



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Diseño de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a herbicidas en soya**

**Jenny Paola Jiménez Barreto**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.  
Bogotá, Colombia

2014



# **Diseño de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a herbicidas en soya**

**Jenny Paola Jiménez Barreto**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al

título de:

**Magister en Ciencias-Biología**

Director (a):

Ph.D., Alejandro Chaparro Giraldo

Grupo de Ingeniería Genética de Plantas- IGP

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

Bogotá, Colombia

2014



*El fin de la ciencia no es abrir la puerta al saber eterno,  
sino poner límite al error eterno.*

*Galileo Galilei*



## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Colombia y a la facultad de Ciencias por la formación recibida durante la maestría.

A la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas de Colombia FENALCE, por la financiación de este proyecto.

Al profesor Alejandro Chaparro Giraldo por la dirección del proyecto.

A mis compañeros y amigos del grupo de Ingeniería genética de plantas.

A mi familia, por su colaboración para que pudiera llevar a cabo este proceso de formación.



## Resumen

La soya es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. La productividad de este cultivo ha aumentado sustancialmente a partir de la adopción de líneas transgénicas con tolerancia a herbicidas, sin embargo, estas líneas se han desarrollado para regiones templadas. Por esta razón la implementación de soya tolerante a herbicidas en Colombia requiere la transformación de variedades nacionales. Uno de los aspectos más importantes en este proceso es el desarrollo de constructos génicos que expresen la característica de interés, los cuales tradicionalmente se han desarrollado mediante técnicas de biología molecular convencionales. Sin embargo, gracias a las herramientas de la bioinformática y la biología sintética, es posible realizar el diseño *in silico* del constructo y contratar la síntesis del mismo, permitiendo realizar modificaciones en la secuencia como optimizaciones de uso codónico, las cuales mejoran significativamente los niveles de expresión de la proteína. En este trabajo se diseñaron y evaluaron versiones semi-sintéticas de genes que confieren tolerancia a glifosato y glufosinato de amonio, como una fase inicial para la obtención de variedades nacionales de soya tolerantes a herbicidas.

**Palabras clave:** Diseño *in silico* de constructos génicos, Uso codónico, Tolerancia a herbicidas, Cultivos transgénicos.

## Abstract

The Soybean crop is one of the most important in the world. The productivity of this crop has increased substantially since the adoption of tolerant herbicide transgenic lines. However these lines were developed for temperate regions, for this reason, the successful introduction of herbicide tolerance soybean in Colombia could require genetic transformation of the national varieties. One of the most important issues about this process is the development of genetic constructs that express the characteristic of interest, which have been developed by techniques of conventional molecular biology. However thanks to bioinformatic and synthetic biology tools, it is possible to make the *in silico* design of the construct and hiring its synthesis, allowing to perform sequence modifications like codon usage, which significantly improve the protein expression. In this work, there were designed and assessed semi-synthetic gene versions that confer glyphosate and glufosinate tolerance, as an initial phase for the obtention of national soybean varieties with herbicide tolerance.

**Keywords:** *In silico* design of Genetic constructs, Codon usage, Herbicide Tolerance, Transgenic Crops.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>9</b>
1.1 Diseño de constructos génicos para transformación de plantas.....	9
1.1.1 Factores determinantes para el diseño de constructos génicos .....	11
1.2 Genes que confieren tolerancia a herbicidas .....	19
1.2.1 Genes que confieren tolerancia al glifosato.....	20
1.2.2 Genes que confieren tolerancia a glufosinato de amonio .....	23
1.3 Análisis de libertad de operación en biotecnología vegetal .....	25
1.3.1 Conceptos generales sobre patentes .....	25
1.3.2 Análisis de libertad de operación.....	29
<b>2. Metodología</b> .....	<b>33</b>
2.1 Estudio de libertad de operación.....	33
2.2 Diseño <i>in silico</i> de genes semi-sintéticos .....	35
2.2.1 Modificación de la secuencia codificante.....	36
2.2.2 Ensamblaje de las secuencias .....	39
2.2.3 Análisis traduccional <i>in silico</i> .....	40
2.2.4 Síntesis de los constructos y clonación en el vector de transformación.....	41
2.3 Caracterización molecular de los constructos génicos y transformación de bacterias .....	42
2.3.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.3.2 Eliminación del gen reportero del vector de transformación .....	44
2.3.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	47
2.4 Evaluación de la funcionalidad de los genes.....	48
2.4.1 Curvas de selección con herbicidas para <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	48
2.4.2 Transformación de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	50
2.4.3 Evaluación de la funcionalidad de los genes .....	52

