dicha aciltransferasa está localizada hacia los plastidios o cloroplastos en dicha planta.
- 20 4. La planta de la reivindicación 2 en la que dicha proteína además comprende un péptido de tránsito de cloroplasto amino terminal, en la que dicha proteína está localizada hacia los cloroplastos o plastidios en dicha planta.
- 25 5. La planta de la reivindicación 2, en la que dicho donador acilado es una acil coenzima A, estando dicha acil coenzima A seleccionada del grupo constituido por acetil coenzima A, propionil coenzima A, malonil coenzima A, succinil coenzima A y metil-malonil coenzima A.
- 30 6. La planta de la reivindicación 5, en la que dicha acil coenzima A es acetil coenzima A.
7. La planta de la reivindicación 2 que se selecciona del grupo constituido por maíz, trigo, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, canola, lino, cebada, colza oleaginosa, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, lechuga, manzana, álamo, pino, eucalipto, acacia, liquidambar, pino radiata, pino taeda, píceas, teca, alfalfa, tréboles y otros cultivos de forrajes, céspedes, palma de aceite, caña de azúcar, plátano, café, té, cacao, nueces, almendras, uvas, cacahuets, petunia, caléndulas, vinca, begonias, geranios, pensamiento, impatiens, avenas, sorgo y mijo.
- 35 8. La planta de la reivindicación 2 en la que la secuencia del promotor deriva de una secuencia de un promotor de virus de ADN de planta.
- 40 9. La planta de la reivindicación 8 en la que dicha secuencia del promotor se selecciona del grupo constituido por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor 35S del virus del mosaico de Figwort (FMV), el promotor CaMV35S potenciado, el promotor FMV35S potenciado, el promotor del virus amarillo de la comelina y el promotor del virus baciliforme de ADN de la caña de azúcar.
- 45 10. La planta de la reivindicación 1, en la que dicha proteína se selecciona del grupo constituido por SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 8 y SEC. ID N°: 12.
- 50 11. La planta de la reivindicación 10 en la que la secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo constituido por SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 7, SEC. ID N°: 11 y SEC. ID N°: 19.
12. La planta de la reivindicación 1 en la que la secuencia de polinucleótidos deriva de un microbio y es complementaria a una secuencia de polinucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo constituido por SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 7, SEC. ID N°: 11, SEC. ID N°: 16, SEC. ID N°: 17, SEC. ID N°: 18 y SEC. ID N°: 19.
- 55 13. La planta de la reivindicación 1 en la que la secuencia de aminoácidos es al menos 95% homóloga a SEC. ID N°: 4.
14. La planta de la reivindicación 1 que se selecciona del grupo constituido por maíz, trigo, algodón, arroz, soja y canola.
- 60 15. La planta de la reivindicación 4 en la que la porción amino terminal del péptido de tránsito de cloroplasto de la proteína está codificada por una secuencia de ADN seleccionada del grupo constituido por SEC. ID N°: 9, SEC. ID N°: 13 y SEC. ID N°: 14.
- 65 16. Una semilla producida a partir de la planta de la reivindicación 1, en la que dicha semilla comprende dicha secuencia de polinucleótidos.
17. La planta de la reivindicación 1 que puede obtenerse por medio del cultivo de la semilla de la reivindicación 16.

## ES 2 325 874 T3

18. La planta de la reivindicación 1 que comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) que es funcional en las plantas.

5 19. Un procedimiento para producir una planta con tolerancia mejorada a los herbicidas, comprendiendo el procedimiento:

transformar dicha planta con una secuencia de polinucleótidos que comprende

- 10
- i) una secuencia de un promotor que funciona en las plantas unida de manera operativa a;
  - ii) una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a la SEC. ID N° 4, unida de manera operativa a;
  - 15 iii) una secuencia 3' no traducida que funciona en las plantas para causar la terminación de la transcripción; en el que dicha proteína transfiere un grupo acilo desde un compuesto donador acilado a la amina terminal del fosfonato de aminometilo (AMPA).

20 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha planta comprende un polinucleótido que codifica una enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) que es funcional en las plantas.

21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha secuencia de ADN estructural se selecciona del grupo constituido por SEC. ID N°: 3, SEC. ID N°: 7, SEC. ID N°: 11 y SEC. ID N°: 19.

25 22. El procedimiento de la reivindicación 19 ó 20, en el que dicha etapa de transformación comprende:

- a) insertar en el genoma de una célula de planta la secuencia de polinucleótidos;
- b) seleccionar una célula de la planta transformada en presencia de una cantidad selectiva de un herbicida de fosfonato; y
- c) regenerar una planta transformada genéticamente a partir de la célula de la planta transformada.

35 23. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha proteína se selecciona del grupo constituido por SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 8 y SEC. ID N°: 12.

24. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dicho fosfonato se selecciona del grupo constituido por glifosato y AMPA.

40 25. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la secuencia de aminoácidos es al menos 95% homóloga a SEC. ID N°: 4.

45

50

55

60

65

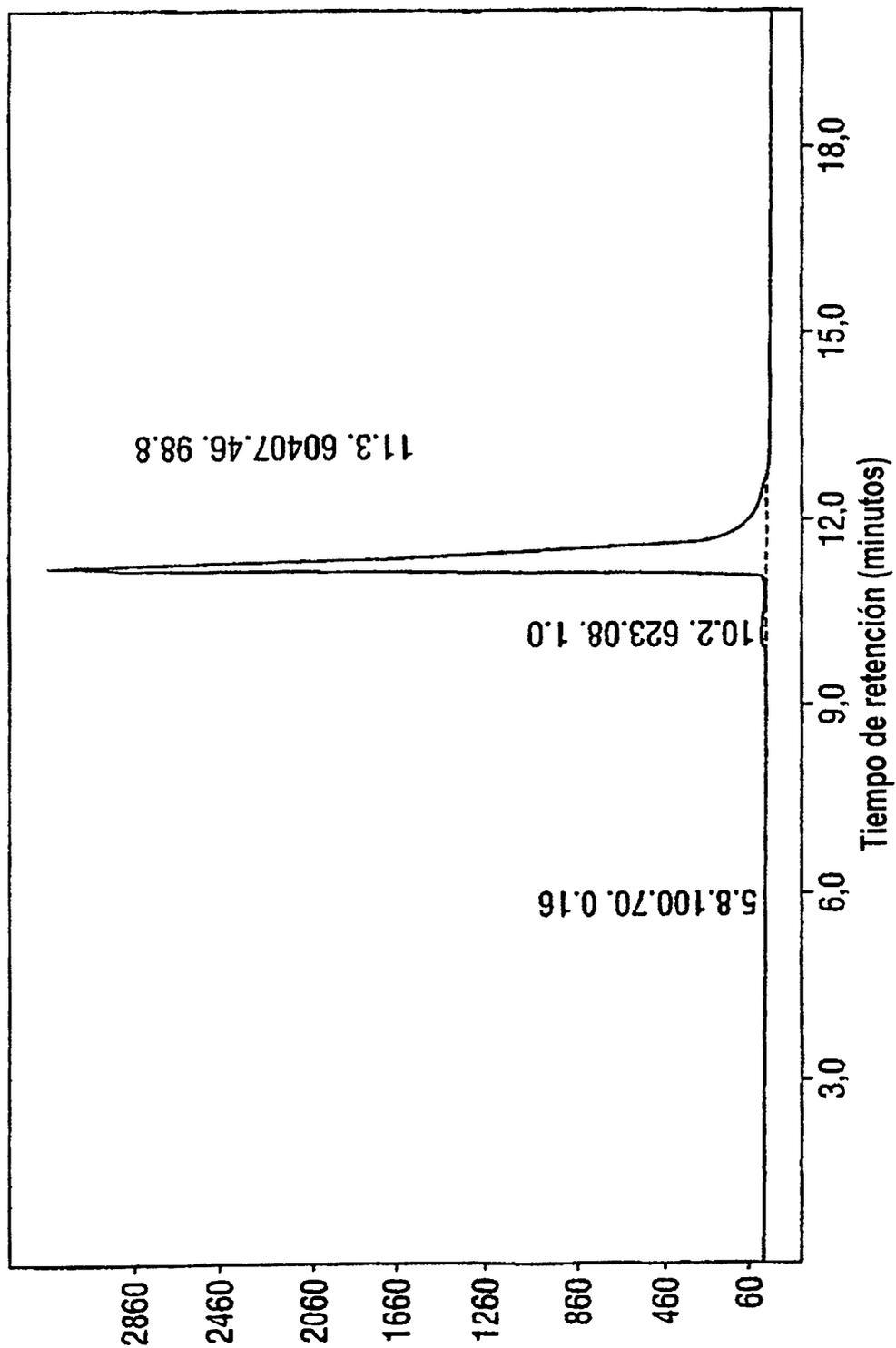


FIG. 1

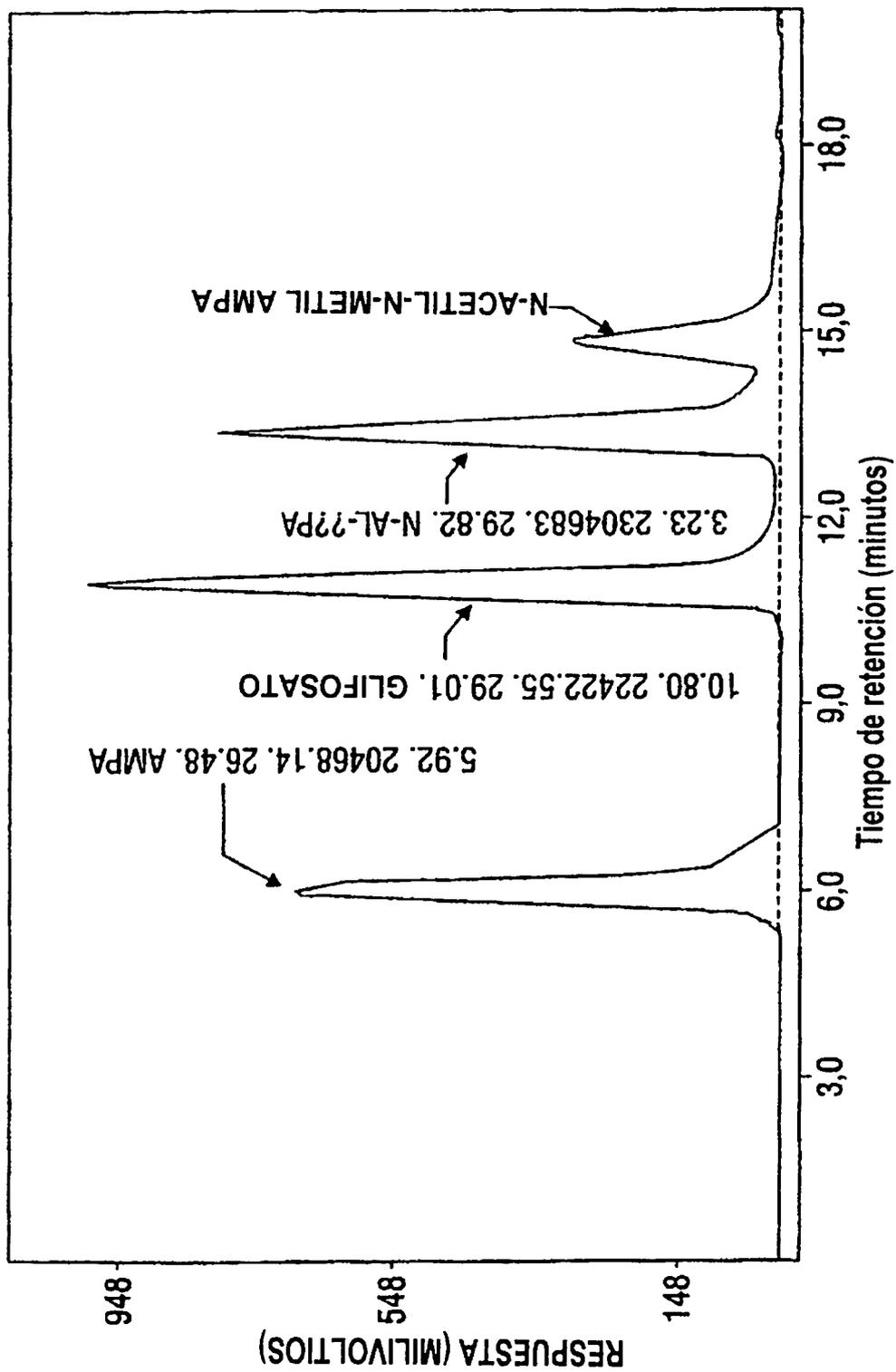


FIG. 2

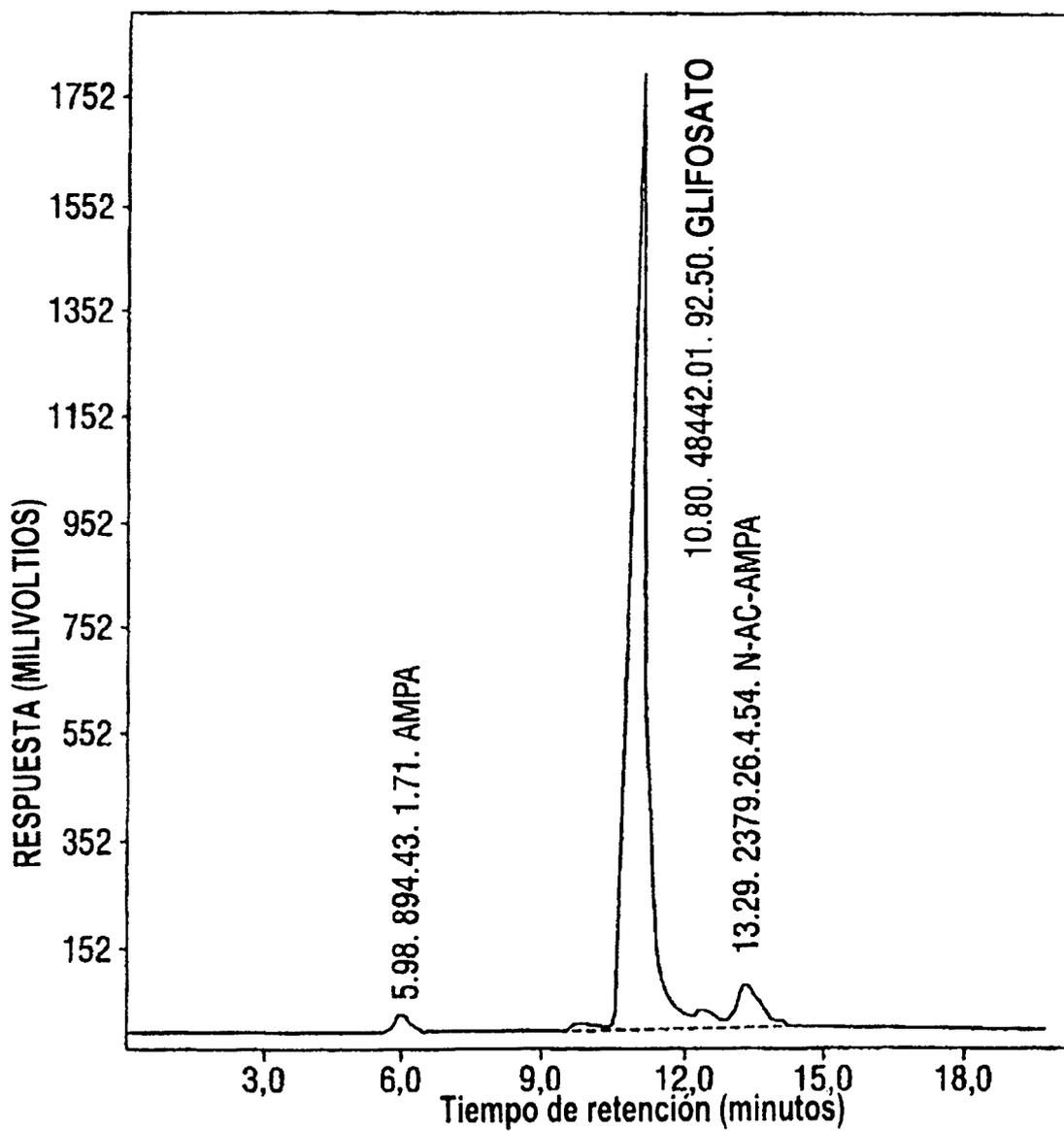


FIG. 3

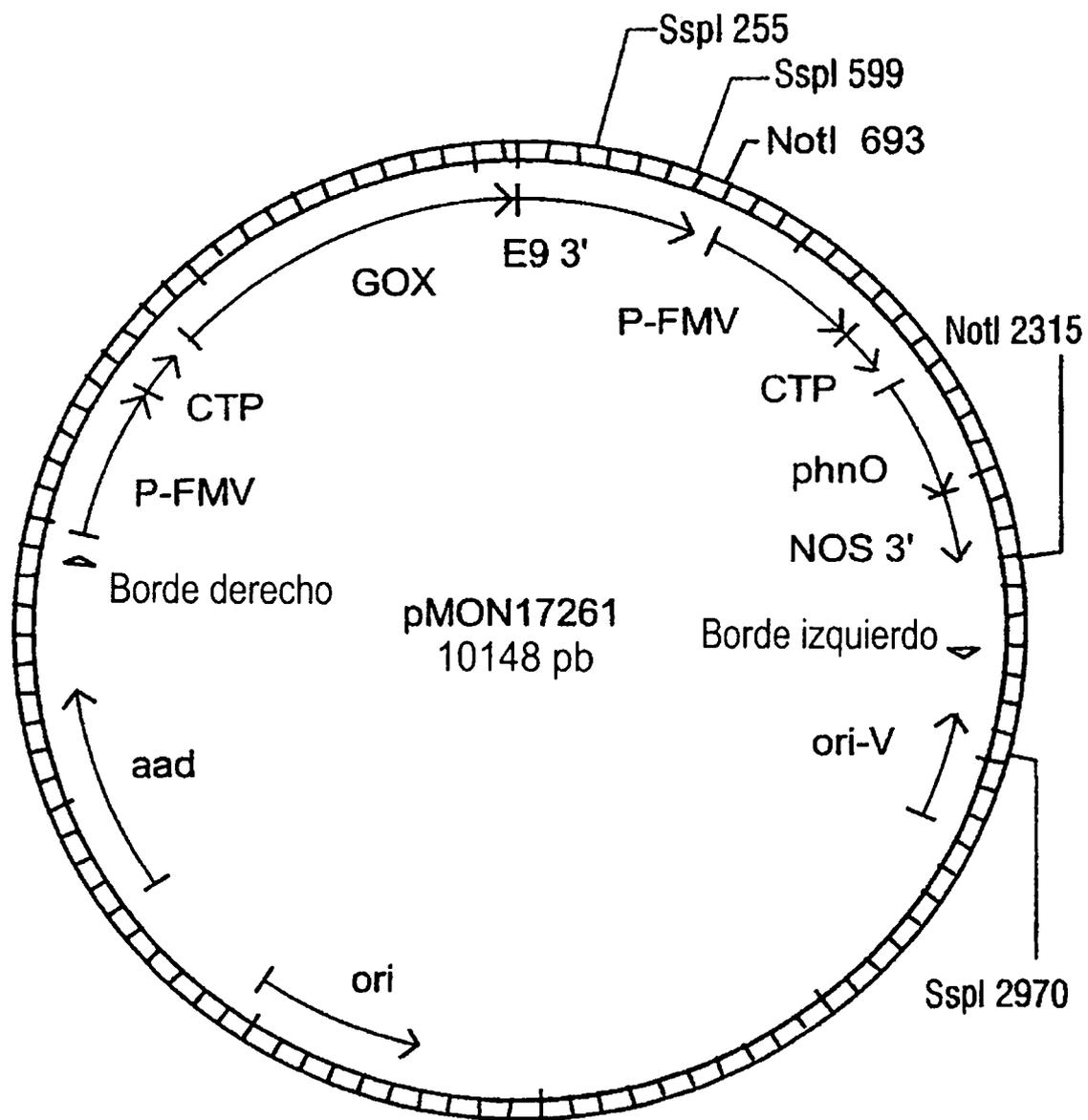


FIG. 4

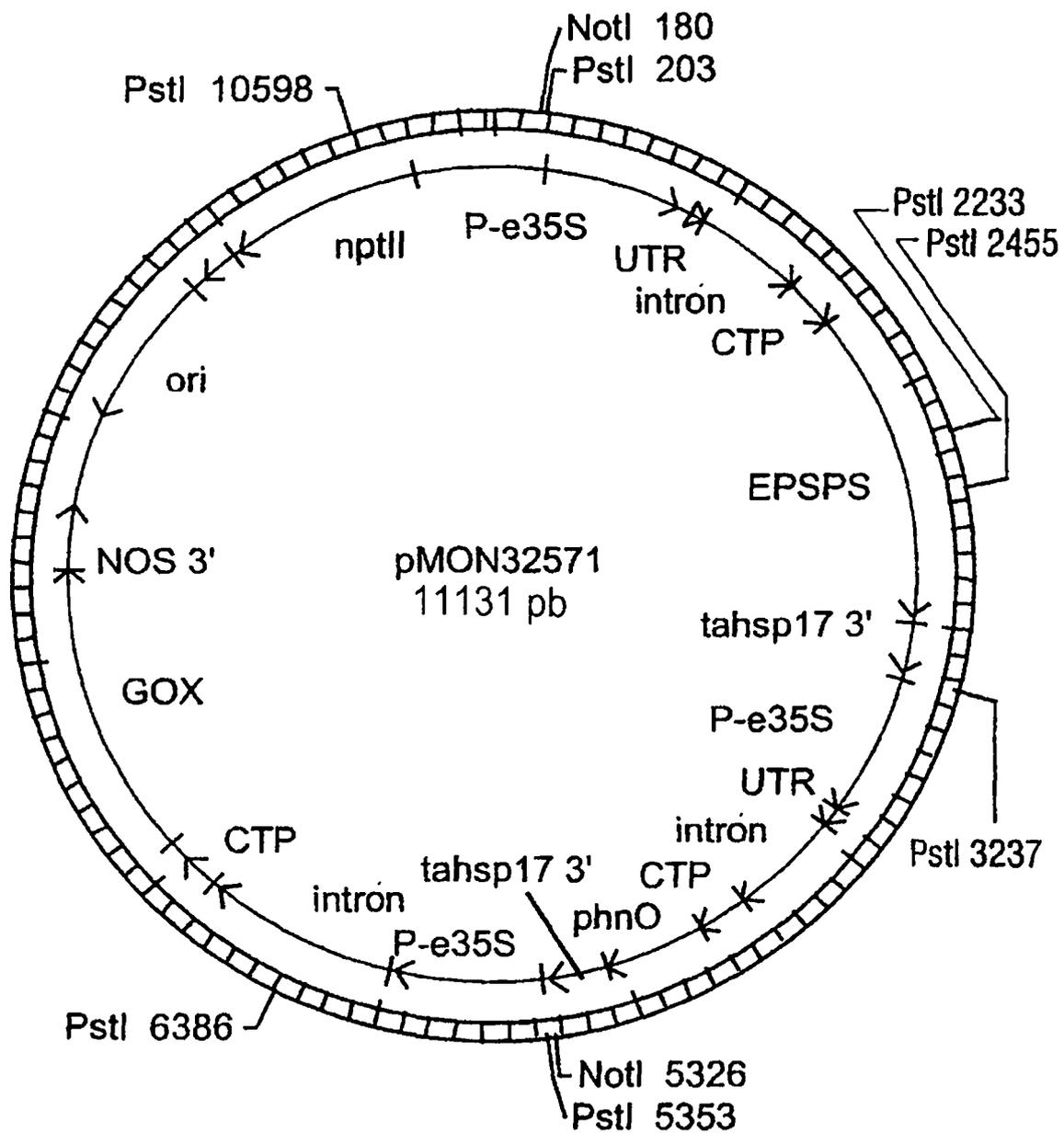


FIG. 5

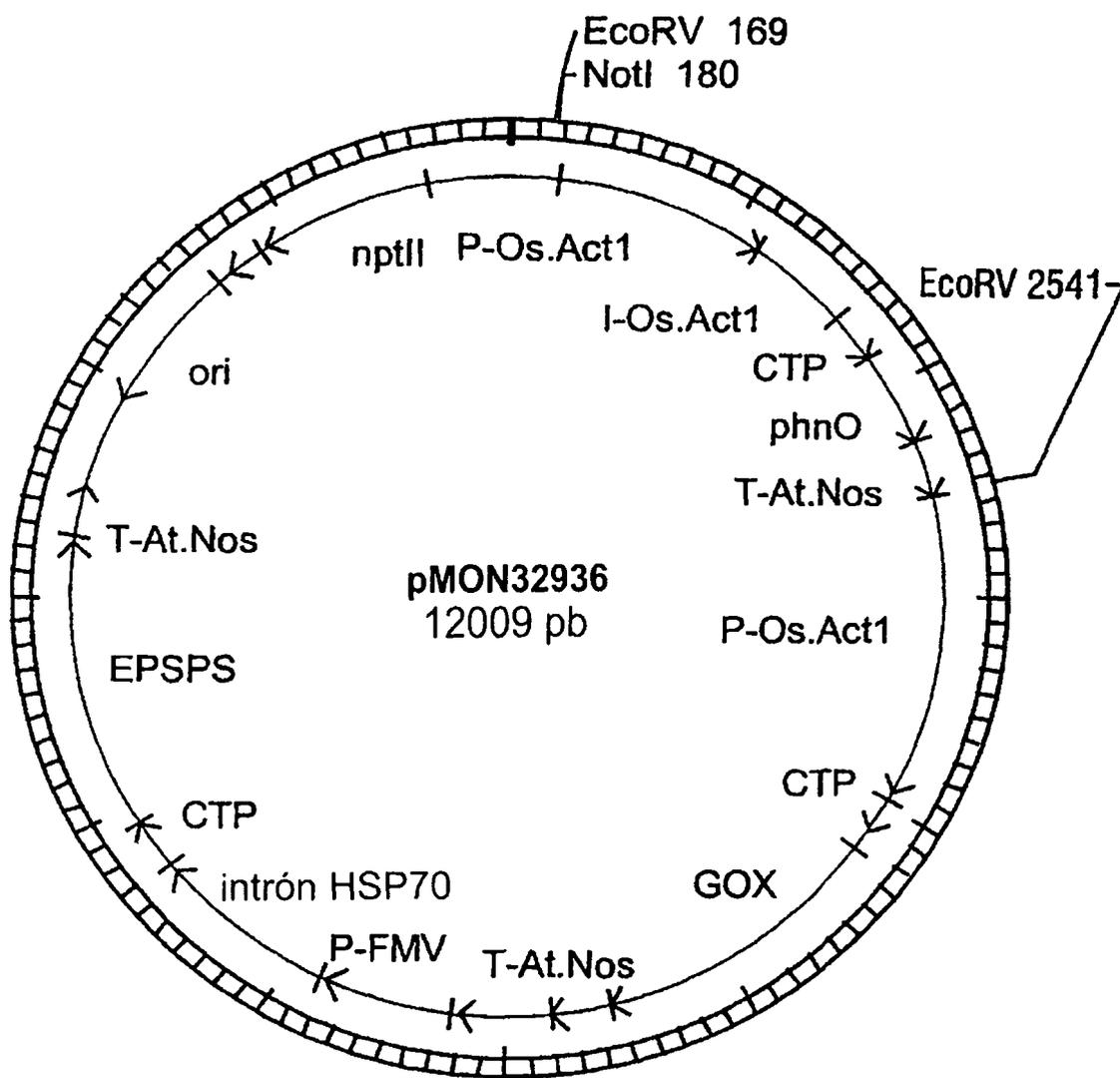


FIG. 6

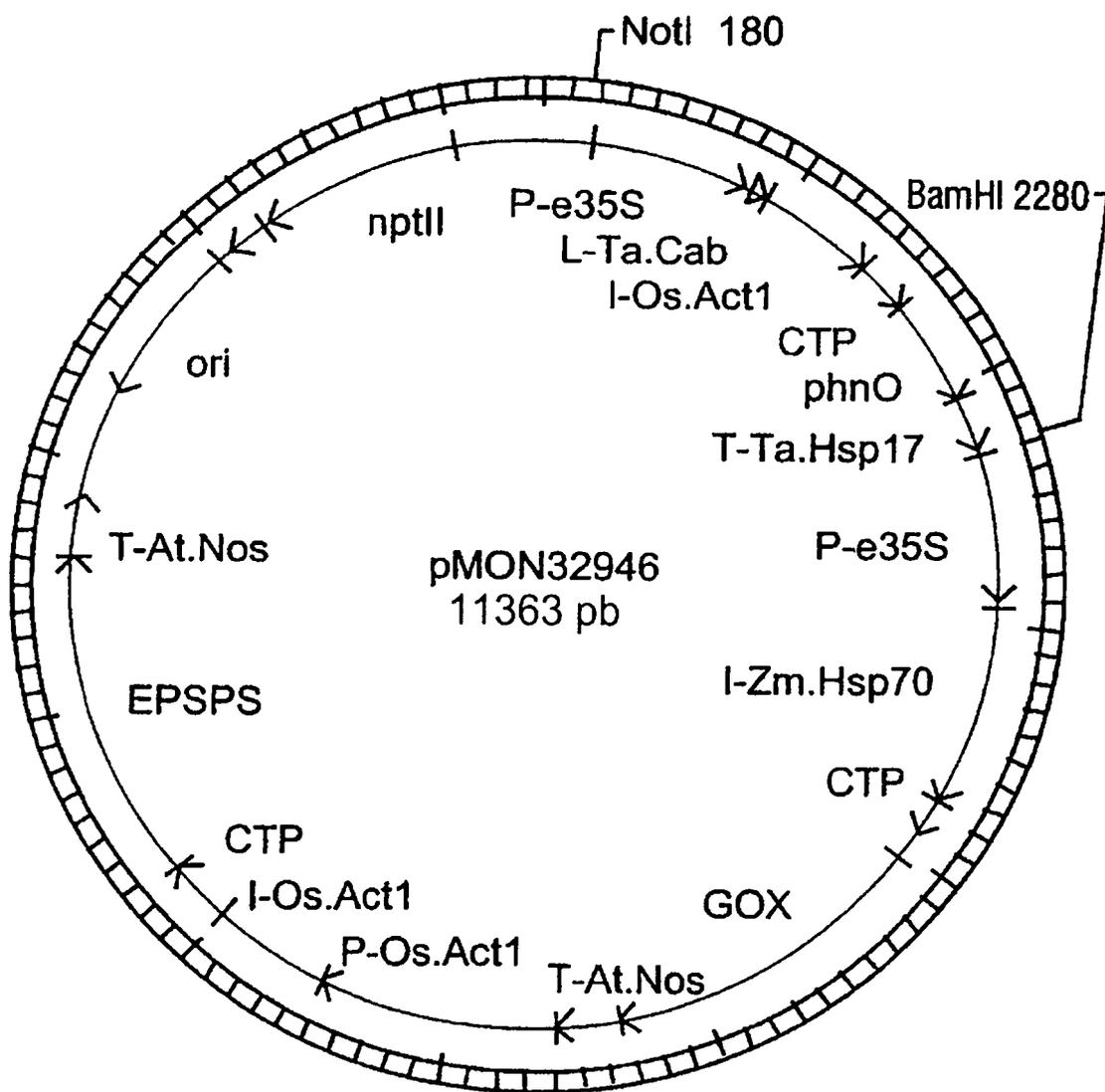


FIG. 7

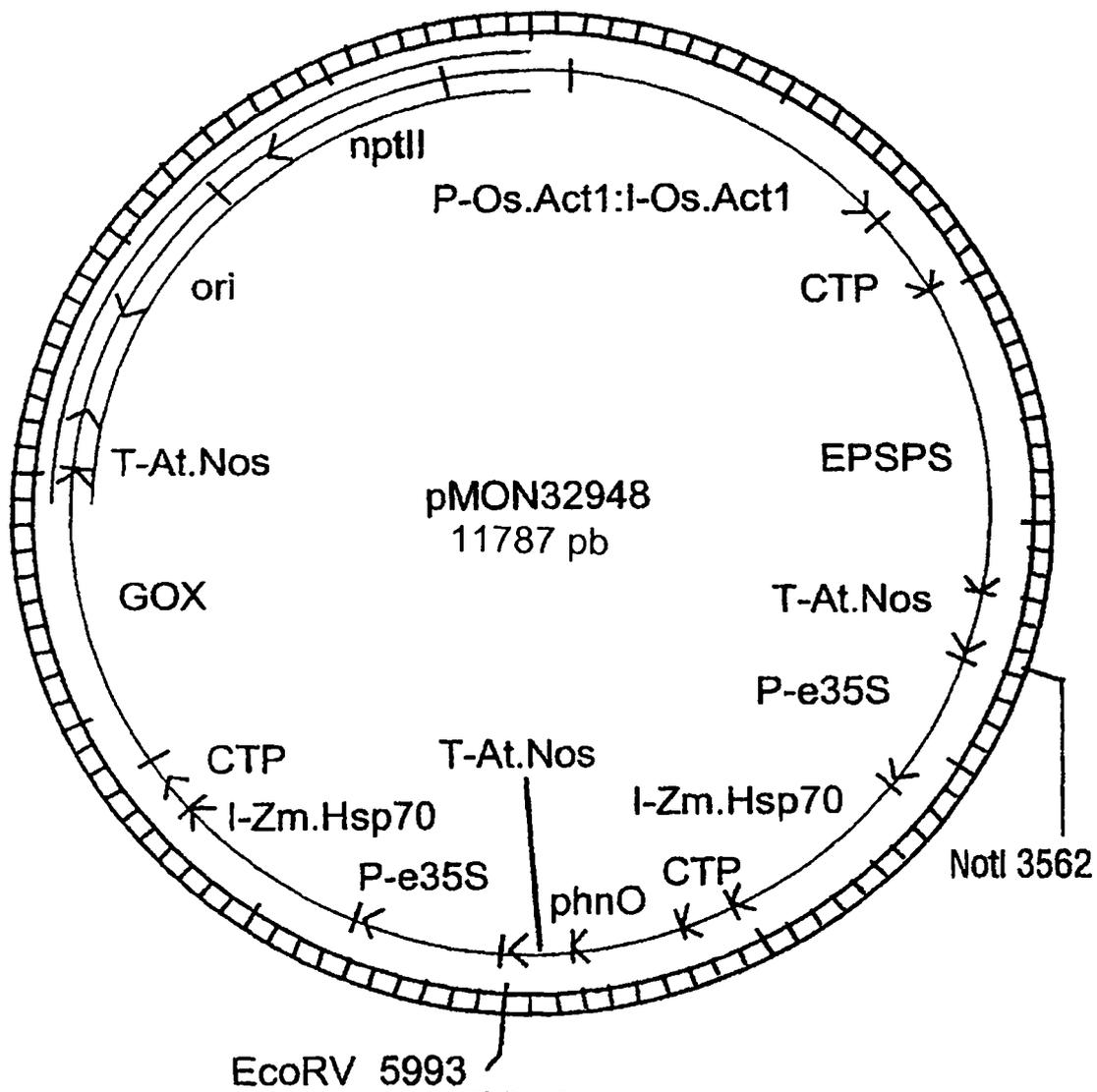


FIG. 8

# ES 2 325 874 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Barry, Gerard F.
- 5 <120> Plantas que metabolizan fosfonatos
- <130> 38-21 (15303) PhnO
- 10 <140> desconocido  
<141> 16-11-1999
- <150> 60/108.763
- 15 <151> 17-11-1998
- <160> 32
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1  
<211> 15611
- 25 <212> ADN  
<213> *Escherichia coli*
- <400> 1
- 30
- ggatccagca tcgacgccag tttttccacc attgtcagtc gcaggctaag eggcgcatTT 60
- aacatgccgc cgttcgtcca tgtctgaagc tgcacacgcg aaagaagtTC ctgcatcagt 120
- 35 cgttcacgaa actgctgctg atgggcttgt ggaaggcggg catcatcggc ctgcgccaga 180
- tccactaaaa agcgggggata aaccgactcc agcacgcgac cgggggcgTC cagtaacgTC 240
- ttggtcaata tcgTtctgCC gtgaaaagtg tttgaatata atcgcgtaac agctgggcgt 300
- 40 cggTgtaaat ccagccgtga gtcatcacag tctgctgcaa ttgctgctgc atcagcctga 360
- ccaccgattc attttgttga cgcagagcca ggctttcgcg taaacgcgTC tgtaattccg 420
- 45 tcaaacatga agcgaactca gcgaaaaaag tattcatgCC tgccgtaaca gattcatcga 480
- cctgctctgc cagaacttta gccatTTgtt ggcaataaag atcgacttct gcgcttaatg 540
- ctcgTtgcaa cacactgtaa tcaaccgTtt ctgtcgggga tttctcattt ccccgTcccc 600
- 50 agtcgggctg attcaaccag cgcgaaaaag tctcacgcac aacgcctaaa cgcgtgctct 660
- gctcgtccgt tgcattcctgg cgcgaaatga ctgcactgaa cagctggcga gtgTtgaagt 720
- 55 ggggaactac gccgtgaaaa acaggaaaat gaaaccagc acgaaaccct gactcgtca 780
- attccatttt gactTgttgc tcaatggggc gaataacatc ggttaacact cggcaaaggg 840
- tggattccag ctcggcaaaa cgcagcgtaa agtcgcgact gatggTgttc tgcgccgtct 900
- 60 gtaacagtgt ctcacagcgg gtacgcatct cgcttaacgg ctccgaatca tctgaaaca 960
- aggcggctaa ctgcgcattc agcgcattct gTtgttgacg cagaaagtgg ttggcggagg 1020
- 65 tcagggccag ctcgatttca tgtTtaatct cgcgcctcac ctgcgcctga ttgagTtgca 1080

## ES 2 325 874 T3

atagctgcaa actttcttcg acctgatgga tattttgccc caattgttca caagcgacgt 1140  
 ttaaccctg cgcacgaaaa tccaggtatt cccgcgctg ctgcgcgtaa ttcaacagtt 1200  
 5 tatgcgcagc agatcgcaaa gcatacaacg aggcggttagc gtaagcggca tgaagcaacg 1260  
 cctgaattgg ctgggcgaac agcgaatctt cccacaactg atcggcagca tgacgaatat 1320  
 10 gttcgaggtc cgccagatcg gcatgacgcc agcgccctgcc gagcgcggca tgggcaaaat 1380  
 cttccacca gcgttggtgc tctggcgctg gtaacttacc gttggtggct aactcatggc 1440  
 15 gcgcccgatt cgccaggtag ccccatatcg acgacaccgg aaatatctgc tgtggcgtaa 1500  
 tacagccttt catcagcgtc ccggaaatca gtgcccgcac ctggtcggcg tcgtcactgt 1560  
 20 tacgatcctg ttgatcgaac ttattgacca gcacatacag cggcaccgat tgccccaccg 1620  
 ccaaaatcgc ctcaacggacc tcttcatcgg agatcgattt cagttgcgta taatccagca 1680  
 ccgccagtac cgccgaggcg cgtgccagct gctgggtaag cattttttgc agatgcgggtt 1740  
 25 gcccgcttc atttggcccg ggggtatcca gtaacgtcaa ctgaccggga taactctcca 1800  
 gccccgccag atggacaaac tccacttcaa tcaacgggaat atgctcaatg gcggcgtaag 1860  
 30 cagaaaaagg aaaatcgacg tccagcgcct tcgccagtcg cactaaatca ttcaaacttt 1920  
 tcagacaatg aaaaataggc tgggcaccca gataatattt ttcgaaagcg acgccatttt 1980  
 35 cgatccgctg cataagcgca cgcatatctt tatctatttc cagcacatcg gtcagatgct 2040  
 taatatcgca atcacgcagg cgctgttgta attggtgaat taaacaatcg attggcgcgca 2100  
 40 catgtgaaaa atgcagtacc ggttcctttt gcccgggcgt atggcgaata agcgtcggca 2160  
 gcgcagtcac tgggcgatta cgattaggca gaacctccgt accaacaatg gcattaatgg 2220  
 tggttgattt ccctgctttc atggtaccga caattgcaag caccatttcc agtcgggaaa 2280  
 45 ttttacgcaa ctcatatttc agcatcgcgt gacgttcggc gatattaggc tgactccagg 2340  
 gtaaagccag ttgtggcgcg tcgtctccgg gtacagagag aggcattttt tccagtaact 2400  
 50 gcaactgttg gcgagaaagc tgtaacaggc gttcagcctc ctgacttaac tcatacaggg 2460  
 tctgtgtgta catagaaaat tcttccttaa agcaaatttt gttattttat ttagccagat 2520  
 55 tgtttttgag ttctgttttc ggcttttata attactgcaa gaaataattt tatatttagt 2580  
 gtgttgtttt ttatcagaat aaataacgtc ttctgatacg tttaaaacgt cagaaagata 2640  
 60 aaaatatcat gtgaattaaa aaaagaacaa gtgagacatt aacattatct taaataataa 2700  
 atagaggcaa aaagattatt ttctttttgc gtttcctttc aaatgaaaac gatcgtcgtc 2760

65