<b>3. Resultados y discusión</b> .....	<b>55</b>
3.1 Análisis de propiedad Intelectual de las secuencias utilizadas para el diseño de genes .....	55
3.1.1 Secuencias promotoras .....	55
3.1.2 Secuencias codificantes .....	63
3.1.3 Otras secuencias .....	69
3.1.4 Consideraciones finales .....	72
3.2 Diseño de genes semi-sintéticos .....	74
3.2.1 Genes con tolerancia a glifosato .....	74
3.2.2 Genes con tolerancia a glufosinato de amonio .....	86
3.3 Caracterización molecular de los genes diseñados y transformación de bacterias .....	92
3.3.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> y pruebas de PCR .....	92
3.3.2 Eliminación de gen reportero del vector de transformación .....	95
3.3.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	100
3.4 Evaluación de la funcionalidad de los genes .....	101
3.4.1 Curvas de selección con herbicidas para <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	101
3.4.2 Transformación de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	107
3.4.3 Evaluación funcional del gen <i>cp4 epsps</i> .....	110
3.4.4 Evaluación funcional del gen <i>bar</i> .....	113
<b>4. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>115</b>
4.1 Conclusiones .....	115
4.2 Recomendaciones .....	116
<b>A. Anexo: Secuencias de los constructos génicos diseñados</b> .....	<b>117</b>
<b>B. Anexo: Complemento análisis traduccional <i>in silico</i> de los constructos</b> .....	<b>121</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>125</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1:</b> Reacción catalizada por la EPSPS y reacciones siguientes .....	21
<b>Figura 1-2:</b> Reacción catalizada por la glutamina sintetasa .....	24
<b>Figura 2-1:</b> Vector de transformación.....	42
<b>Figura 2-2:</b> Diagrama Vector de Transformación.....	45
<b>Figura 3-1:</b> Esquema componentes del evento MON89788 de soya .....	66
<b>Figura 3-2:</b> Parámetros iniciales y finales de la secuencia del gen <i>cp4 epsps</i> .....	78
<b>Figura 3-3:</b> A. Optimización codónica en VGD 1.3. B. Búsqueda de sitios críticos de splicing .....	79
<b>Figura 3-4:</b> Ensamblaje elementos del constructo en Gene Designer 2.0 .....	82
<b>Figura 3-5:</b> Diagrama genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a glifosato .....	83
<b>Figura 3-6:</b> Traducción <i>in silico</i> de los genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a glifosato.....	85
<b>Figura 3-7:</b> Parámetros iniciales (A) y finales (B) de la secuencia del gen <i>bar</i> . .....	88
<b>Figura 3-8A:</b> Ensamblaje de los elementos del constructo .....	89
<b>Figura 3-8B:</b> Diagrama genes semi-sintéticos con tolerancia a fosfotricina .....	90
<b>Figura 3-9:</b> Traducción <i>in silico</i> de los genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a fosfotricina. ....	91
<b>Figura 3-10:</b> PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con cada constructo.....	93
<b>Figura 3-11:</b> Amplificación de los genes de interés para cada vector .....	94
<b>Figura 3-12:</b> Diagrama vector de transformación en Gene Designer 2.0 .....	96
<b>Figura 3-13:</b> Digestión plásmidos con la enzima PvuI .....	97
<b>Figura 3-14:</b> PCR para el gen <i>gus</i> sobre los vectores modificados .....	98
<b>Figura 3-15:</b> Perfil de Restricción de los vectores modificados y sin modificar .....	99

<b>Figura 3-16:</b> Visualización PCRs de colonia de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 .....	100
<b>Figura 3-17:</b> Respuesta regenerativa de <i>N. Benthamiana</i> frente a glifosato .....	102
<b>Figura 3-18:</b> Efecto del glifosato sobre la regeneración de explantes de hoja de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	103
<b>Figura 3-19:</b> Efecto de la fosfinotricina sobre la regeneración de explantes de hoja de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	105
<b>Figura 3-20:</b> Respuesta regenerativa de <i>N. Benthamiana</i> a PPT .....	106
<b>Figura 3-21:</b> Caracterización molecular de plantas putativamente transformadas con el gen <i>cp4 epsps</i> .....	108
<b>Figura 3-22:</b> Explantes transformados con el vector BAR-IGP mod.....	109
<b>Figura 3-23:</b> Caracterización molecular de plantas putativamente transformadas con el gen <i>bar</i> .....	110
<b>Figura 3-24:</b> Evaluación funcional del gen <i>cp4 epsps</i> mediante la prueba de ELISA.	111
<b>Figura 3-25:</b> Evaluación funcional del gen <i>bar</i> mediante RT-PCR.....	113

## Lista de tablas

<b>Tabla 2-1:</b> Uso codónico de <i>Glycine max.</i> ....	38
<b>Tabla 3-1:</b> Listado de las patentes más importantes relacionadas con las secuencias de estudio.....	56
<b>Tabla 3-2:</b> Estructura de los genes semi-sintéticos con tolerancia a glifosato .....	76
<b>Tabla 3-3:</b> Estructura de los genes semi-sintéticos con tolerancia a fosfinotricina ....	87
<b>Tabla 3-4:</b> Primers utilizados para la caracterización molecular de los constructos....	92
<b>Tabla 3-5:</b> Perfil de restricción esperado para la digestión de los vectores .....	98

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BAP</b>	6-Bencilaminopurina
<b>CAI</b>	Índice de adaptación codónica
<b>CTP</b>	Péptido de transito del cloroplasto
<b>EPSPS</b>	Enol piruvil shikimato fosfato sintetasa
<b>FMV</b>	Promotor del virus del mosaico de la escrafularia
<b>Gmubi</b>	Promotor del gen de la poliubiquitina de soya
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MS</b>	Murashige & Skoog
<b>OMPI</b>	Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>p35S</b>	Promotor del virus del mosaico del coliflor
<b>PAT</b>	Fosfinotricina acetil tranferasa
<b>PCT</b>	Tratado de Cooperación en materia de Patente
<b>PPT</b>	Fosfinotricina
<b>SIC</b>	Secretaria de Industria y Comercio
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>VGD</b>	Visual Gene Developer

## Introducción

La soya es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, tiene un alto valor nutritivo debido al elevado contenido de proteína en su grano (alrededor del 35%), y al contenido de aceite que es aproximadamente un 17-20%. Como concentrado proteico se utiliza en raciones de alimentos balanceados para animales y en el enriquecimiento de varios productos destinados a la alimentación humana (Solórzano *et al.* 2005).