## ES 2 325 874 T3

taaaatcagc agtaccocccg acaaaactcag ggatthttgtg tataattgcy gcctthtttcy 2820  
 gcaatctgcc gthtttttggc gctthtttgccc tgctgacttt tgaggaaatc cacatgtcat 2880  
 5 taccacactg cccaaaatgc aactccgaat acacttacga agataacggc atgtacatct 2940  
 gcccggaatg tgcctacgaa tggaaacgacg cagaacctgc acaggaaagc gacgagctga 3000  
 10 tcgttaaaga tgctaacggc aatctgctgg ctgacggcga cagcgttacc atcattaaag 3060  
 atctgaaggt gaaaggtagc tcttcgatgc tgaaaattgg caccaaagtg aaaaacatcc 3120  
 15 gcctggttga aggcgacat aacatcgatt gcaaaatcga cggthtttggc ccgatgaaac 3180  
 tgaaatctga gthttgtgaaa aagaactgat tgtattgtga tcggtaagcc ggataaggcy 3240  
 ctccgcgccgc atccggcaac ggtgccagat gcctgatgcy acgcttgcy gccttatcag 3300  
 20 gcctacaaat tcccgcaccc tccgtaggcc ggataaggcy tttacgccgc atccggcaac 3360  
 ggtgccgact gcctgatgcy acgcttgcy gccttatcag gcctacaaat tcccgcaccc 3420  
 25 tccgtaggcc ggataaggcy tttacgccgc atccggcaac agtgccaact gcctgatgcy 3480  
 acgcttgcy gccttatcag gcctacaaat tcccgcaccc tccgtaggcc ggataaggcy 3540  
 30 tttacgccgc atccggcaat ggtgccgact gcctgatgcy acgcttgcy gccttatcag 3600  
 gcctacaaat tcccgcaccc tccgtaggcc ggataaggcy tttacgccgc atccggcaac 3660  
 agtgccgact gcctgatgcy acgcttgcy gccttatcag gccgcctctc atctgtataa 3720  
 35 atctcgaact acacttaact ggcttctctt aactgaggtc accatcatgc cgttaagtcc 3780  
 ctacctctct tttgccggtg actgthtccga cgcgattgcc tattatcaac gtacgttggg 3840  
 40 cgcggaactg ctctataaaa tcagcttcgg cgaaatgcc aatcagcgc aggacagcgc 3900  
 cgagaactgc ccttccggaa tgcaatttcc cgataccgcc atcgctcatg ccaacgtgcy 3960  
 45 cattgccgga agcgacatca tgatgagcga tgccatgcc tccaggaaaag ccagctactc 4020  
 cggctttacg ctggtgctcy attcgcaca ggtcgaagaa ggaaaacgct ggtttgacaa 4080  
 50 tcttgccgct aacggaaaaa tcgaaatggc ctggcaggaa actthtctggg cgcattggctt 4140  
 tggcaaagtc accgataaat ttggcgtacc gtggatgatt aatgtcgtca aacaacaacc 4200  
 aacgcaataa cccgccggga ggccccccct cccgcactgt catcgaattc ccgttaactc 4260  
 55 ttcattctgtt agtcacttht aattaaccaa atcgthcaca taatccgcca cgatggagcc 4320  
 actthtttag ggaggctgca tcatgcaaac gattatccgt gthcgagaagc thcgcaaac 4380  
 60 cttcaatcag catcagggcy tgcattcggt tgatctgaac atctatcag gtgaaatggt 4440  
 ggctctgctt gggccgctgg gthtccggcaa atccaccctt thacgtcact taagcggtht 4500  
 65

## ES 2 325 874 T3

gattaccggc gataaatccg ccggcagcca tategagctg ctgggcccga cagtccagcg 4560  
 cgaaggccgt ctggcgcgcg atatccgcaa aagccgcgcc aacaccggct acatcttcca 4620  
 5 acaattcaac ctggtgaacc gcctgagcgt actggagAAC gtgctgattg gcgCGctcgg 4680  
 cagcagcccg ttctggcgca cctgttttag ctggtttacc cgcgagcaga aacaacgcgc 4740  
 10 gttacaggcg ctgaccgcg ttggcatggt gcattttgcc catcaacgcg tttccacct 4800  
 ctccggcgga cagcagcagc gtgtggcgat tgcccgcgcg ctgatgcagc aggcgaaggt 4860  
 15 gattctggcc gatgaacca tcgcctcgt ggaccggaa tccgcccga tcgtgatgga 4920  
 caccctgcgc gacatcaatc agaacgacgg catcacctg gtcgtcacgc tgcacaggt 4980  
 ggattacgcc ctgcgctact gcgaacgcat cgtcgccctg cgccaggggc acgttttcta 5040  
 20 cgacggcagc agccaacagt ttgataacga acgttttgac catctctacc gcagcattaa 5100  
 tcgcatcgaa gagaacgcga aagctgcctg acatccccat cattgaggaa aacgaatgaa 5160  
 25 cgctaagata attgcctcgc tggccttcac cagcatgttc agcctcagca cctgttaag 5220  
 cccggcacac gccgaagagc aggaaaaggc gctgaatttc ggcatattt caacggaatc 5280  
 30 acagcaaac ctgaaaccgc aatggacgcc attcttacag gatatggaga agaagctggg 5340  
 cgtgaagggt aacgccttct ttgccccaga ctacgcaggc attatccagg gaatgcgctt 5400  
 caataaagtg gatatcgct ggtacggcaa cctgtcggca atggaagcgg tggatcgcg 5460  
 35 caacggccag gtcttcgccc agacggtcgc ggcggatgga tcgccaggtt actggagcgt 5520  
 gttgatcgtc aacaaagata gtccgatcaa caacctgaac gatctgctgg cgaagcggaa 5580  
 40 agatctcacc ttcggcaatg gcgaccta ctccacctct ggcttcctcg tccccggtta 5640  
 ctacgtcttc gccaaaaaca atatctcgc cagcgacttc aagcgcaccg tcaacgcgg 5700  
 45 gcatgaaacc aacgcgctgg ccgtcgcaa caagcagggt gatgtggcga ccaacaacac 5760  
 cgaaaacctc gacaagctga aaacctcgc gccggagaag ctgaaagaac tgaaagtgat 5820  
 50 ctggaaatcg ccgctgatcc caggcgatcc gatcgtctgg cgtaaaaatc tttccgaaac 5880  
 caccaaagac aagatctacg acttctttat gaattacggc aaaacgcccg aagagaaagc 5940  
 ggtgctggaa cgcctgggct gggcgccgtt ccgcgctcc agcgcacctg aactggtgcc 6000  
 55 gattcgccag ctgcactgt ttaaagagat gcagggcgtg aaaagcaata aaggactgaa 6060  
 tgagcaggac aagctggcaa aaaccaccgc gattcaggcg caactggatg acctggaccg 6120  
 60 cctgaacaac gcgctaagcg cgatgagttc ggtgagtaaa gcggtgcagt aaatcgtagg 6180