Desde el punto de vista agronómico la soya es un cultivo de ciclo corto, que se usa principalmente en sistemas de rotación con maíz, arroz y sorgo. Por ser una leguminosa obtiene gran parte del nitrógeno que necesita mediante fijación biológica realizada por bacterias nitrificantes que viven en sus raíces (MAGP and IICA 2012); de este modo, depende poco del contenido de nitrógeno en el suelo, lo que constituye una ventaja competitiva frente a otros cultivos, como maíz y trigo (MAGP and IICA 2012).

En el contexto económico, la demanda mundial de soya ha mantenido una tendencia creciente durante los últimos años, para el 2013 el consumo mundial de frijol de soya fue de 269.043 millones de toneladas (USDA 2014), esta misma tendencia se ha observado a nivel nacional. En Colombia, para el año 2013 se sembraron 43.832 hectáreas (ha), y se alcanzó una producción de 107.316 toneladas (t), sin embargo no se alcanza a suplir la demanda nacional, por lo cual el país es un importador de soya. Para el mismo año se importaron 306.774 t de frijol de soya y 1.014.157 t de torta de

soya (FENALCE 2014), estos datos demuestran la necesidad de mejorar el sistema de producción actual.

Según Leibovich *et al.* (2010), para mejorar la productividad del cultivo de soya en Colombia se debe trabajar simultáneamente sobre los costos de producción y sobre la productividad del cultivo. Dentro de los costos de producción, el consumo de insumos constituye el 56% de la totalidad de los gastos, y dentro de éstos los agroquímicos (herbicidas, insecticidas, y fungicidas) son el segundo insumo de mayor importancia después de los fertilizantes.

Particularmente el uso de herbicidas es la práctica más frecuente para el control de malezas en el cultivo de soya. Las malezas interfieren con el normal desarrollo del cultivo, al liberar sustancias inhibidoras del crecimiento en el medio y/o al competir por agua, luz y nutrientes con el cultivo (CORPOICA 2006). En Colombia, se ha observado que cuando no son controladas adecuadamente, éstas pueden reducir la productividad del cultivo hasta en un 70% (CORPOICA 2006).

Una de las tecnologías que han permitido mejorar la eficiencia en el control de malezas y al mismo tiempo aumentar la productividad de este cultivo en diferentes países, es el uso de variedades con tolerancia a herbicidas. Esta metodología se basa en la introducción de genes foráneos que confieren resistencia a herbicidas no selectivos de amplio espectro, permitiendo que el herbicida se pueda utilizar en cualquier etapa de la cosecha sin ocasionar daños al cultivo. La principal ganancia del agricultor es la disminución en el costo de producción, debida a la reducción de gastos en el control de malezas mediante herbicidas, además de favorecer el uso del sistema de labranza cero, el cual disminuye la erosión del suelo y favorece la producción de materia orgánica (Brookes & Barfoot 2013).

Entre los ejemplos más significativos del impacto positivo derivado del uso de este paquete tecnológico, está el aumento en la productividad del cultivo de soya en Argentina desde la adopción de variedades tolerantes a glifosato. El cultivo de soya en este país paso de 370.000 ha en 1996 a 18.650.000 ha en el 2011, y se calcula un aumento en el beneficio bruto de 7.40 millones de USD en 1996 a 373.00 millones de USD en el 2011 (Trigo, 2011).

Una alternativa para mejorar la productividad del cultivo de soya en Colombia es la adopción de la tecnología de tolerancia a herbicidas para las variedades nacionales. Aunque la soya con tolerancia a herbicidas se cultiva en varios países del mundo, esta semilla ha sido desarrollada para variedades de regiones templadas. En general, estas variedades tienden a florecer muy temprano y no producen rendimientos adecuados cuando se siembran en regiones con días más cortos como las zonas tropicales (Solórzano, 2005). Por este motivo, para el desarrollo de soya con tolerancia a herbicidas en Colombia, es necesario obtener un sistema de transformación genética para las variedades nacionales, las cuales son el resultado de un proceso de mejoramiento que ha permitido su adaptación a las condiciones del trópico.

El primer paso para el desarrollo de una línea transgénica, es la obtención de un vector de transformación que contenga un constructo genético, que permita la expresión del gen de interés en la planta. Tradicionalmente estos constructos se han desarrollado mediante técnicas de biología molecular convencionales, sin embargo gracias a las herramientas de la bioinformática y la biología sintética, hoy día es posible realizar el diseño *in silico* del constructo genético y contratar la síntesis del mismo.

El diseño *in silico* de genes semi-sintéticos o constructos génicos, es una herramienta versátil que permite al investigador manejar fácilmente variables en la secuencia de DNA y de los constructos que con el uso de técnicas moleculares convencionales sería

muy dispendioso. Esta metodología permite la libre escogencia de secuencias promotoras, terminadoras, UTRs, enhancers, péptidos señal, entre otros; insertar o eliminar sitios de restricción que faciliten manipulaciones en el laboratorio y realizar modificaciones en la secuencia codificante como optimizaciones de uso codónico y remoción de secuencias indeseables, factores que mejoran significativamente los niveles de expresión genética (Lannacone *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2013; Perlak *et al.*, 1991).

Este diseño requiere la selección adecuada de los elementos genéticos del constructo como genes, secuencias promotoras, terminadoras, péptidos señal entre otros, y su modificación y ensamblaje mediante programas bioinformáticos especializados. Adicionalmente, puesto que las secuencias utilizadas pueden estar protegidas por patentes, un punto importante es el análisis de propiedad intelectual de las mismas, principalmente cuando el objetivo es producir líneas transgénicas con propósitos comerciales.

Este trabajo es la fase inicial de un proyecto, que tiene como finalidad la producción de líneas transgénicas de variedades colombianas de soya con tolerancia a herbicidas, con el objetivo de liberación comercial, proyecto financiado por la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas- FENALCE. En este trabajo se realizó el diseño *in silico* de versiones de genes semi-sintéticos o constructos génicos que confieren tolerancia a herbicidas de amplio espectro como lo son el glifosato y el glufosinato de amonio, efectuando las optimizaciones necesarias para favorecer su expresión en plantas de soya, y se evaluó su funcionalidad mediante transformación de una planta modelo. Adicionalmente, se realizó el análisis de propiedad intelectual para Colombia de todas las secuencias involucradas en los constructos.

Se espera que los genes diseñados puedan ser utilizados para transformación genética de variedades colombianas de soya, aunque su uso no queda restringido a

las mismas, ya que en general el uso codónico de las plantas es muy semejante, especialmente entre dicotiledóneas y monocotiledóneas. También se espera que este trabajo contribuya a establecer una metodología adecuada para el diseño *in silico* de constructos génicos, ya que aunque este proceso es utilizado frecuentemente, en la literatura no se encuentran las especificaciones metodológicas para llevarlo a cabo.



# Objetivos

## Objetivo General

Diseñar genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio que cumplan con el concepto de libertad de operación en Colombia.

## Objetivos Específicos

- Establecer el estado de propiedad intelectual para Colombia de las secuencias a utilizar en el diseño *in silico* de genes semi-sintéticos con tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.
- Realizar el diseño *in silico* de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio teniendo en cuenta las modificaciones de uso codónico para la soya.
- Obtener y caracterizar fenotípica y molecularmente líneas recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Evaluar los genes diseñados en una planta modelo.



## 1. Marco Teórico

### 1.1 Diseño de constructos génicos para transformación de plantas

La base molecular de la transformación genética de células vegetales mediante *Agrobacterium tumefaciens* es la transferencia e integración desde la bacteria hasta el genoma nuclear de la planta, de una región de un plásmido inductor de tumor (plásmido Ti) residente en *A. tumefaciens*, el DNA transferido es referido como la región T o T-DNA del plásmido Ti (Gelvin, 2003). La transferencia del T-DNA requiere tres elementos principales: (1) secuencias repetitivas de los bordes, que están compuestas de 25 pares de bases que flanquean el T-DNA en orientación directa y delimitan la región que será procesada del plásmido Ti. (2) genes *vir* (genes de virulencia, que tienen la función de transferir el T-DNA localizados sobre el plásmido Ti y (3) varios genes ubicados sobre los cromosomas bacterianos (Lee and Gelvin 2008).

El descubrimiento que la región *vir* y el T-DNA del plásmido Ti podrían ser divididas en dos replicones separados (Hoekema *et al.*, 1983), siempre que los dos replicones estuviesen localizados dentro de la misma célula de *Agrobacterium* permitió el desarrollo de vectores binarios para la transformación genética. En los vectores de transformación de plantas, el T-DNA contiene únicamente los genes destinados para

ser transferidos dentro del genoma nuclear de la célula transformada, mientras que los oncogenes (genes inductores de tumores) han sido removidos (Curtis, 2008). Estos vectores son conocidos como vectores binarios debido a que requieren la interacción con un segundo plásmido que carece de T-DNA, conocido como plásmido desarmado; este segundo plásmido contiene la región *vir*, permitiendo que los transgenes contenidos en el T-DNA del vector binario sean integrados dentro del genoma nuclear huésped (Curtis, 2008).

Los vectores binarios son amplificados con la ayuda de *E. coli*, después el T-DNA del vector binario puede ser fácilmente movilizado (mediante conjugación bacteriana o transformación) dentro de una cepa apropiada de *Agrobacterium* que contenga el plásmido con la región *vir* (Lee & Gelvin, 2008).

Cuando *Agrobacterium* es inoculado sobre el tejido vegetal, la bacteria puede reconocer el tejido blanco como un huésped apropiado (Finer & Dhillon, 2008). Las heridas sobre los tejidos vegetales indicados producen acetosiringona la que activa la expresión de los genes *vir* (Finer & Dhillon, 2008), dicha activación regula el proceso de transferencia del T-DNA hacia el genoma nuclear de la planta (Gelvin, 2003). En este proceso, las proteínas VirD1 y VirD2 realizan un corte sobre las secuencias repetitivas de los bordes del T-DNA, y VirD2 se enlaza covalentemente al extremo 5' de la hebra T resultante; posteriormente el complejo VirD2/hebra T sale de la bacteria a través de un sistema de secreción tipo IV compuesto de 11 proteínas VirB y una proteína VirD4 (Gelvin 2010). Además de VirD2, *Agrobacterium* transfiere otras proteínas Vir, también denominadas proteínas efectoras, que se unen al complejo VirD2/hebra T. Una vez este complejo entra en la célula vegetal, debe ser transportado a través del citoplasma, para llegar al núcleo y finalmente a la cromatina. Luego las proteínas del complejo se disocian de a la hebra T y esta es

integrada en el genoma vegetal (Gelvin 2010). El mecanismo de integración no es del todo claro.

Puesto que en la transformación mediada por *Agrobacterium* el gen se inserta aleatoriamente en el genoma de planta, los niveles de expresión son variables dentro del pool de plantas transformadas (Gelvin, 2003), por lo cual a la par de tener un buen número de transformantes, es ideal tener un constructo génico que genere buenos niveles de expresión, ya que de esta manera aumenta la posibilidad de encontrar plantas que expresen la característica de interés en los niveles esperados.

La eficiencia de expresión del transgen es dependiente de un número de factores que afectan la acumulación y estabilidad del mRNA (Curtis, 2008). Entre los más importantes están el promotor, secuencias no traducidas o UTRs corriente arriba y corriente abajo del gen, sitios de splicing crípticos y señales de poliadenilación prematuras (Curtis, 2008).