65

## ES 2 325 874 T3

tcggataaga cgccccggcg tcgcatccga caatgtgcag gcgttgatgc cggatgcggt 6240  
 gcaagcacct tatccggcct acagaccgga gccaaacatg caaacatca ccatcgcccc 6300  
 5 acccaagcgc agctggttct cgcttctgag ctgggcccgtt gttctcgccg tgctggctgt 6360  
 ctcgtagcag ggcgcgaaa tggccccgct cacgctgatt aaagacggcg gcaacatggc 6420  
 10 aaccttcgct gccgacttct tccccccga tttcagccag tggcaggatt acctcaccga 6480  
 aatggccgct acgctgcaaa tcgcccgtctg gggcaccgcg ctggcggtgg ttctctccat 6540  
 15 ccccttggc ctgatgagcg ccgaaaacct ggtgcccgtgg tgggtttacc agcccgttcg 6600  
 ccgcctgatg gacgcctgcc gcgccattaa cgaaatggtc ttcgccatgc tgttcgtggt 6660  
 cgccgtcggg ctccgaccgt tcgctggcgt gctggcgcta tttatccaca ccaccggcgt 6720  
 20 gctctccaag ctgctttccg aagcggtaga agcaattgaa cctggcccgg tggaaaggcat 6780  
 tcgcgccacc ggtgcccaaca agctcgaaga gatcctctac ggcgtgctgc cgcaggtgat 6840  
 25 gccgctgctg atctcctact ccctctatcg cttcgaatcc aacgtccgct cggcgaccgt 6900  
 cgtcggcatg gtcggcgcg gcgggatcgg cgtcacctg tgggaagcga ttcgcggttt 6960  
 30 ccagttccaa caaacctgcg ccctgatggt gcttatcctc gtcacgggtca gctgctgga 7020  
 tttcctctct caacggttgc gtaagcactt tatctgataa gcgaggcatt gatatctatg 7080  
 cacttgctca cacatccgac cagctaccca acacgctatc aagagatagc cgcaaaactt 7140  
 35 gagcaggagc ttcgtcaaca ctaccgctgc ggcgactatc tccccgccga gcagcaactg 7200  
 gcagcgcgct ttgaggtgaa tcgccacacc ctgcgcccgc ccatcgacca actggtggaa 7260  
 40 aaaggctggg tacagcgccg tcagggcgct ggcgtgctgg tgctgatgcg cccgttcgat 7320  
 taccgctca acgcccaggc gcgttttagc cagaatctgc tggatcaggg cagccatccc 7380  
 45 accagcgaaa aactgcttcc ggtattgccc cccgctccg gccacgtcgc tgacgcactg 7440  
 gggattaccg agggggagaa cgtcatccac ctgcgcaccc tgcgtcgggt caacggcgtc 7500  
 50 gcgctctggt taatcgacca ctacttcgcg gacctcacc tctggccgac gctgcaacgc 7560  
 ttcgacagcg gctcgtgca cgatctctg cgcgagcaaa ccggaattgc gctgcgccgc 7620  
 agccagacgc ggatcagcgc ccgcccgcgc caggccaaag agtgccagcg tcttgaatc 7680  
 55 ccgaatatgt cgcgctgct gtgcgtgccc acccttaacc accgtgacgg tgaaagcagc 7740  
 ccggcggagt actccgtcag cctgacgccc gccgacatga ttgaattcac tatggagcac 7800  
 60 tgaatgcacg cagataccgc gacccgccag cactggatgt ccgtgctggc gcacagccaa 7860  
 ccggctgaac tggcagcag cctgaacgcg ctaaaccatca ccgccgacta tgaggtgatc 7920

65

# ES 2 325 874 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

```

cgcgccgctg aaactggcct ggtacagatt caggcgcgga tgggcggcac cggcgaacgt 7980
ttttttgccg gcgacgccac gctgacccgc gccgccgtgc gcctgactga cggcacgctc 8040
ggctacagct gggtgctggg gcgtgataaa cagcacgccg aacgctgcgc gctgattgac 8100
gcgctgatgc agcaatctcg ccactttcaa aacttatcag aaacccttat tgccccgctg 8160
gacgctgacc gtatggcacg cattgccgca cgccaggccg aagtgaacgc cagccggggtc 8220
gacttcttta cgatggttcg cggagacaac gcatgaccct ggaaaccgct tttatgcttc 8280
ccgtgcagga tgcccagcac agttttcgtc gctgttaaaa ggccatgagc gagccggggcg 8340
tgattgtegc cctgcatcag ctcaaacgcg gctggcaacc gctgaatatc gccaccacca 8400
gcgtgctgct gacgctggcc gataacgaca cgccggtgtg gctttctacc ccattaaata 8460
acgatatcgt caaccagagc ctgctgtttc ataccaacgc gccgctggtc agccagccgg 8520
aacaggcgac cttcgcggtg acggatgagg cgatttccag cgaacagctc aacgcccttt 8580
ccaccggcac cgccgttgcg ccggaagcgg gcgcgacgct gattttacag gtcgccagcc 8640
tgagcggcgg gcgcatgttg cgtctcaccg gcgcggtat tgccgaagaa cgaatgatcg 8700
ctccgcagct gccggagtgc attctgcacg aactcaccga gcgcccgcac ccgttcccgc 8760
tcggcatcga cctgatcctg acctgcggcg aacgcctgct ggctattccg cgaaccacgc 8820
atgtggaggt gtgctgatgt acgttgccgt aaaagggggc gaaaaggcga tcgacgccgc 8880
ccacgccctg caagagagcc gacgccgggg cgataccgat ttgcctgaac tgagcgtcgc 8940
ccagattgaa cagcagctta acctcgcggt agatcgcgtg atgaccgaag gcggcattgc 9000
cgaccgcgaa ctggcggcgc tggcgtgaa acaggccagc ggcgataacg ttgaagcgat 9060
tttctgctg cgcgctacc gcaccacggt ggcgaaagctg gcggtaaagc agccgctcga 9120
caccaccggg atgctctcgc aacgccgtat ctccgccgtt tataaagaca ttcccggcgg 9180
ccagetgctt ggcccaacct acgactacac ccacgcctg ctcgatttta ccctgctggc 9240
aaacggcgaa gcgccgacgc tgaccaccgc cgacagcgaa caacagccgt cgccgcacgt 9300
tttcagcctg ctggcgcgtc aggggctggc gaagtttgaa gaggatagcg gcgcacagcc 9360
ggatgacatc acccgcacgc cgccggttta cccctgctca cgttcttccc gtttgcagca 9420
gttgatgcgc ggcgacgaag gctatttgct ggcgctggcc tactccacc agcgtgggta 9480
cggacgcaat cacccttcg cgggcgagat ccgcagtggg tacatcgacg tgtcgattgt 9540
gccggaagag ctgggatttg cggtaaacgt cggcgaacta ctgatgaccg agtgtgaaat 9600
  
```

65

## ES 2 325 874 T3

ggtcaacggt tttatcgacc cgccggatga gccgccgcac ttcacgcgcg gctacgggct 9660  
 ggtattcggc atgagcgagc gcaaagcgat ggcaatggcg ctggtcgatc gtgcggtgca 9720  
 5 ggctccgaa tacggcgagc acgcgacagg cccggcgag gatgaagagt ttgtgctggc 9780  
 acatgccgac aacgtcgaag ccgcaggctt tgtctcgac ctcaaactcc cccactacgt 9840  
 10 cgatttccag gccgaactgg agctactcaa acgtctgcaa caggagaaga accatggcta 9900  
 atctgagcgg ctacaacttt gcctacctcg acgagcagac caaacgcatg atccgcgcg 9960  
 15 ccatcttaaa agcggtgggc atccccggtt atcagggtgc gtttggcggg cgcgagatgc 10020  
 cgatgccata cggctgggga accggcggca tacagctcac cgccagcgtg attggcgaaa 10080  
 gcgacgtgct aaaggtgatt gaccagggtg cggatgacac caccaacgcc gtgtcgattc 10140  
 20 gcaacttctt taagcgcgtg accggggtaa acaccactga acgtacggac gatgcgacgc 10200  
 ttatccagac gcgtcaccgc atccccgaaa cgccgctgac cgaagatcag atcattatct 10260  
 25 tccaggtgcc aatcccgaa ccgctgcgct ttatcgagcc gcgcgaaacg gaaaccgcga 10320  
 ccatgcacgc gctggaagag tacggcgtga tgcaggtgaa actgtatgaa gatatcgccc 10380  
 30 gcttcggtca tategccact acctacgct atccggtgaa ggtgaacggg cgctacgtaa 10440  
 tggaccgctc gccgatcccg aaattcgata acccaaaaat ggacatgatg cccgccctgc 10500  
 aactgttcgg cgcggggcgc gagaagcgca tctatgcggt gccgcggtt acccgcgtgg 10560  
 35 aaagtctega tttcgacgat caccggttca ccgttcagca gtgggatgag ccatgcgcca 10620  
 tctgcggatc gaccacagc tatcttgatg aagtgggtct ggatgacgcc ggaaaccgca 10680  
 40 tgtttgtctg ctccgatacc gattattgcc gccaacagag cgaggcaaaa aaccaatgaa 10740  
 tcaaccgtta ctttcggtca ataacctgac ccaccttac gcgccgggca aaggcttag 10800  
 45 cgatgtctct tttgatttat ggccggggga agtgctgggc attgtcgggg aatccggctc 10860  
 cgggaagacc acgctgctga agtcgatctc cgcgcgcctg acgccgcagc agggggaaat 10920  
 treactacgag aaccgttcgc tgtatgcaat gagcgaggcc gaccgccgct gcctgctgcy 10980  
 50 taccgaatgg ggcgtggtgc atcagcatcc actcgacggc ctgcgccgcc aggtgtcggc 11040  
 aggcggcaat atcggcgagc ggctgatggc gaccggggca cgtcattacg gcgatattcg 11100  
 55 tgccaccgcy cagaagtggc tggaagaggt ggagattccc gccaacggga tcgacgacct 11160  
 gccgaccacc ttttcggcg gtatgcagca gcgtttgcag attgcccgca acctggtgac 11220  
 60 gcatccgaag ctggtgttta tggatgaacc gaccggcggg ctggatgtgt cgggtgcaggc 11280  
 ccgcctgctc gacctgctgc gcggcctggt ggtggagctg aacctcgcgg tgggtattgt 11340

65

## ES 2 325 874 T3

caccatgat ttaggcgctg cccgcctgct ggccgaccgt ttgctggtga tgaagcaggg 11400  
 gcaagtgggtg gagagtgggt taaccgaccg cgtgctcgac gaccgcctac atccgtatac 11460  
 5 acagctgctg gtgtcatcgg ttttgcagaa ttgagccggt gccggatgcg gcgtaaaccg 11520  
 cttatccggc ctacaaatgc gctccccgta ggtcggataa gacgcgctcag cgtcgcctcc 11580  
 10 gacaccggaa ccacgagggc aaaaatgatt aacgtacaaa acgtcagtaa aaccttcctc 11640  
 ctgcaccagc aaaacggcgt gcgcctgccc gtccctcaatc gcgcctcctc caccgtcaac 11700  
 15 gcggggcgaat gcgtgggtgct ccacggccat tccggcagcg gcaaatcaac tctgctacgc 11760  
 tcgctgtacg ccaactatct acccgacgaa ggtcaaatcc agatcaaaca cggtgacgag 11820  
 tgggtagacc tggtcaccgc gccagcgcgc aaagtgggtg aaatccgcaa aaccaccgtc 11880  
 20 ggctgggtga gccagtttct gcgcgctcct ccgcgtatct cagcactgga agtgggtgatg 11940  
 cagccgctgc tcgataccgg cgttccgcgt gaagcctgcg ccgctaaagc cgcgcgtctt 12000  
 25 ctcaaccgcc tgaacgtgcc ggaacgcctg tggcacctgg caccatcgac attttccggt 12060  
 ggccaacagc agcgcgtcaa catcgcccgc ggctttatcg tcgactacce cattctgctg 12120  
 30 cttgacgaac ctaccgcctc gctggacgcc aaaaacagcg ccgcgggtgg ggaactgatt 12180  
 cgcgaagcca aaaccgcgtg cgcagccatc gtaggcctct tccatgacga agctgtacgt 12240  
 35 aatgacgtcg ccgaccgcct gcacccaatg ggagcctctt catgattatc aataacgtta 12300  
 agctgggtgct ggaaaacgag gtggtaagcg gttcgcctgga ggtgcagaac ggcgaaatcc 12360  
 gcgcctttgc cgaaagccag agccgcctgc cggaggcgat ggacggcgaa ggccgctggc 12420  
 40 tgctgccggg gctgattgag ctgcataccg ataatctgga taaattcttc accccgcgcc 12480  
 cgaaagtga ctggcctgcc cactcggcga tgagcagcca cgacgcgctg atgggtggcga 12540  
 45 gcggcatcac caccgtactg gatgccgtgg caattggcga cgtgcgcgac ggccggcgatc 12600  
 ggctggagaa tctggagaag atgatcaacg ccatcgaaga gacgcagaaa ccgcggctca 12660  
 50 accgcgcoga gcaccgtctg catctgcgct gcgaactgcc gcatcacacc acgctgccgc 12720  
 tgtttgaaaa actggtgcag cgcgagccgg tgacgctggt gtcgctgatg gaccactcgc 12780  
 cgggccagcg ccagttcgcc aaccgcgaga agtatcgcga atattatcag ggcaaatact 12840  
 55 cctcactga tgcgcagatg cagcagtacg aagaagagca actggcgctc gccgcacgct 12900  
 ggtcgcagcc gaatcgcgaa tccatcgccg ccctgtgccg cgcgcgaaaa attgcgcttg 12960  
 60 ccagccaaga tgacgccacc cagccccagc ttgctgaatc tcaccagctt ggcagcgtga 13020

65

## ES 2 325 874 T3

tcgccgaatt tcccaccacg ttcgaagcgg cggaagcctc gcgcaagcat ggcatgaacg 13080  
 tgctgatggg cgcgccgaat attgtgcgcy gcggctcgca ctccggcaac gtggcgggcca 13140  
 5 gtgaactggc gcagcttggc ctgctggata tcctctcttc cgactactac cccgccagcc 13200  
 tgctcgatgc ggcatttcgc gtcgccgatg acgagagcaa ccgctttacg ctgccgcagg 13260  
 10 cggatgaagct ggtgactaaa aatccagcgc aggcgcttaa tctccaggat cgcgggggtga 13320  
 ttggcgaggg caaacgcgcc gacctggtgc tggcgcatcg caaggacaat catattcata 13380  
 15 tcgaccaegt ctggcgctcag ggtaaaaggg tgttctgatg atgggaaaac tgatttggtt 13440  
 aatggggccg tccggctccg ggaaagacag cctgctggcg gaactccgcc tgcgggaaca 13500  
 aactcagtta ctggtggcgc atcgctacat cacgcgcgat gccagcgcgc gaagtgaaaa 13560  
 20 ccatatcgcc ctgagcgcgc aggagttttt taccgcgcgc gggcaaaatc tgttggcctt 13620  
 aagctggcac gctaacggtc tgtattatgg cgtcggcgtc gagattgate tctggctgca 13680  
 25 cgccggattc gacgtgctgg tcaacggctc acgcgcccat ctgccgcagg cgcgggcgcgc 13740  
 ctatcaatcg gcgctgctgc ccgtctgttt acaggtttcg ccggagatcc tccgccagcg 13800  
 30 cctggaaaac cgtggccgtg aaaacgccag tgaattaac gccgcctgg cgcgcgcgcgc 13860  
 ccgctatact ccacaggatt gccatacgtc caacaatgac ggcagcctgc gccagtcggt 13920  
 cgacacgctg ctgacgctga tccatcagaa ggagaaacac catgcctgct tgtgagcttc 13980  
 35 gcccgccac gcagtacgac accgacgcgc tttacgcgct gatttgtgag ctaaaacagg 14040  
 cggagtttga ccaccagcg tttcgcgtgg gttttaacgc caatctgcgc gacccaaaca 14100  
 40 tgcgctacca tctggcgctg cttgatggcg aagtgtcgg catgatcggc ctgcatttgc 14160  
 agtttcatct gcatcatgtc aactggatcg gcgaaattca ggagttggtg gtaatgccgc 14220  
 45 aggcgcgcgc tctgaacgtc ggcagtaagt tactggcgtg ggcagaagaa gaagcccgcc 14280  
 aggccggggc cgaaatgacc gaactttcga ccaacgtgaa gcgccacgac gcgcaccggt 14340  
 50 tctatctgcy cgaaggctac gagcagagcc acttccgctt caccaaggcg ctgtaacatg 14400  
 agcctgaccc tcacgctcac cggcacccgc ggcgcacagg gcgttccggc atggggctgc 14460  
 gagtgtgcyg cctgcgccag agcgcggcgc tcgccgcagt atcgcgccca accgtgcagc 14520  
 55 ggcgtagtga agtttaacga cgcaatcacc ctgatcgacg ccgggctgca cgatctcgcc 14580  
 gatcgctggt cgcccggatc gttccagcag tttttgctga cgcattatca tatggatcac 14640  
 60 gtccaggggc tgtttccgct gcgctggggc gttggcgatc cgatcccggc ttacggcccg 14700  
 ccggatgaac agggctgcga cgatctgttt aaacatccgc gcctgcttga tttcagccac 14760

65

## ES 2 325 874 T3

acggtggaac cgtttgtggt gtttgatttg caggggttac aggtcacgcc cctgccgctc 14820  
 aaccactcaa aactgacctt cggttatctg ctggaaacgg cacacagccg ggtggcgagg 14880  
 5 ctgtctgaca ccgcaggctt gccggaaaaa acgctgaaat ttttacgcaa taatcagccg 14940  
 caggtaatgg tgatggattg cagtcacccg ccgcgcgcgg atgcaccgcg taatcactgt 15000  
 10 gatttaaata ccgtgcttgc gctgaatcag gttatccgct cgccacgggt gattctgacc 15060  
 catatcagcc accagtttga tgcgtggctg atggaaaacg cactaccgtc agggtttgag 15120  
 15 gtgggggttg atgggatgga gattgggggtg gcgtgatgag agggaatgtg ccgcctggcc 15180  
 ccctcacctt aaccctctcc ccagaggggc gaggggaccg attgtgctcg atattgaata 15240  
 ttgcgctcgt tttctccctc tccccattgg ggtgaggggc gatgcctgct ccatacccaa 15300  
 20 cctcatcgcc catactcacc ttcattctc cgctcttcat cctccagttg ccgacgctcc 15360  
 tgatcaagct ggcgctggcg atcgtccagc tgcttgcggc gatcttcaa ctggcggcgg 15420  
 25 cggtcgctcat attgtctgcg ccgatcgtcg ctcaactcac gctgccagcc gtggctcgcg 15480  
 gaatcttcat agttgaagcg gcgcacgaaa aacgcgaaag cgtttcacga taaatgcgaa 15540  
 30 aactttagct ttcgcgcttc aatgaaaca gatgtattaa ttactgcttt ttattcatta 15600  
 catggggatc c 15611

35 <210> 2  
 <211> 11672  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
 40  
 <400> 2

45 gaattcccgt taactcttca tctgttagtc acttttaatt aaccaaactc tcacaataat 60  
 ccgccacgat ggagccactt ttttagggag gctgcatcat gcaaacgatt atccgtgctg 120  
 agaagctcgc caaaaccttc aatcagcacc aggcgctgca tgcggttgat ctgaacattc 180  
 50 atcacggtga aatggtggct ctgcttgggc cgtcgggttc cggaaaatcc acccttttac 240  
 gtcacttaag cggtttgatt accggcgata aatctgtcgg tagccatacc gagctgctgg 300  
 55 gccgcacagt ccagcgcgaa ggccgcctgg ccgcgatat ccgcaaaagc ccgcgccata 360  
 ccggctacat attccaacaa ttcaacctgg tgaaccgcct gagcgtactg gagaacgtgc 420  
 60 tgattggcgc gctcggcagc acgccgttct ggcgcacctg ttttagctgg ttcaccggcg 480  
 agcagaaaca gcgcgcgtta caggcgtgga ccgcgcttgg catggtgcat tttgcccatc 540  
 65 agcgcgcttc caccctctcc ggccggccagc agcaacgtgt ggcgattgcc cgtgcgctga 600

## ES 2 325 874 T3

tgcagcaggc gaaagtgatt ctggccgatg aacccatcgc ctcgctggac ccagaatcag 660  
 cgcgcatcgt gatggacacc ctgcgcgaca tcaaccagaa cgacggcatc accgtgggtcg 720  
 5 tcacgctgca tcaggtggat tacgocctgc gctactgcga acgcatcgtc gccctgcgcc 780  
 aggggcacgt cttctacgac ggcagcagcc aacagtttga taacgaacgt tttgaccatc 840  
 10 tctaccgcag cattaaccgc gtcgaagaga acgcgaaagc tgccctgacat ccccatcatt 900  
 gaggaaaacg aatgaacgct aagataattg cctcgtctggc cttcaccagc atgttcagcc 960  
 15 tcagcacctt gttaagcccg gcgcacgccg aagagcagga aaaggcggtg aatttcggca 1020  
 ttatttcaac ggaatcacag caaaacctga aaccgcaatg gacgcccgtc ttgcaggata 1080  
 20 tggagaagaa gctgggctgt aaggccaacg ccttctttgc cccggactac gcgggcatta 1140  
 tccaggggat gcgcttcaat aaagtggata tcgacctgga cggcaatctg tcggcgatgg 1200  
 aagcggtgga tcgcccgaat ggccaggtct tcgcccagac ggtcgcggcg gatggatcgc 1260  
 25 cgggttactg gagcgtgttg atcgtcaaca aagacagtcc gatcaacaac ctgaacgatc 1320  
 tgctggcgaa gcggaaagat ctcacctttg gcaatggcga tcctaactcc acctctggct 1380  
 30 tcctcgtccc cggctactac gtcttcgcca aaaacaatat ctccgccagc gacttcaagc 1440  
 gcaccgtcaa cgccgggcat gaaaccaacg cgctggccgt cgccaacaag cagggtggatg 1500  
 35 ttgccaccaa caacaccgaa aacctcgaca agctgaaaac ctccgcgcca gagaagctga 1560  
 aagaactgaa ggtgatctgg aagtcgccgc tgatcccagg cgatccgatc gtctggcgca 1620  
 agaatctttc cgaaaccacc aaagacaaga tctacgactt ctttatgaac tacggcaaaa 1680  
 40 cgccggaaga aaaagcgggtg ctggaacgcc tgggctgggc gccattccgc gcttccagcg 1740  
 acctgcaact ggtgccgatt cgccagctcg cgctgtttaa agagatgcag ggcgtgaaaa 1800  
 45 gcaataaagg actgaatgag caggacaagc tggcaaaaac caccgagatt caggcgcagc 1860  
 tggatgacct ggaccgcctg aacaacgcgc taagcgcgat gagttcgggtg agtaaagcgg 1920  
 50 tgcagtaaat cgtaggtcgg ataagacgcc ccggcgtcgc atccgacaat gtgcaggcgt 1980  
 tgatgccgga tcgggtgcaa gcaccttata cggcctacag accggagcca aacatgcaaa 2040  
 ccatcaccat cgccccacc aagcgcagct ggttctcgtc tctgagctgg gccgttgtac 2100  
 55 tcgccgtgtt ggtcgtctcg tggcagggcg cggaaatggc cccgcttacg ctgatcaaaag 2160  
 acggcgggcaa catggcgacg ttcgccgccg acttcttccc gcccgatttc agccagtggc 2220  
 60 aggattacct caccgaaatg gccgtcacgc tgcaaategc cgtctggggc accgcgctgg 2280

65

## ES 2 325 874 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

```

cggtggttct ctccatcccc tttggcctga tgagcgccga aaacctggtg ccgtggtggg 2340
tttaccagcc cgttcgcccgc ctgatggacg cctgcccgcg cattaacgaa atggtcttcg 2400
ccatgctggt cgtggctgcc gtcggcctcg gcccgttcgc tggcgtgctg gcgtgctggc 2460
gctgtttatc cacaccaccg gcgtgctctc caagetgctt tccgaagcgg tgggaagcgat 2520
tgagcccggc ccggtggaag gcattcgcgc caccggtgcc aacaagctcg aagagatcct 2580
ctacggcgtg ctgccacagg tgatgccact gctgatctcc tactccctct atcgcttcga 2640
atccaacgtc cgctcggoga ccgtcgtcgg catggtcggc gcaggcggga tcggcgtcac 2700
cctgtgggaa gcgattcgcg gtttccagtt ccaacaaacc tgcgccctga tggtgcttat 2760
catcgtcacg gtcagcctgc tggatttctt ctctcaacgg ttgcgtaagc actttatctg 2820
ataagcgagg cattgatatc tatgcacttg tctacacatc cgaccagcta cccaacacgc 2880
tatcaagaga tagccgcaaa acttgagcag gagcttcgtc aacactaccg ctgcggcgac 2940
tatcttcccg ccgagcagca actggcagcg cgctttgagg tgaatcgcca caccctgcgc 3000
cgcgccatcg accaactggt ggaaaaaggc tgggtacagc gccgtcaggg cgtcggcgtg 3060
ctggtgctga tgcgcccgtt cgattaccg ctcaacgccc aggcgcgttt tagccagaat 3120
ctgctggatc agggcagcca tcccaccage gaaaaactgc tttcggattt gcgccccgcg 3180
tccggccacg tcgctgacgc actggggatt accgaggggg agaacgtcat ccacctgcgc 3240
accctgogtc gtgtcaacgg cgtcgcgctc tgtttaatcg accactactt cgcggaacctc 3300
accctctggc cgacgctgca acgcttcgac agcggctcgc tgcacgattt tctgcgcgag 3360
caaaccggaa ttgcgctgcg ccgcagccag acgcggatca gcgcccgcg cgcccaggcc 3420
aaagagtgcc agcgtcttga aatcccgaat atgtcgcgcg tgctgtgctg gcgcaccctt 3480
aaccaccgtg acggtgaaag cagcccggcg gagtactccg tcagcctgac gcgcgccgac 3540
atgattgaat tcactatgga gcaactgatg cacgcagata ccgcgacccg ccagcactgg 3600
atgtccgtgc tggcgcacag ccaaccggct gaactggcag cacgcctgaa cgcgctaaac 3660
atcaccgccg actatgaggt gatccgcgcc gctgaaactg gcctggtaca gattcaggcg 3720
cggatgggcg gcaccggcga acgttttttt gccggcgacg ccacgctgac ccgcgccgcc 3780
gtgcgcctga ctgacggcac gctcggctac agctgggtgc aggggcgtga taaacagcac 3840
gccgaacgct gcgcgctgat tgacgcgctg atgcagcaat ctcgccactt tcaaaactta 3900
tcagaaaccc ttattgcccc gctggacgct gaccgtatgg cacgcattgc cgcacgccag 3960
gccgaagtga acgccagccg ggtcgacttc tttacgatgg ttcgcggaga caacgcatga 4020
  
```

65

## ES 2 325 874 T3

ccctggaaac cgcttttatg ctccccgtgc aggatgceca gcacagtttt cgtegcctgt 4080  
 taaaggccat gagcgagccg ggcgtgattg tcgccctgca tcagctcaaa cgcggctggc 4140  
 5 aaccgctgaa tatcgccacc accagcgtgc tgctgacgct ggccgataac gacacgccgg 4200  
 tgtggctttc taccocatta aataacgata tcgtcaacca gagcctgcgt tttcatacca 4260  
 10 acgcgccgct ggtcagccag ccggaacagg cgaccttcgc ggtgacggat gaggcgattt 4320  
 ccagcgaaca gctcaacgcc ctttccaccg gcaccgccgt tgcgccggaa gcgggtgcga 4380  
 15 cgctgatttt acaggtegcc agcctgagcg gcggacgcat gttgcgcctt actggtgcgg 4440  
 gtattgccga agaacgaatg atcgctccgc agctgccgga gtgcattctg cacgaaetca 4500  
 ccgagcgcgc gcatecgttc ccgctcggca tcgacctgat cctgacctgt ggcgagcgc 4560  
 20 tgctggctat tccgcgaacc actcatgtgg aggtgtgctg atgtacgttg ccgtgaaagg 4620  
 gggcgagaag gcgatcgacg ccgccacgc cctgcaagag agccgacgcc gaggcgatac 4680  
 25 cgatttgccc gaactgagcg tcgccagat tgaacagcag cttaacctcg cggtagatcg 4740  
 cgtgatgacc gaaggcggca ttgccgaccg cgaactggcg gcgctggcgc tgaaacaggc 4800  
 30 cagcggcgat aacgttgaag cgattttcct gctgcgcgcc taccgcacca cgttggcgaa 4860  
 gctggcggta agcgagccgc tcgacaccac cgggatgcgt ctgcaacgcc gtatctccgc 4920  
 cgtttataaa gacattcccg gcggccagct gcttgccca acctacgact acaccatcg 4980  
 35 cctgctcgat tttaccctgc tggcaaacgg cgaagcgcg acgctgacca ccgccgacag 5040  
 cgaacagcag ccgtcgcgc acgttttcag cctgctggcg cgtcaggggc tggcgaagtt 5100  
 40 tgaagaggat agcggcgcac agccggatga catcacccgc acgccgccgg tttaccctg 5160  
 ctcaagctcc tcccgtttgc agcagttgat gcgcggcgac gaaggctatt tgctggcgct 5220  
 45 ggccactcc acccaacgcg gttacggcg caatcacccg ttcgcaggcg agatccgcag 5280  
 cggctatata gacgtgtcga ttgtgccgga agagctggga tttgcggtga acgtcggcga 5340  
 50 actgctgatg actgagtgtg aatgggtaa cggttttatc gaccgcccg gtgagccgcc 5400  
 gcacttcacg cgcggctacg ggctgggtt cggcatgagc gagcgcaaag cgatggcgat 5460  
 ggcgctggtc gaccgcgctc tgcaagcccc ggagtacggc gagcacgcga caggccccgc 5520  
 55 gcaggatgaa gagttcgtgc tggcacatgc cgacaacgct gaagccgcag gctttgtctc 5580  
 acacctcaaa ctccccact acgtcgattt ccaggccgaa ctggagctac tcaaacgtct 5640  
 60 gcaacaggag cagaacctg gctaactctga gcggctacaa ctttgectac ctcgacgagc 5700

65

## ES 2 325 874 T3

agaccaaacg catgatccgc cgcgccatct taaaagcggg ggcgatcccc ggttatcagg 5760  
 5 tgccgtttgg cgggcgcgag atgccgatgc cgtacggctg gggaaaccggc ggcattcagc 5820  
 ttaccgccag cgtgattggc gaaagcgacg tgctgaaggc gattgaccag ggcgcggatg 5880  
 acaccaccaa cgccgtgtcg attcgcaact tcttcaagcg cgtgaccggg gtaaaccacca 5940  
 10 cggaacgtac ggacgatgcg acggttatcc agacgcgtca ccgcatcccc gaaacgccgc 6000  
 tgaccgaaga tcagataatt atcttccagg tgccaatccc cgagccgctg cgctttatcg 6060  
 agccgcgcga aacggaaacc cgcacatgc acgcgctgga agagtacggc gtgatgcagg 6120  
 15 tgaaactgta tgaagatata gcccgcttcg gtcataatgc caccacctac gcctatccgg 6180  
 tgaaggtaaa tgggcgctac gtgatggacc cgtcgccgat cccgaaattc gataacccaa 6240  
 20 aatggacat gatgcccgcc ctgcaactgt tcggcgcggg gcgcgagaag cgcattctatg 6300  
 cggtgccgcc gtttaccgca gtggaaagtc tcgatttcca cgatcaccgc ttcaccgttc 6360  
 25 agcagtggga tgagccatgc gccatctgca gatcgacca cagctatctt gatgaagtgg 6420  
 tgctggatga cgccggaaac cgcattgctt tctgctccga taccgattat tgccgccaac 6480  
 agagcgaggc aaaaaaccaa tgaatcaacc gttactttcg gtcaataacc tgaccacct 6540  
 30 ttacgcgccc ggcaaaggct ttagcgatgt ctcttttgat ttatggccgg gggaaagtgc 6600  
 gggcattgtc ggggaatccg gctccgggaa gaccacgctg ctgaagtcca tctccgcgcg 6660  
 35 cctgacgccc cagcaggggg aaattcacta cgagaaccgt tcgctgtatg caatgagcga 6720  
 ggccgaccgc cgtcgccctg tgcgtaccga atggggcgtg gtgcatcagc atccactcga 6780  
 40 cggcctgccc cgccaggtgt cggcagggcg caatatcgcc gagcggctga tggcgaccgg 6840  
 ggcaegtcac tacggcgata ttcgtgccac cgcgcagaag tggctggaag aggtggagat 6900  
 tcccgccaac cggatcgacg acctgccgac caccttttcc ggcggtatgc agcagcgttt 6960  
 45 gcagattgcc cgcaacctgg tgacgcatcc gaagctggtg tttatggatg aaccgaccgg 7020  
 cgggctggat gtgtcgggtg aggcccgcct gctcgacctg ctgcccggcc tgggtggtgga 7080  
 50 gctgaacctc gcggtggtga ttgtcaccca tgatttaggc gtcgcccgcc tgctggcgga 7140  
 ccgtttgctg gtgatgaagc aggggcaagt ggtggagagt gggttaaccg accgcgtgct 7200  
 55 cgacgaccgc catcatccgt atacacagct gctggtgtca tcggttttgc agaattgagc 7260  
 cggtgccgga tcgggcgtaa acgccttata cggcctacaa atgcgctccc cgtaggtcgg 7320  
 60 ataagacgca tcagcgctgc atccgacacc cgaaccacga ggcgaaaaat gattaacgta 7380  
 caaacgtca gtaaacctt catcctgcac cagcaaacg gcgtgcgcct gcccgctctc 7440