La selección adecuada de los elementos génicos del T-DNA es fundamental. Cada constructo génico debe tener como mínimo una región promotora, una secuencia codificante o gen y una región terminadora. La escogencia de estos elementos y las modificaciones que se pueden realizar en los mismos, son los principales factores a tener en cuenta en el diseño de genes semi-sintéticos. A continuación se detallan algunos de los aspectos más importantes en este proceso.

### **1.1.1 Factores determinantes para el diseño de constructos génicos**

- Escogencia de la secuencia promotora

Un promotor puede definirse como la secuencia localizada en el extremo 5' del gen (utilizando la cadena codificante como referencia), la cual está compuesta de un

núcleo más otros elementos que ayudan a definir cuando y donde un gen es transcrito (Gallo & Flynn, 2008). Generalmente, el núcleo del promotor está localizado alrededor de 40 pares de bases (bp) antes del sitio de inicio de la transcripción, y la región corriente arriba del promotor puede extenderse tanto como 200 bp o más (Potenza *et al.*, 2004).

El elemento del núcleo del promotor es el lugar donde la RNA polimerasa II y los factores de transcripción generales se unen para iniciar la transcripción. Este elemento, en la mayoría de los genes eucariotas consiste de una secuencia consenso (la mayor parte de los nucleótidos encontrados en ciertas posiciones han sido conservados a través de la evolución) llamada la caja TATA (Gallo & Flynn, 2008). Se denomina caja TATA, porque se destacan los nucleótidos A y T.

Los elementos del promotor que no son requeridos para la iniciación de la transcripción, pero influyen el nivel, sincronización o especificidad de la transcripción son la caja CAAT (CCAAT), y elementos de respuesta gen específicos (Gallo & Flynn, 2008). La caja CAAT es localizada generalmente en las posiciones -70 a -80. Los elementos de respuesta gen específicos, varían en su secuencia y localización dentro del promotor (Gallo & Flynn, 2008).

Los promotores pueden agruparse en tres clases: promotores de expresión constitutiva, espacio temporales e inducibles (Peremarti *et al.*, 2010). Los promotores constitutivos proporcionan niveles constantes de expresión en todos los tejidos durante todo el tiempo (Hernandez-Garcia & Finer, 2014), ejemplo de ellos son el promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (Odell *et al.*, 1985), y promotores de genes vegetales como la actina y la ubiquitina. Los promotores espacio-temporales restringen la expresión genética a ciertas células, tejidos, órganos o estados de desarrollo (Hernandez-Garcia & Finer, 2014). Se han caracterizado promotores específicos de semillas, tubérculos, flores, frutos, raíces, hojas y tejidos verdes entre otros (Potenza *et al.*, 2004). Un ejemplo, es el promotor del gen E8 del

tomate, el cual ha sido utilizado exitosamente para dirigir la expresión de transgenes en frutos (Potenza *et al.*, 2004).

Los promotores inducibles responden a estímulos ambientales y proporcionan regulación de la expresión mediante un control externo (Hernandez-Garcia & Finer, 2014). Entre ellos se encuentran promotores que son inducidos bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico, tales como frío, calor, radiación UV, altas concentraciones salinas o de metales pesados en el suelo, deficiencia o exceso de agua, herbivoría o ataque de patógenos (Potenza *et al.*, 2004). También hay promotores que responden a señales o inductores que generalmente no se ven en las plantas, los cuales son aplicados a discreción del investigador con el fin de encender o apagar el transgen (Potenza *et al.*, 2004). Ejemplos de promotores inducibles son los promotores *wum1* y *pin2* los cuales dirigen la expresión inducida por ataques de patógeno y heridas en el tejido vegetal, y poseen poca o ninguna expresión constitutiva en ausencia de estímulo (Potenza *et al.*, 2004).

Debido a esta diversidad de promotores, en un casete de expresión los transgenes pueden ser clonados junto a una variedad de promotores heterólogos, lo que da lugar a un rango diferencial de patrones de expresión (Miki, 2008).

Los promotores utilizados en ingeniería genética de plantas han sido tomados de dos fuentes principales, virus de plantas y genes constitutivos de plantas (Peremarti *et al.*, 2010). Los virus vegetales tienen genes pequeños que son fáciles de definir genéticamente, y genomas pequeños que son fáciles de manipular *in vitro* por lo que los primeros promotores constitutivos fueron derivados de virus de plantas (Peremarti *et al.*, 2010). Adicionalmente, pueden ser reconocidas por la maquinaria celular vegetal, lo que permite la expresión del transgen.

Entre ellos se encuentran el promotor CaMV35S en su versión simple (Odell *et al.*, 1985) o duplicada (Kay *et al.*, 1987), el CsMV del virus del mosaico de la vena de la

yuca (Verdaguer *et al.*, 1996), el ScBV del badanavirus baciliforme de la caña de azúcar (Schenk *et al.*, 1999; Tzafrir *et al.*, 1998), el FMV del virus del mosaico de la escrofularia (Maiti *et al.*, 1997; Sanger *et al.*, 1990) entre otros.

Por otro lado, los promotores endógenos de plantas han sido derivados en su mayoría de genes constitutivos como la actina y la ubiquitina (Potenza *et al.*, 2004). La actina es un componente fundamental del citoesqueleto, que es expresada prácticamente en todas las células de la planta. Y el promotor de la actina I del arroz (McElroy *et al.*, 1991), ha sido usado ampliamente en transformación genética de plantas. A su vez, la ubiquitina es una de las proteínas más altamente conservadas, que ha sido ligada a muchos procesos celulares vitales incluyendo recambio de proteínas, estructura de cromatina, y reparación de DNA. Es altamente abundante en el citoplasma de la mayoría de las células vegetales, algunas son expresadas constitutivamente, mientras que otros también responden al estrés (Potenza *et al.*, 2004). Dentro de estos el más conocido es el promotor de la ubiquitina I del maíz (Christensen *et al.*, 1992).

La escogencia del promotor a utilizar en un casete de expresión depende fundamentalmente de los objetivos de la investigación (Potenza *et al.*, 2004). Deben tenerse en cuenta las características intrínsecas del promotor, de la proteína codificada por el transgen, y de la planta que se va a transformar. Los promotores dirigen niveles de expresión variables dependiendo el genoma en el que se expresen, por ejemplo se conoce que algunos promotores pueden expresarse diferencialmente entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Mitsuhara *et al.*, 1996); adicionalmente promotores constitutivos como el CaMV35S pueden expresarse preferencialmente en algunos tipos de tejidos (Govindarajulu *et al.*, 2008). Así mismo, el tipo de proteína codificada por el transgen permite determinar si se requiere que esta se exprese en toda la planta o en algún tejido particular. Aunque factores numerosos pueden afectar la expresión génica, los promotores son quizá el

componente más importante en la regulación del control de la expresión (Hernandez-Garcia *et al.*, 2010) , por lo que selección de los mismos es un punto crucial para el diseño de casetes de expresión.

- Modificaciones en la secuencia codificante

La secuencia codificante de un gen también llamada marco de lectura abierto u ORF, está formada por tripletas de nucleótidos o codones que codifican para un aminoácido determinado. El código genético utiliza 61 tripletas de nucleótidos para codificar 20 aminoácidos y tres codones para terminar la traducción (Gustafsson *et al.*, 2004). Cada aminoácido dentro del código es codificado mínimo por un codón -metionina y triptófano- hasta un máximo de seis codones -arginina, leucina, y serina- (Welch *et al.*, 2011). Esta degeneración del código genético permite que existan muchas secuencias nucleotídicas alternativas para codificar una misma proteína (Gustafsson *et al.*, 2004). De esta manera los organismos pueden usar codones sinónimos con diferentes preferencias (Welch *et al.*, 2011), lo que se ha denominado sesgo codónico.

Hay varias explicaciones para los patrones de uso codónico dentro o entre especies diferentes, las cuales se pueden agrupar en dos categorías asociadas con dos fuerzas independientes en la evolución molecular: mutación y selección natural (Plotkin & Kudla 2011). La explicación mutacional postula que el sesgo codónico surge de las propiedades de los procesos mutacionales subyacentes, por ejemplo, sesgos en los nucleótidos producidos por mutaciones puntuales, sesgos contextuales en las tasas de mutación puntuales, o sesgos en la reparación del ADN (Plotkin & Kudla, 2011). Las explicaciones que involucran selección natural postulan que las mutaciones sinónimas de alguna forma influyen en la aptitud del organismo, y por lo tanto pueden ser promovidos o reprimidos en toda la evolución (Plotkin & Kudla, 2011).

En general, los genes dentro de un grupo taxonómico exhiben similitud en la escogencia de codones, sin importar la función de dichos genes (Murray *et al.*, 1989). Así se puede obtener un estimado global del uso del código genético para un grupo taxonómico determinado, sumando las frecuencias codónicas de todos sus genes secuenciados (Hudson *et al.*, 2011). Dado que hoy día se conocen y están disponibles las secuencias de genes y genomas completos de muchos organismos, se han creado tablas de preferencias de uso codónico. Éstas son compiladas mediante tabulación del número de codones preferentes en todos los genes para un organismo particular, mostrando el total como un porcentaje o frecuencia (Hudson *et al.*, 2011).

Este conocimiento ha permitido a los investigadores mejorar la expresión de proteínas heterólogas (ya sea en plantas transgénicas o en sistemas de expresión heterólogos) mediante cambios o modificaciones en el uso codónico de la secuencia de DNA, de tal manera que se favorezcan los codones preferidos del organismo huésped.

Welch *et al.* (2009) sintetizaron 40 variantes diferentes de dos genes de interés comercial y los expresaron en *E. coli*, concluyendo que las modificaciones de uso codónico son determinantes en los niveles de expresión de proteínas. Tuller *et al.*, (2010), encontraron una asociación significativa entre el uso codónico y la eficiencia de traducción en todos los genes endógenos de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En plantas Iannacone *et al.* (1997) compararon los niveles de resistencia de *Solanum melongena* al coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* al transformar plantas con la versión silvestre y cuatro versiones modificadas del gen *Bt*. Fue necesario realizar modificaciones de uso codónico para lograr altos niveles de proteína y el fenotipo de resistencia deseado. Así mismo, Kang *et al.* (2004) realizaron modificaciones de uso codónico de la toxina lábil al calor de *E. coli* adaptándola a las preferencias codónicas del tabaco, con lo que se aumentó la expresión de la proteína 200 veces con respecto a la producida por el gen no modificado.

Las modificaciones de la secuencia de DNA se pueden realizar mediante mutaciones dirigidas y reconstrucción de fragmentos (Iannacone *et al.*, 1997; Perlak *et al.*, 1991), sin embargo ahora es más fácil y económico realizarlas *in silico* acoplando una tabla de uso codónico a un software especializado y sintetizando *de novo* la secuencia de DNA (Li *et al.*, 2013).