65

## ES 2 325 874 T3

aatcgcgcct cgctcacctg caacgcgggc gaatgcgtgg tgctccacgg ccattccggc 7500  
 agcggcaaat caactctgct acgctcgtcg tacgccaaact atctgcccga cgaaggtcaa 7560  
 5 atccagatca aacacggtga cgagtgggta gacctggtca ccgcgccagc gcgcaaagtg 7620  
 gtggaaatcc gcaaaaccac cgtcggctgg gtgagccagt ttctgcgcgt catcccgcgt 7680  
 10 atctcagcac tggaagtggg gatgcagccg ctgctcgata cggcgttcc gctggaagcc 7740  
 tgcgccgcta aagccgcgcy tcttctcacc cgctgaacg tgccggaacg cctgtggcac 7800  
 15 ctggcaccat cgacattttc cgggtggcgaa cagcagcgcg tcaacatcgc ccgcggcttt 7860  
 atcgtcgact accccattct gctgcttgac gaacctaccg cctcgtgga cgccaaaaac 7920  
 agcgcgcgcy tggtggaact gattcgcgaa gccaaaaccg gtggcgcagc catcgtaggg 7980  
 20 atcttccatg acgaagctgt acgtaatgac gtcgccgacc gcctgcacc aatgggagcc 8040  
 tcttcatgat tatcaataac gttaagctgg tgctggaaaa cgaggtggta agcggttcgc 8100  
 25 tggaggtgca gaacggcgaa atccgcgcct ttgccgaaag ccagagccgc ctgccggagg 8160  
 cgatggacgg cgaaggcggc tggctgctgc cggggctgat tgagctgcat accgataatc 8220  
 30 tggataaatt cttcaccccg cgcccgaaag ttgactggcc tgcccactcg gcgatgagca 8280  
 gccacgacgc gctgatggtg gcgagcggca tcaccaccgt actggatgcc gtggcaattg 8340  
 gcgacgtgcy cgacggcggc gatcggctgg agaactctgga gaagatgatc aacgccatcg 8400  
 35 aagagacgca gaaacgcggc gtcaaccgcg ccgagcaccg tctgcatctg cgctgcgaac 8460  
 tgccgcatca caccacgctg ccgctgtttg aaaaactggt gcagcgcgag ccggtgacgc 8520  
 40 tgggtgctgct gatggaccac tcgccgggccc agcgcaggtt cgccaaccgc gagaagtatc 8580  
 gcgaatatta tcagggcaaa tactccctca ctgatgcgca gatgcagcag tacgaagaag 8640  
 45 agcaactggc gctcgcgcga cgctggctgc agccgaatcg cgaatccatc gccgccctgt 8700  
 gccgcgcgcy aaaaattgcy cttgccagcc acgatgacgc caccacgcc cacgttgctg 8760  
 50 aatctacca gcttggcagc gtgatgcgcg aatttccac cacgttcgaa gcggcggag 8820  
 cctcgcgcaa gcatggcatg aacgtgctga tgggcgcgcc gaatattgtg cgcggcggct 8880  
 cgcaactcgg caacgtggcg gccagtgaac tggcgcagct tggcctgctg gatatcctct 8940  
 55 cttccgacta ctaccccgcc agcctgctcg atgcggcatt tcgcgtcgcc gatgaccaga 9000  
 gcaaccgctt tacgctgccc caggcgggta agctgggtgac taaaaatcca gcgcaggcgc 9060  
 60 ttaatctcca ggatcgcggg gtgattggcy agggcaaacg cgccgacctg gtgctggcgc 9120

65

## ES 2 325 874 T3

atcgcaagga caatcatatt catatcgacc acgtctggcg tcagggtaaa aggggtgttct 9180  
 gatgatggga aaactgattt ggttaatggg gccgtccggc tccgggaaag acagcctgct 9240  
 5 ggcggaactc cgctcgcggg aacaaactca gttactggtg gcgcatcgct acatcacgcy 9300  
 cgatgccagc gccggaagtg aaaaccatat cgccctgagc gagcaggagt tttttaccgc 9360  
 10 cgcggggcaa aatctgttgg ccttaagctg gcacgctaac ggtctgtatt atggcgtecg 9420  
 cgtcgagatt gatctctggc tgcacgccgg attcgacgtg ctggtcaacg gctcacgcy 9480  
 15 ccatctgccg caggcgcggg cgcgctatca atcgcgctg ctgcccgtct gtttacaggt 9540  
 ttcgccggag atcctccgcc agcgccctgga aaaccgtggc cgtgaaaacg ccagtgaaat 9600  
 taacgcccgc ctggcgcgcy cgcccgccta tactccacag gattgccata cgctcaacaa 9660  
 20 tgacggcagc ctgcgccagt cggctgacac gctgctgacg ctgatccatc agaaggagaa 9720  
 acaccatgcc tgcttgtgag cttcgcccgg ccacgcagta cgacaccgac gcggtttacg 9780  
 25 cgctgatttg tgagctaaaa caggcgaggt ttgaccacca cgcgtttcgc gtgggtttta 9840  
 acgccaatct gcgcgacca aacatgcgct accatctggc gctgcttgat ggcgaaagtg 9900  
 tcggcatgat cggcctgcat ttgcagttc atctgcatca tgtcaactgg atcgcgaaa 9960  
 30 ttcaggagtt ggtggtaatg ccgcaggcgc gcggtctgaa cgtcggcagt aagttactgg 10020  
 cgtgggcaga agaagaagcc cgccaggccg gggccgaaat gaccgaactt tcgaccaacg 10080  
 35 tgaagcgcca cgacgcgcac cgtttctatc tgcgcgaagg ctacgagcag agccacttcc 10140  
 gcttcaccaa ggcgctgtaa catgagcctg accctcacgc tcaccggcac cggcgcgca 10200  
 40 caggcgcttc cggcatgggg ctgcgagtg gcggcctgcy ccagagcgcy gcgctcgccg 10260  
 cagtatgcc gccaacctg cagcggcgta gtgaagtta acgacgcaat caccctgatc 10320  
 gacgcccggc tgcacgatct cgccgatcgc tggctgcccg gatcgttcca gcagttttg 10380  
 45 ctgacgcatt atcatatgga tcacgtccag gggctgtttc cgctgcgctg gggcgttggc 10440  
 gatccgatcc cggtttacgg cccgcccgat gaacagggct gcgacgatct gtttaaacat 10500  
 50 ccgggcctgc ttgatttcag ccacacggtg gaaccgtttg tgggttttga tttgcagggg 10560  
 ttacaggtca cgcccctgcc gctcaaccac tcaaaactga ccttcggtta tctgctggaa 10620  
 55 acggcacaca gccgggtggc gtggctgtct gacaccgag gtttgccgga aaaaacgctg 10680  
 aaatttttac gcaataatca gccgcaggta atgggtgatg attgcagtca cccgccgcy 10740  
 gcggatgcac cgcgtaatca ctgtgattta aatacctgcy ttgcgctgaa tcaggttatc 10800  
 60 cgctcgccac ggggtgattct gaccatatc agccaccagt ttgatgcgcy gctgatggaa 10860

65

## ES 2 325 874 T3

aacgcactac cgtcaggggt tgaggtgggg tttgatggga tggagattgg ggtggcgtga 10920  
 tgagagggaa tgtgcgcgct ggccccctca ccctaaccct ctccccagag gggcgagggg 10980  
 5 accgattgtg ctcgatattg aatattgcgc tcgttttctc cctctcccca ttggggtgag 11040  
 gggcgatgcc tgctccatac ccaacctcat cgcccatact catcttccat tctccgctct 11100  
 10 tcatcctcca gttgccgacg ctctgatca agctggcgct ggcgatcgtc cagctgcctg 11160  
 cggcgatctt caaactggcg gcgggcggtcg tcatattgtc tgcgccgatc gtcgctcact 11220  
 15 tcacgctgcc agccgctcgtc gcgcgaatct tcatagtctc gccacggtc agggttataa 11280  
 gcgctattaa tcgctgctg aatattgcc aatgggtcgt cgataatata ggctggggc 11340  
 ggaacgtgga cagcgtgagc aggggtgaata aaagaaatag cggaaagcgt ttcattagcc 11400  
 20 aacctcaaaa agaaactcta tccacattaa tcattactca tccatgcaag tagtggatga 11460  
 atctcaattt ctccgctgct ctattgccgt aatcgctcc acgcgttggt gatgacgacc 11520  
 25 gccttcgtac tgtgcgcccc gccacgcata cacaatcatt tttgccagtt cgaggccaac 11580  
 cactcgtgaa ccaaaagcca gcacgttggg gtcgttatgc tgccgcgaaa gttgcgcgga 11640  
 30 ataaggttcg ctacagacga ccgcgcgaat tc 11672

<211> 435

<212> ADN

35 <213> *Escherichia coli*

<400> 3

40 atgcctgctt gtgagcttcg cccggccacg cagtaacgaca ccgacgcggt ttacgcgctg 60  
 atttgtgagc taaaacaggc ggagtttgac caccacgcgt ttcgcgtggg ttttaacgcc 120  
 45 aatctgcgcy acccaaacat gcgctaccat ctggcgctgc ttgatggcga agttgtcggc 180  
 atgatcggcc tgcatttgca gtttcatctg catcatgtca actggatcgg cgaaattcag 240  
 50 gagttggtgg taatgccgca ggcgcgcggt ctgaacgtcg gcagtaagtt actggcgctgg 300  
 gcagaagaag aagcccgcga ggccggggcc gaaatgaccg aactttcgac caacgtgaag 360  
 cgccacgacg cgcaccgttt ctatctgcgc gaaggctacg agcagagcca cttccgcttc 420  
 55 accaaggegc tgtaa 435

<210> 4

60 <211> 144

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

65

## ES 2 325 874 T3

<400> 4

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Pro | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| 10 | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 15 | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| 20 | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 25 | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| 30 | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| 35 | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 40 | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 45 | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

<210> 5

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 5

45       aaacaccatg gctgcttg

<210> 6

<211> 35

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 6

60       gtgacgaatt cgagtcatt acagcgcctt ggtga

35

<210> 7

<211> 435

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 325 874 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos que no se presenta en la naturaleza que codifica la proteína de PhnO modificada P2A; g-c en la posición del nucleótido 4

5

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (432)

10

<400> 7

```

15      atg gct gct tgt gag ctt cgc ccg gcc acg cag tac gac acc gac gcg      48
      Met Ala Ala Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala
          1              5              10              15

20      gtt tac gcg ctg att tgt gag cta aaa cag gcg gag ttt gac cac cac      96
      Val Tyr Ala Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His
                20              25              30

25      gcg ttt cgc gtg ggt ttt aac gcc aat ctg cgc gac cca aac atg cgc      144
      Ala Phe Arg Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg
                35              40              45

30      tac cat ctg gcg ctg ctt gat ggc gaa gtt gtc ggc atg atc ggc ctg      192
      Tyr His Leu Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu
                50              55              60

35      cat ttg cag ttt cat ctg cat cat gtc aac tgg atc ggc gaa att cag      240
      His Leu Gln Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln
                65              70              75              80

40      gag ttg gtg gta atg ccg cag gcg cgc ggt ctg aac gtc ggc agt aag      288
      Glu Leu Val Val Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys
                85              90              95

45      tta ctg gcg tgg gca gaa gaa gaa gcc cgc cag gcc ggg gcc gaa atg      336
      Leu Leu Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met
                100             105             110

50      acc gaa ctt tcg acc aac gtg aag cgc cac gac gcg cac cgt ttc tat      384
      Thr Glu Leu Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr
                115             120             125

55      ctg cgc gaa ggc tac gag cag agc cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg      432
      Leu Arg Glu Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu
                130             135             140

      taa                                                                 435

```

55

<210> 8

<211> 144

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

65

## ES 2 325 874 T3

<400> 8

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 10 | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |
| 15 |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|    | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile |     |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |
| 20 | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |
| 25 |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|    | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 30 | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

<210> 9

35 <211> 264

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia que codifica el péptido de tránsito

<220>

45 <221> CDS

<222> (1) .. (264)

50

55

60

65

ES 2 325 874 T3

<400> 9

```

    atg gct tcc tct atg ctc tct tcc gct act atg gtt gcc tct ccg gct   48
    Met Ala Ser Ser Met Leu Ser Ser Ala Thr Met Val Ala Ser Pro Ala
5      1          5          10          15

    cag gcc act atg gtc gct cct ttc aac gga ctt aag tcc tcc gct gcc   96
    Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala
      20          25          30

10   ttc cca gcc acc cgc aag gct aac aac gac att act tcc atc aca agc   144
    Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser
      35          40          45

15   aac ggc gga aga gtt aac tgc atg cag gtg tgg cct ccg att gga aag   192
    Asn Gly Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Val Trp Pro Pro Ile Gly Lys
      50          55          60

20   aag aag ttt gag act ctc tct tac ctt cct gac ctt acc gat tcc ggt   240
    Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Asp Leu Thr Asp Ser Gly
      65          70          75          80

25   ggt cgc gtc aac tgc atg cag gcc   264
    Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Ala
      85

```

<210> 10

<211> 88

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 10

```

35   Met Ala Ser Ser Met Leu Ser Ser Ala Thr Met Val Ala Ser Pro Ala
      1          5          10          15

    Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala
40      20          25          30

    Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser
      35          40          45

45   Asn Gly Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Val Trp Pro Pro Ile Gly Lys
      50          55          60

    Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Asp Leu Thr Asp Ser Gly
50      65          70          75          80

    Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Ala
      85

```

<210> 11

55 <211> 696

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia que codifica CTP-AMPA acetiltransferasa y traducción de la secuencia de aminoácidos

65 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (696)

ES 2 325 874 T3

<400> 11

|    |   |     |
|----|---|-----|
|    | atg gct tcc tct atg ctc tct tcc gct act atg gtt gcc tct ccg gct | 48  |
|    | Met Ala Ser Ser Met Leu Ser Ser Ala Thr Met Val Ala Ser Pro Ala |     |
| 5  | 1 5 10 15   |     |
|    | cag gcc act atg gtc gct cct ttc aac gga ctt aag tcc tcc gct gcc | 96  |
|    | Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala |     |
| 10 | 20 25 30  |     |
|    | ttc cca gcc acc cgc aag gct aac aac gac att act tcc atc aca agc | 144 |
|    | Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser |     |
| 15 | 35 40 45  |     |
|    | aac ggc gga aga gtt aac tgc atg cag gtg tgg cct ccg att gga aag | 192 |
|    | Asn Gly Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Val Trp Pro Pro Ile Gly Lys |     |
| 20 | 50 55 60  |     |
|    | aag aag ttt gag act ctc tct tac ctt cct gac ctt acc gat tcc ggt | 240 |
|    | Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Asp Leu Thr Asp Ser Gly |     |
| 25 | 65 70 75 80   |     |
|    | ggt cgc gtc aac tgc atg cag gcc atg gct gct tgt gag ctt cgc ccg | 288 |
|    | Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Ala Met Ala Ala Cys Glu Leu Arg Pro |     |
| 30 | 85 90 95  |     |
|    | gcc acg cag tac gac acc gac gcg gtt tac gcg ctg att tgt gag cta | 336 |
|    | Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr Ala Leu Ile Cys Glu Leu |     |
| 35 | 100 105 110   |     |
|    | aaa cag gcg gag ttt gac cac cac gcg ttt cgc gtg ggt ttt aac gcc | 384 |
|    | Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe Arg Val Gly Phe Asn Ala |     |
| 40 | 115 120 125   |     |
|    | aat ctg cgc gac cca aac atg cgc tac cat ctg gcg ctg ctt gat ggc | 432 |
|    | Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His Leu Ala Leu Leu Asp Gly |     |
| 45 | 130 135 140   |     |
|    | gaa gtt gtc ggc atg atc ggc ctg cat ttg cag ttt cat ctg cat cat | 480 |
|    | Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu Gln Phe His Leu His His |     |
| 50 | 145 150 155 160   |     |
|    | gtc aac tgg atc ggc gaa att cag gag ttg gtg gta atg ccg cag gcg | 528 |
|    | Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu Val Val Met Pro Gln Ala |     |
| 55 | 165 170 175   |     |
|    | cgc ggt ctg aac gtc ggc agt aag tta ctg gcg tgg gca gaa gaa gaa | 576 |
|    | Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu Ala Trp Ala Glu Glu Glu |     |
| 60 | 180 185 190   |     |
|    | gcc cgc cag gcc ggg gcc gaa atg acc gaa ctt tcg acc aac gtg aag | 624 |
|    | Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu Leu Ser Thr Asn Val Lys |     |
| 65 | 195 200 205   |     |
|    | cgc cac gac gcg cac cgt ttc tat ctg cgc gaa ggc tac gag cag agc | 672 |
|    | Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg Glu Gly Tyr Glu Gln Ser |     |
| 70 | 210 215 220   |     |
|    | cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg                                 | 696 |
|    | His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu                                 |     |
| 75 | 225 230   |     |