Las preferencias de uso codónico de un gen, son a menudo medidas mediante un índice de adaptación codónico o CAI. El índice usa un set de referencia de los genes altamente expresados de una especie para evaluar el peso relativo de cada codón y el puntaje para un gen es calculado a partir de la frecuencia del uso de todos los codones en dicho gen (Sharp & Li, 1987). Tiene un rango de variación entre 0 y 1.0, siendo 1.0 cuando un gen utiliza para cada aminoácido codificado el codón sinónimo más frecuente del set de referencia. No existen reglas fijas sobre cuanto modificar una secuencia para mejorar su expresión, sin embargo se sabe que utilizar un CAI de 1.0 no es lo más adecuado. En primer lugar, porque el mRNA fuertemente transcrito de dicho gen generará altas concentraciones codónicas para un subgrupo de las poblaciones de tRNAs, dando lugar a un pool de tRNAs desbalanceado, un patrón de uso codónico sesgado y un aumento de error traduccional (Gustafsson *et al.*, 2004). Segundo, sin flexibilidad en la selección de codones es imposible evitar elementos repetitivos y estructuras de mRNA secundarias en el gen; además, es a menudo deseable eliminar o insertar secuencias como sitios de restricción para facilitar manipulaciones subsiguientes, lo cual es imposible de lograr con un uso codónico tan rígido (Gustafsson *et al.*, 2004).

El mecanismo de expresión genética es complicado a nivel molecular y el uso codónico no es el único determinante para la eficiencia de la expresión (Jung & McDonald, 2011). Otro factor a tener en cuenta en el diseño de genes, y que está relacionado con el uso codónico es el porcentaje G-C de la secuencia. Se sabe, que el contenido de GC es más alto en plantas monocotiledóneas que en dicotiledóneas, lo

cual es más notorio en el tercera base de cada codón (Kawabe & Miyashita, 2003; Murray *et al.*, 1989).

Li *et al.* (2013) mejoraron los niveles de expresión y de resistencia a insectos del gen cry1Ah modificando su secuencia. Mediante uso codónico variaron el contenido de GC desde 37% (gen original) a 48, 55 y 63% (genes diseñados), encontrando una mejor expresión en los genes diseñados tanto a nivel de mRNA como de proteína y de resistencia a insectos.

Relacionado al contenido de GC en la secuencia de DNA está el contenido de AT. Se sabe que secuencias ricas en A-T dentro del gen podrían causar terminación transcripcional prematura y niveles de mRNA reducidos (Gustafsson *et al.*, 2012), por ello es común evitar este tipo de secuencias cuando se modifica la secuencia de genes. Perlak *et al.* (1991) compararon los niveles de expresión del gen cry1Ab tipo silvestre con versiones modificadas del mismo gen en plantas de tabaco y tomate. Las modificaciones realizadas permitieron eliminar regiones ricas en AT (potenciales sitios de poliadenilación), lo cual aumento el contenido global de GC. Encontraron niveles de expresión de la proteína de 10 a 100 veces más altos al utilizar las versiones modificadas.

Las variables dentro de los ORF del gen que afectan la expresión son numerosas y a menudo interdependientes (Gustafsson *et al.*, 2012). Cuando se realizan modificaciones de este tipo es necesario tener en cuenta que todos los factores interaccionan unos con otros. Se ha demostrado que eliminar zonas ricas en AT mejora los niveles de expresión a nivel de mRNA, sin embargo, la expresión a nivel de proteína es notablemente influenciada por el uso codónico de la secuencia (Lannacone *et al.*, 1997; Perlak *et al.*, 1991).

La eficiencia en la expresión del transgen en plantas también es influenciada por las secuencias no traducidas o UTRs corriente arriba y corriente abajo del gen, sitios de

splicing crípticos, posición de los intrones (Curtis, 2008), entre otros. Por ello cuando se desea diseñar casetes de expresión es importante tener en cuenta todos estos aspectos.

## 1.2 Genes que confieren tolerancia a herbicidas

Los herbicidas son químicos que interactúan con blancos moleculares específicos en una planta, ocasionando una ruptura en los procesos metabólicos normales, como consecuencia la planta es incapaz de sobrevivir y finalmente perece (Dhingra & Daniell, 2004). Según su mecanismo de acción pueden inhibir diferentes procesos en la planta como biosíntesis de compuestos esenciales (aminoácidos, lípidos, carotenoides) fotosíntesis y división celular (Duke, 1990).

Con el fin de proporcionar una ventaja a las especies cultivadas sobre las malezas, los herbicidas eran tradicionalmente seleccionados sobre la base de su letalidad selectiva para la vegetación indeseada (Dhingra & Daniell, 2004). Como alternativa, mediante ingeniería genética, se han introducido genes en algunos cultivos que hacen a la planta tolerante al herbicida.

Dentro de los herbicidas más utilizados para el control de malezas en soya están el glifosato y el glufosinato de amonio (MAGP & IICA, 2012). Éstos son herbicidas no selectivos de amplio espectro que inhiben la síntesis de aminoácidos específicos. Este tipo de herbicidas son altamente efectivos para el control de malezas y presentan bajos niveles de toxicidad para mamíferos, por lo cual son ideales para el desarrollo de cultivos tolerantes a herbicidas (Tan *et al.*, 2006). Se han reportado tres métodos para producir tolerancia a herbicidas mediante ingeniería genética: sobreproducción de la enzima nativa, modificación del sitio activo y detoxificación del herbicida