<210> 12

# ES 2 325 874 T3

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<400> 12

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | Met | Ala | Ser | Ser | Met | Leu | Ser | Ser | Ala | Thr | Met | Val | Ala | Ser | Pro | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| 15 | Gln | Ala | Thr | Met | Val | Ala | Pro | Phe | Asn | Gly | Leu | Lys | Ser | Ser | Ala | Ala |
|    |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 20 | Phe | Pro | Ala | Thr | Arg | Lys | Ala | Asn | Asn | Asp | Ile | Thr | Ser | Ile | Thr | Ser |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| 25 | Asn | Gly | Gly | Arg | Val | Asn | Cys | Met | Gln | Val | Trp | Pro | Pro | Ile | Gly | Lys |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 30 | Lys | Lys | Phe | Glu | Thr | Leu | Ser | Tyr | Leu | Pro | Asp | Leu | Thr | Asp | Ser | Gly |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| 35 | Gly | Arg | Val | Asn | Cys | Met | Gln | Ala | Met | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro |
|    |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| 40 | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 45 | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala |
|    |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 50 | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 55 | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| 60 | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| 65 | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu |
|    |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |
| 70 | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| 75 | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| 80 | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 13

<211> 415

60 <212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

65 <221> región N

<222> (15) .. (163)

## ES 2 325 874 T3

<220>

<221> intrón

<222> (164) .. (322)

5

<220>

<221> región C

<222> (323) .. (411)

10

<400> 13

```

tctagaggat cagcatggcg cccaccgtga tgatggcctc gtcggccacc gccgtcgctc 60
cgttcctggg gctcaagtcc accgccagcc tccccgtcgc ccgccgctcc tccagaagcc 120
tcggcaacgt cagcaacggc ggaaggatcc ggtgcatgca ggtaacaaat gcatcctagc 180
tagtagttct ttgcattgca gcagctgcag ctagegagtt agtaatagga agggaaactga 240
tgatccatgc atggactgat gtgtgttgcc catcccatcc catcccattt cccaaacgaa 300
ccgaaaacac cgtactacgt gcaggtgtgg ccctacggca acaagaagtt cgagacgctg 360
tcgtacctgc cgccgctgtc gaccggcggg cgcatecget gcatgcagge catgg      415

```

<210> 14

30

<211> 174

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificadora de péptido de tránsito de cloroplastos o plastidios y traducción de la secuencia de aminoácidos

40

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (174)

45

<400> 14

```

atg gct tcc tct atg ctc tct tcc gct act atg gtt gcc tct ccg gct 48
Met Ala Ser Ser Met Leu Ser Ser Ala Thr Met Val Ala Ser Pro Ala
  1             5             10             15
cag gcc act atg gtc gct cct ttc aac gga ctt aag tcc tcc gct gcc 96
Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala
             20             25             30
ttc cca gcc acc cgc aag gct aac aac gac att act tcc atc aca agc 144
Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser
             35             40             45
aac ggc gga aga gtt aac tgc atg cag gcc 174
Asn Gly Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Ala
  50             55

```

65

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 325 874 T3

<400> 15

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Met | Ala | Ser | Ser | Met | Leu | Ser | Ser | Ala | Thr | Met | Val | Ala | Ser | Pro | Ala |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

5

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Gln | Ala | Thr | Met | Val | Ala | Pro | Phe | Asn | Gly | Leu | Lys | Ser | Ser | Ala | Ala |
|  |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

10

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Phe | Pro | Ala | Thr | Arg | Lys | Ala | Asn | Asn | Asp | Ile | Thr | Ser | Ile | Thr | Ser |
|  |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

15

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Asn | Gly | Gly | Arg | Val | Asn | Cys | Met | Gln | Ala |
|  | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |

<210> 16  
 <211> 157  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético que representa los pares de bases 1 hasta 157 de un gen de AMPA aciltransferasa de 432 pares de bases.

<400> 16

|  |   |     |
|--|---|-----|
|  | atggccgctt gcgagcttcg cccagccacg cagtacgaca cgcacgccgt gtacgcgctg | 60  |
|  | atctgcgagc tcaagcaggc ggagttcgac caccacgcct tccgcgtggg cttcaacgcc | 120 |
|  | aacctgcgcg accccaacat gcgctacat ctggcgcg                          | 157 |

35

<210> 17  
 <211> 187  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de oligonucleótido sintético que representa los pares de bases 158 hasta 344 de un gen de AMPA aciltransferasa de 432 pares de bases.

<400> 17

|  |   |     |
|--|---|-----|
|  | tgcttgatgg cgaagtggtc ggcatgatcg gctgacacct ccagttccac ctgcatcatg | 60  |
|  | tcaactggat cggcgagatc caggagctgg tcgtgatgcc acaggcgagg ggtctgaacg | 120 |
|  | tcggcagcaa gctcctggcg tgggccgagg aggaagccag gcaggccgga gccgagatga | 180 |
|  | ccgagct   | 187 |

60

<210> 18  
 <211> 88  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>



## ES 2 325 874 T3

|    |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Glu  | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |     |
|    |  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| 5  | ctc  | ctg | gcg | tgg | gcc | gag | gag | gaa | gcc | agg | cag | gcc | gga | gcc | gag | atg | 336 |
|    | Leu  | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |     |
|    |  |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |
| 10 | acc  | gag | ctc | agc | acc | aac | gtg | aag | cgc | cac | gac | gcg | cac | cgc | ttc | tac | 384 |
|    | Thr  | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |     |
|    |  |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| 15 | ctg  | cgc | gaa | ggc | tac | gag | cag | agc | cac | ttc | cgc | ttc | acc | aag | gcg | ctg | 432 |
|    | Leu  | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |     |
|    |  | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
|    | <210> 20   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 144  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20 | <212> PRT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 25 | <400> 20   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | Met  | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |     |
|    | 1  |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| 30 | Val  | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |     |
|    |  |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| 35 | Ala  | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |     |
|    |  |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
|    | Tyr  | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |     |
|    |  | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| 40 | His  | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln |     |
|    | 65   |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |
| 45 | Glu  | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |     |
|    |  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
|    | Leu  | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |     |
|    |  |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |
| 50 | Thr  | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |     |
|    |  |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| 55 | Leu  | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |     |
|    |  | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
|    | <210> 21   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 20   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 60 | <212> ADN  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <220>  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 65 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético PHN1 para uso como un cebador de amplificación |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

## ES 2 325 874 T3

<400> 21

atggctgctt gtgagcttcg

5

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético PHN2 para uso como un cebador de amplificación

<400> 22

20 cagcgccttg gtgaagcgga

<210> 23

<211> 1630

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: casete de expresión que comprende el promotor funcional de planta unido a una secuencia codificadora que codifica una AMPA acetiltransferasa unida a una secuencia de terminación de la transcripción

<220>

35 <221> promotor

<222> (33) .. (605)

<220>

40 <221> péptido de tránsito

<222> (627) .. (892)

<220>

45 <221> CDS

<222> (893) .. (1324)

<220>

50 <221> terminador

<222> (1350) .. (1605)

55

60

65

## ES 2 325 874 T3

<400> 23

```

5      gcggccgcgt tcaagcttga gctcaggatt tagcagcatt ccagattggg ttcaatcaac 60
      aaggtacgag ccatatcact ttattcaaat tggtatcgcc aaaaccaaga aggaactccc 120
      atcctcaaag gtttgtaagg aagaattctc agtccaaagc ctcaacaagg tcaggggtaca 180
10     gagtctccaa accattagcc aaaagctaca ggagatcaat gaagaatctt caatcaaagt 240
      aaactactgt tccagcacat gcatcatggt cagtaagttt cagaaaaaga catccaccga 300
15     agacttaaag ttagtgggca tctttgaaag taatcttgtc aacatcgagc agctggcttg 360
      tggggaccag acaaaaaagg aatggtgcag aattgttagg cgcacctacc aaaagcatct 420
      ttgcctttat tgcaaagata aagcagattc ctctagtaca agtggggaac aaaataacgt 480
20     ggaaaagagc tgtcctgaca gccactcac taatgcgtat gacgaacgca gtgacgacca 540
      caaaagaatt ccctctatat aagaaggcat tcattcccat ttgaaggatc atcagatact 600
25     gaaccaatcc ttctagaaga tctccacaat ggcttctct atgetctctt ccgctactat 660
      ggttgctctc ccggctcagg ccactatggt cgctccttc aacggactta agtcctccgc 720
30     tgccttccca gccacccgca aggctaacaa cgacattact tccatcacia gcaacggcgg 780
      aagagttaac tgcatgcagg tgtggcctcc gattggaaag aagaagtttg agactctctc 840
35     ttaccttctt gaccttaccg attccggtgg tcgcgtcaac tgcatgcagg cc atg gct 898
                                     Met Ala

```

40

45

50

55

60

65

# ES 2 325 874 T3

|    |   |  |
|----|---|--|
| 5  | <p>gct tgt gag ctt cgc ccg gcc acg cag tac gac acc gac gcg gtt tac 946<br/>                     Ala Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr<br/>                                       5  10  15</p>  |  |
| 10 | <p>gcg ctg att tgt gag cta aaa cag gcg gag ttt gac cac cac gcg ttt 994<br/>                     Ala Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe<br/>                                       20  25  30</p>   |  |
| 15 | <p>cgc gtg ggt ttt aac gcc aat ctg cgc gac cca aac atg cgc tac cat 1042<br/>                     Arg Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His<br/>                                       35  40  45  50</p>  |  |
| 20 | <p>ctg gcg ctg ctt gat ggc gaa gtt gtc ggc atg atc ggc ctg cat ttg 1090<br/>                     Leu Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu<br/>                       55  60  65</p>  |  |
| 25 | <p>cag ttt cat ctg cat cat gtc aac tgg atc ggc gaa att cag gag ttg 1138<br/>                     Gln Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu<br/>                       70  75  80</p>  |  |
| 30 | <p>gtg gta atg ccg cag gcg cgc ggt ctg aac gtc ggc agt aag tta ctg 1186<br/>                     Val Val Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu<br/>                       85  90  95</p>  |  |
| 35 | <p>gcg tgg gca gaa gaa gaa gcc cgc cag gcc ggg gcc gaa atg acc gaa 1234<br/>                     Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu<br/>                                       100  105  110</p>   |  |
| 40 | <p>ctt tcg acc aac gtg aag cgc cac gac gcg cac cgt ttc tat ctg cgc 1282<br/>                     Leu Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg<br/>                     115  120  125  130</p>  |  |
| 45 | <p>gaa ggc tac gag cag agc cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg 1324<br/>                     Glu Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu<br/>                       135  140</p>  |  |
| 50 | <p>taatgagctc ggtaccggat ccaattcccg atcgttcaaa catttggtcaa taaagtttct 1384<br/>                     taagattgaa tcctgttgcc ggtottgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 1444<br/>                     ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 1504<br/>                     ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 1564<br/>                     aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggggatcg atccccgggc 1624<br/>                     ggccgc 1630</p> |  |
| 55 | <p>&lt;210&gt; 24<br/>                     &lt;211&gt; 144<br/>                     &lt;212&gt; PRT</p>   |  |
| 60 | <p>&lt;213&gt; Secuencia artificial</p>   |  |
| 65 |   |  |

# ES 2 325 874 T3

<400> 24

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 10 | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |
| 15 |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|    | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| 20 | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |
| 25 |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
|    | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 30 | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

<210> 25

35 <211> 2122

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: casete de expresión que comprende el promotor de planta unido a una secuencia que codifica una AMPA acetiltransferasa unida a una secuencia de terminación

<220>

45 <221> promotor

<222> (6) .. (620)

<220>

50 <221> 5' UTR

<222> (645) .. (715)

<220>

55 <221> intrón

<222> (729) .. (1178)

<220>

60 <221> péptido de tránsito

<222> (1179) .. (1406)

<220>

65 <221> CDS

<222> (1407) .. (1838)

# ES 2 325 874 T3

<220>

<221> terminador

<222> (1849) .. (2082)

5

<400> 25

ctgcaggacc gatgtgagac ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct cctcggattc 60  
10 cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac 120  
aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc 180  
15 cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg 240  
tcttcaaagc aagtggattg atgtgatggt ccgatgtgag acttttcaac aaagggtaat 300  
20 atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg tgaagatagt 360  
ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcatg aaaggaaagg ccatcgttga 420  
25 agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcacgttga 480  
aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctccactga 540  
30 cgtaagggat gacgcacaat ccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta tataaggaag 600  
ttcatttcat ttggagagga cacgctgaca agctgactct agcagatcct ctagaacat 660  
cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg gacaacacac cataagatcc 720  
35 aagggaggcc tccgcccgg ccggtaacca ccccgcccct ctctctttc tttctcggtt 780  
tttttttccg tctcggctct gatccttggc cttggtagtt tgggtgggag agaggcggct 840

40

45

50

55

60

65

# ES 2 325 874 T3

```

tcgtgcgcgc ccagatcggg gcgcgggagg ggcgggatct cgcggggaat ggggctctcg 900
5 gatgtagatc tgcgatccgc cgttggtggg ggagatgatg gggcgtttaa aatttcgccg 960
tgctaaacaa gatcaggaag aggggaaaag ggcactatgg tttatatttt tatatatttc 1020
10 tgctgcttcg tcaggcttag atgtgctaga tctttctttc ttctttttgt gggtagaatt 1080
taatccctca gcattgttca tcggtagttt ttcttttcat gatttcgtga caaatgcagc 1140
ctcgtgcgga gcttttttgt aggtagaagt gatcaaccat ggcgcaagtt agcagaatct 1200
15 gcaatgggtg gcagaacca tctcttatct ccaatctctc gaaatccagt caacgcaaat 1260
ctcccttate ggtttctctg aagacgcagc agcatccacg agcttatccg atttcgctgt 1320
20 cgtgggggatt gaagaagagt gggatgacgt taattggctc tgagcttcgt cctcttaagg 1380
tcatgtcttc tgtttccacg gcgtgc atg gcc gct tgc gag ctt cgc cca gcc 1433
Met Ala Ala Cys Glu Leu Arg Pro Ala
25 acg cag tac gac acc gac gcc gtg tac gcg ctg atc tgc gag ctc aag 1481
Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr Ala Leu Ile Cys Glu Leu Lys
10 15 20 25
30 cag gcg gag ttc gac cac cac gcc ttc cgc gtg ggc ttc aac gcc aac 1529
Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe Arg Val Gly Phe Asn Ala Asn
30 35 40
35 ctg cgc gac ccc aac atg cgc tac cat ctg gcg ctg ctt gat ggc gaa 1577
Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His Leu Ala Leu Leu Asp Gly Glu
45 50 55
40 gtg gtc ggc atg atc ggc ctg cac ctc cag ttc cac ctg cat cat gtc 1625
Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu Gln Phe His Leu His His Val
60 65 70
45 aac tgg atc ggc gag atc cag gag ctg gtc gtg atg cca cag gcg agg 1673
Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu Val Val Met Pro Gln Ala Arg
75 80 85
50 ggt ctg aac gtc ggc agc aag ctc ctg gcg tgg gcc gag gag gaa gcc 1721
Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala
90 95 100 105
55 agg cag gcc gga gcc gag atg acc gag ctc agc acc aac gtg aag cgc 1769
Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu Leu Ser Thr Asn Val Lys Arg
110 115 120
60 cac gac gcg cac cgc ttc tac ctg cgc gaa ggc tac gag cag agc cac 1817
His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg Glu Gly Tyr Glu Gln Ser His
125 130 135
65 ttc cgc ttc acc aag gcg ctg taaagatctg aattctgcat gcgtttggac 1868
Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu

```

# ES 2 325 874 T3

140

5           gtatgctcat tcaggttgga gccaatggg ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagtctg 1928  
           atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct 1988  
           aatcgccaac agattcggcg atgaataaat gagaaataaa ttgttctgat tttgagtgca 2048  
 10          aaaaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt tttggatccc cggggcggcc gccccgggtg 2108  
           gtgagcttct gcag

15

<210> 26

<211> 144

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 26

25

Met Ala Ala Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala  
           1                           5                           10                           15

30

Val Tyr Ala Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His  
                           20                           25                           30

35

Ala Phe Arg Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg  
                           35                           40                           45

40

Tyr His Leu Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu  
           50                           55                           60

45

His Leu Gln Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln  
           65                           70                           75                           80

50

Glu Leu Val Val Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys  
                           85                           90                           95

55

Leu Leu Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met  
                           100                           105                           110

Thr Glu Leu Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr  
           115                           120                           125

Leu Arg Glu Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu  
           130                           135                           140

<210> 27

<211> 2378

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de la secuencia artificial: casete de expresión que comprende un promotor de planta unido a un intrón, una secuencia que codifica una AMPA acetiltransferasa, y una secuencia de terminación

## ES 2 325 874 T3

<220>

<221> promotor

<222> (28) .. (965)

5

<220>

<221> intrón

<222> (966) .. (1423)

10

<220>

<221> péptido de tránsito

<222> (1440) .. (1667)

15

<220>

<221> CDS

<222> (1668) .. (2099)

20

<220>

<221> terminador

<222> (2114) .. (2369)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 325 874 T3

<400> 27

5 gatataccta gggcggccgc gttaacaagc ttactcgagg tcattcatat gcttgagaag 60  
 agagtcggga tagtccaaaa taaaacaaag gtaagattac ctggtcaaaa gtgaaaacat 120  
 cagttaaaag gtggtataaa gtaaaatatac ggtaataaaa ggtggcccaa agtgaaatTT 180  
 10 actcttttct actattataa aaattgagga tgtttttgtc ggtactttga tacgtcattt 240  
 ttgtatgaat tggtttttaa gtttattcgc ttttggaat gcatactctgt atttgagtcg 300  
 15 ggttttaagt tcgtttgctt ttgtaaatac agagggattt gtataagaaa tatctttaga 360  
 aaaaccata tgctaatttg acataatTTT tgagaaaaat atatattcag gcgaattctc 420  
 acaatgaaca ataataagat taaaatagct tcccccggtt gcagcgcagTg ggtattTTTT 480  
 20 ctagtaaaaa taaaagataa acttagactc aaaacattta caaaaacaac ccctaaagtt 540  
 cctaaagccc aaagtgctat ccacgatcca tagcaagccc agcccaaccc aaccacaacc 600  
 25 agcccacccc agtccagcca actggacaat agtctccaca cccccccact atcacctgga 660  
 gttgtccgca cgcaccgcac gtctcgcagc caaaaaaaaa aagaaagaaa aaaaagaaaa 720  
 30 agaaaaaaca gcaggtgggt ccgggtcgtg ggggcccggaa acgcgaggag gatcgcgagc 780  
 cagcgcagag gccggccctc cctccgcttc caaagaaacg ccccccatcg ccaactatata 840  
 35 catacccccc cctctcctcc catcccccca accctaccac caccaccacc accacctcca 900  
 cctcctcccc cctcctctgccc ggaocgacgag ctctcctcccc ctccccctcc gccgcgcgcc 960  
 cgccggtaac cccccgccc ctctcctctt tctttctccg ttttttttcc cgtctcggtc 1020  
 40 tcgatctttg gccttggtag tttgggtggg cgagaggcgg ctctcgtgccg cccagatcgg 1080  
 tgccgcccgg gggcgggatc tcgcccgtgg ctctcgcctcc cgtggatccg gcccggatct 1140  
 45 cgccggggaat ggggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc cgttggtggg gccgatgatg 1200  
 gggcccttaa aatttccgcc gtgctaaaca agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg 1260  
 50 gtttatattt ttatatattt ctgctgcttc gtcaggctta gatgtgctag atctttcttt 1320  
 cttctttttg tgggtagaat ttaatccctc agcattgttc atcggtagtt tttcttttca 1380  
 55 tgattcgtga caaatgcagc ctctgtcgga cgtttttttg taggtagaag tgatcaacca 1440  
 tggcgcaagt tagcagaatc tgcaatggtg tgcagaaccc atctcttata tccaatctct 1500  
 cgaaatccag tcaacgcaaa tctcccttat cggtttctct gaagacgcag cagcatccac 1560  
 60 gagcttatcc gatttcgctc tcgtggggat tgaagaagag tgggatgacg ttaattggct 1620  
 ctgagcttcg tcctcttaag gtcattgctt ctgtttccac ggcgtgc atg gcc gct 1676  
 Met Ala Ala

65

ES 2 325 874 T3

5 tgc gag ctt cgc cca gcc acg cag tac gac acc gac gcc gtg tac gcg 1724  
 Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr Ala  
 5 10 15

10 ctg atc tgc gag ctc aag cag gcg gag ttc gac cac cac gcc ttc cgc 1772  
 Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe Arg  
 20 25 30 35

15 gtg ggc ttc aac gcc aac ctg cgc gac ccc aac atg cgc tac cat ctg 1820  
 Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His Leu  
 40 45 50

20 gcg ctg ctt gat ggc gaa gtg gtc ggc atg atc ggc ctg cac ctc cag 1868  
 Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu Gln  
 55 60 65

25 ttc cac ctg cat cat gtc aac tgg atc ggc gag atc cag gag ctg gtc 1916  
 Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu Val  
 70 75 80

30 gtg atg cca cag gcg agg ggt ctg aac gtc ggc agc aag ctc ctg gcg 1964  
 Val Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu Ala  
 85 90 95

35 tgg gcc gag gag gaa gcc agg cag gcc gga gcc gag atg acc gag ctc 2012  
 Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu Leu  
 100 105 110 115

40 agc acc aac gtg aag cgc cac gac gcg cac cgc ttc tac ctg cgc gaa 2060  
 Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg Glu  
 120 125 130

45 ggc tac gag cag agc cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg taaagatctg 2109  
 Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu  
 135 140

50 aattcccgat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctggtgcccgg 2169

55 tcttgcgatg attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat 2229

60 gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat 2289

65 ttaatacgcg atagaaaaca aatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt 2349

gtcatctatg ttactagatc ggggatatc 2378

55 <210> 28  
 <211> 144  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial

65

## ES 2 325 874 T3

<400> 28

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 10 | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |
| 15 |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|    | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| 20 | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |
| 25 |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|    | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 30 | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

<210> 29

<211> 2107

<212> ADN

<213> Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: casete de expresión que comprende el promotor funcional de planta unido a una secuencia líder, intrón, una secuencia que codifica una AMPA acetiltransferasa, y una secuencia de terminación

45

<220>

<221> promotor

50

<222> (26) .. (590)

<220>

<221> 5'UTR

55

<222> (615) ..(685)

<220>

<221> intrón

60

<222> (699) .. (1148)

<220>

<221> péptido de tránsito

65

<222> (1149) .. (1426)

# ES 2 325 874 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1427) .. (1858)

5

<220>

<221> terminador

<222> (1869) .. (2102)

10

<400> 29

15 ggggccgcgt taacaagctt ctgcaggtcc gatgtgagac ttttcaacaagggtaatat 60  
ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg 120  
20 aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag 180  
atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 240  
aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatggc cegatgtgag 300  
25 acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt 360  
cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcc t cattgcat 420  
aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccc 480  
30 cccacgagga gcatcggtga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaa gcaagtggat 540  
tgatgtgata tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 600  
35 ccttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaca agctgactct 660  
agcagatcct ctagaacct cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 720  
40 gacaacacac cataagatcc aagggaggcc tccgccgccg ccggtaacca ccccgcccct 780  
ctctctttc tttctcgtt ttttttccg tctcggcttc gatctttggc cttggtagtt 840  
tgggtgggcg agaggcggc tctgctcgcg ccagatcggg gcgcgggagg ggcgggatct 900  
45 cgcggggaat ggggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc cgttggtggg ggagatgatg 960

50

55

60

65

ES 2 325 874 T3

5 gggcgtttaa aatttcgccg tgctaaacaa gatcaggaag aggggaaaag ggcactatgg 1020  
 tttatatttt tatatatttc tgetgcttcg tcaggcttag atgtgctaga tctttctttc 1080  
 ttctttttgt gggtagaatt taatccctca gcattgttca tcggtagttt ttcttttcat 1140  
 gatttcgtga caaatgcagc ctcgtgcgga gcttttttgt aggtagaagt gatcaacat 1200  
 10 ggcgcaagtt agcagaatct gcaatggtgt gcagaacca tctcttatct ccaatctctc 1260  
 gaaatccagt caacgcaaat ctcccttctc ggtttctctg aagacgcagc agcatccacg 1320  
 15 agcttatccg atttcgctcg cgtggggatt gaagaagagt gggatgacgt taattggctc 1380  
 tgagcttcgt cctcttaagg tcatgtcttc tgtttccaag gcgtgc atg gcc gct 1435  
 Met Ala Ala  
 20 tgc gag ctt cgc cca gcc acg cag tac gac acc gac gcc gtg tac gcg 1483  
 Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr Ala  
 5 10 15  
 25 ctg atc tgc gag ctc aag cag gcg gag ttc gac cac cac gcc ttc cgc 1531  
 Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe Arg  
 20 25 30 35  
 30 gtg gcc ttc aac gcc aac ctg cgc gac ccc aac atg cgc tac cat ctg 1579  
 Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His Leu  
 40 45 50  
 35 gcg ctg ctt gat gcc gaa gtg gtc gcc atg atc gcc ctg cac ctc cag 1627  
 Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu Gln  
 55 60 65  
 40 ttc cac ctg cat cat gtc aac tgg atc gcc gag atc cag gag ctg gtc 1675  
 Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu Val  
 70 75 80  
 45 gtg atg cca cag gcg agg ggt ctg aac gtc gcc agc aag ctc ctg gcg 1723  
 Val Met Pro Gln Ala Arg Gln Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu Ala  
 85 90 95  
 50 tgg gcc gag gag gaa gcc agg cag gcc gga gcc gag atg acc gag ctc 1771  
 Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu Leu  
 100 105 110 115  
 55 agc acc aac gtg aag cgc cac gac gcg cac cgc ttc tac ctg cgc gaa 1819  
 Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg Glu  
 120 125 130  
 60 ggc tac gag cag agc cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg taaagatctg 1868  
 Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu  
 135 140  
 65 aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcaggttgga gccaatctgg ttgatgtgtg 1928  
 tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc ccagtgtttt 1988  
 70 ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat gagaaataaa 2048  
 ttgttctgat tttgagtgca aaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt tttggatcc 2107  
 <210> 30  
 <211> 144

## ES 2 325 874 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <400> 30

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | Met | Ala | Ala | Cys | Glu | Leu | Arg | Pro | Ala | Thr | Gln | Tyr | Asp | Thr | Asp | Ala |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| 15 | Val | Tyr | Ala | Leu | Ile | Cys | Glu | Leu | Lys | Gln | Ala | Glu | Phe | Asp | His | His |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 20 | Ala | Phe | Arg | Val | Gly | Phe | Asn | Ala | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Asn | Met | Arg |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| 25 | Tyr | His | Leu | Ala | Leu | Leu | Asp | Gly | Glu | Val | Val | Gly | Met | Ile | Gly | Leu |
|    | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 30 | His | Leu | Gln | Phe | His | Leu | His | His | Val | Asn | Trp | Ile | Gly | Glu | Ile | Gln |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| 35 | Glu | Leu | Val | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Arg | Gly | Leu | Asn | Val | Gly | Ser | Lys |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| 40 | Leu | Leu | Ala | Trp | Ala | Glu | Glu | Glu | Ala | Arg | Gln | Ala | Gly | Ala | Glu | Met |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 45 | Thr | Glu | Leu | Ser | Thr | Asn | Val | Lys | Arg | His | Asp | Ala | His | Arg | Phe | Tyr |
|    |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 50 | Leu | Arg | Glu | Gly | Tyr | Glu | Gln | Ser | His | Phe | Arg | Phe | Thr | Lys | Ala | Leu |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

<210> 31

<211> 2436

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: casete de expresión de monocotiledónea que comprende un promotor funcional de planta unido a un intrón, una secuencia que codifica una AMPA acetiltransferasa, y una secuencia de terminación

<220>

50 <221> promotor

<222> (26) .. (640)

<220>

55 <221> intrón

<222> (670) .. (1473)

<220>

60 <221> péptido de tránsito

<222> (1498) .. (1725)

<220>

65 <221> CDS

<222> (1726) .. (2157)

## ES 2 325 874 T3

<220>

<221> terminador

<222> (2172) .. (2427)

5

<400> 31

```

gcggccgcgt taacaagctt ctgcaggctc gatgtgagac ttttcaacaa agggtaatat 60
10  ccggaacact cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg 120
    aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag 180
15  atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 240
    aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatggc cccgatgtgag 300
    acttttcaac aaagggtaat atccggaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt 360
20  cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcatg 420
    aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccc 480
25  cccacgagga gcacgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat 540
    tgatgtgata tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 600
    ccttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaca agctgactct 660
30  agcagatcta cgtctctcgg tacgcgctca ctccgccctc tgcctttggt actgccacgt 720
    ttctctgaat gctctcttgt gtgggtgattg ctgagagtgg tttagctgga tctagaatta 780
35  cactctgaaa tcgtgttctg cctgtgctga ttacttgccg tcctttgtag cagcaaaaata 840
    tagggacatg gtagtacgaa acgaagatag aacctacaca gcaatacagag aaatgtgtaa 900
40  tttggtgctt agcggtatct atttaagcac atgttggtgt tatagggcac ttggattcag 960
    aagtttctg ttaatttagg cacaggtctc atactacatg ggtcaatagt atagggattc 1020
    atattatagg cgatactata ataatttgtt cgtctgcaga gcttattatt tgccaaaatt 1080
45  agatattcct attctgtttt tgtttgtgtg ctgttaaatt gttaacgcct gaaggaataa 1140
    atataaatga cgaaattttg atgtttatct ctgctccttt attgtgacca taagtcaaga 1200
    tcagatgcac ttgttttaaa tattgttgtc tgaagaaata agtactgaca gtattttgat 1260
50  gcattgatct gcttgtttgt tgtaacaaaa tttaaaaata aagagtttcc tttttgttgc 1320
    tctccttacc tctgatggc atctagtatc taccaactga cactatattg cttctcttta 1380
55  catacgtatc ttgctcgatg ctttctccct agtggtgacc agtggttactc acatagtctt 1440
    tgctcatttc attgtaatgc agataccaag cggcctctag aggatccagg agcaaccatg 1500
    gcgcaagtta gcagaatctg caatgggtgtg cagaacccat ctcttatctc caatctctcg 1560
60  aaatccagtc aacgcaaatc tcccttatcg gtttctctga agacgcagca gcacccacga 1620
    gcttatccga tttcgtctgc gtggggattg aagaagagtg ggatgacgct aattggctct 1680
65  gagcttctgc ctcttaaggt catgtcttct gtttccacgg cgtgc atg gcc gct tgc 1737
                                     Met Ala Ala Cys

```

# ES 2 325 874 T3

```

gag ctt cgc cca gcc acg cag tac gac acc gac gcc gtg tac gcg ctg   1785
Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Val Tyr Ala Leu
  5              10              15              20

atc tgc gag ctc aag cag gcg gag ttc gac cac cac gcc ttc cgc gtg   1833
Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His Ala Phe Arg Val
              25              30              35

ggc ttc aac gcc aac ctg cgc gac ccc aac atg cgc tac cat ctg gcg   1881
Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg Tyr His Leu Ala
              40              45              50

ctg ctt gat ggc gaa gtg gtc ggc atg atc ggc ctg cac ctc cag ttc   1929
Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu His Leu Gln Phe
              55              60              65

cac ctg cat cat gtc aac tgg atc ggc gag atc cag gag ctg gtc gtg   1977
His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln Glu Leu Val Val
              70              75              80

atg cca cag gcg agg ggt ctg aac gtc ggc agc aag ctc ctg gcg tgg   2025
Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys Leu Leu Ala Trp
              85              90              95              100

gcc gag gag gaa gcc agg cag gcc gga gcc gag atg acc gag ctc agc   2073
Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met Thr Glu Leu Ser
              105              110              115

acc aac gtg aag cgc cac gac gcg cac cgc ttc tac ctg cgc gaa ggc   2121
Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr Leu Arg Glu Gly
              120              125              130

tac gag cag agc cac ttc cgc ttc acc aag gcg ctg taaagatctg       2167
Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu
              135              140

aattcccgat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaate ctggtgccgg 2227

tcttgcatg attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat 2287

gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat 2347

ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggg 2407

gtcatctatg ttactagatc ggggatatc                                     2436

```

<210> 32

55 <211> 144

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

65

ES 2 325 874 T3

<400> 32

5 Met Ala Ala Cys Glu Leu Arg Pro Ala Thr Gln Tyr Asp Thr Asp Ala  
1 5 10 15  
Val Tyr Ala Leu Ile Cys Glu Leu Lys Gln Ala Glu Phe Asp His His  
20 25 30  
10 Ala Phe Arg Val Gly Phe Asn Ala Asn Leu Arg Asp Pro Asn Met Arg  
35 40 45  
Tyr His Leu Ala Leu Leu Asp Gly Glu Val Val Gly Met Ile Gly Leu  
50 55 60  
15 His Leu Gln Phe His Leu His His Val Asn Trp Ile Gly Glu Ile Gln  
65 70 75 80  
20 Glu Leu Val Val Met Pro Gln Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly Ser Lys  
85 90 95  
Leu Leu Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Ala Gly Ala Glu Met  
100 105 110  
25 Thr Glu Leu Ser Thr Asn Val Lys Arg His Asp Ala His Arg Phe Tyr  
115 120 125  
30 Leu Arg Glu Gly Tyr Glu Gln Ser His Phe Arg Phe Thr Lys Ala Leu  
130 135 140

35

40

45

50

55

60

65