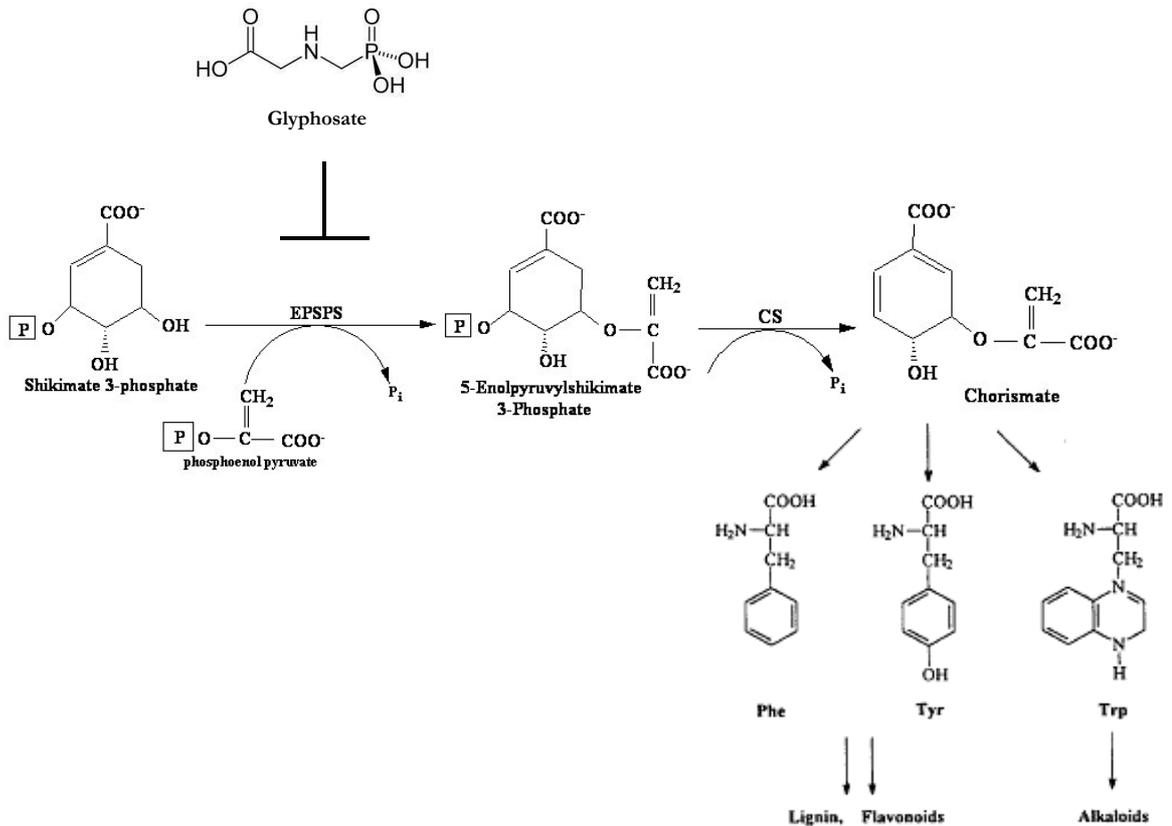
(Tsaftaris, 1996). A continuación se describen los mecanismos más utilizados para conferir tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

### 1.2.1 Genes que confieren tolerancia al glifosato

El glifosato es un herbicida de amplio espectro cuyo mecanismo de acción es inhibir la enzima Enol piruvil shikimato fosfato sintetasa o EPSPS (EC 2.5.1.19) (Kishore & Shah, 1988). Esta es una enzima clave de la vía del ácido shikimico por medio del cual se sintetizan metabolitos derivados del corismato incluyendo amino ácidos aromáticos como tirosina, fenilalanina y triptófano (Herrmann, 1995). Específicamente la EPSPS cataliza la síntesis de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) a partir de shikimato 3 fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) (Tan *et al.*, 2006) como se observa en la figura 1-1. Puesto que la estructura del PEP y del glifosato son muy similares, éste actúa como inhibidor competitivo impidiendo la reacción (Funke *et al.*, 2006), llevando a la planta a inhibición del crecimiento y muerte.

La EPSPS está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, mas no en animales los cuales no sintetizan sus propios aminoácidos (Padgett *et al.*, 1995). En la naturaleza se han encontrado varias versiones de la enzima EPSPS que no se ven afectadas por el glifosato, la mayoría de las cuales son de origen bacteriano (Barry *et al.*, 1992; Comai *et al.*, 1983; Eschenburg *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2011), aunque también se han reportado versiones resistentes en plantas (Shah *et al.*, 1986). Varias de éstas se han utilizado para generar plantas transgénicas con tolerancia al glifosato, sin embargo, la única que ha mostrado tener la eficiencia suficiente para lograr la producción de líneas transgénicas comerciales es la EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (Barry *et al.*, 1992). Esta bacteria fue aislada de una columna de residuos en una instalación de producción de glifosato.

**Figura 1-1:** Reacción catalizada por la EPSPS y reacciones siguientes en la vía del ácido shikímico (modificado de Herrmann, 1995 y Schonbrunn *et al.* 2001).



La CP4:EPSPS pertenece a la clase II de enzimas EPSPS, caracterizadas por una alta eficiencia enzimática, mostrando gran tolerancia a la inhibición por glifosato, al tiempo que mantienen un  $K_m$  bajo para PEP (Barry *et al.*, 1992), lo que indica que tienen una alta afinidad a este sustrato. Aunque Barry *et al.* (1992) identificaron varias EPSPSs pertenecientes a esta clase, la CP4:EPSPS fue la que mostró mejores parámetros cinéticos. Esta tolerancia al glifosato es en gran parte explicada por la presencia de un residuo Ala 100 en el sitio activo de la enzima. Funke *et al.*, (2006) restauraron la sensibilidad al glifosato de la CP4:EPSPS mediante la mutación Ala100-Gly100; esta modificación genera un ligero cambio en la estructura tridimensional, que permite la unión del glifosato en una conformación extendida que inhibe la enzima. La presencia del residuo Ala 100 hace que el sitio activo de la enzima sea más

estrecho, por lo cual el glifosato únicamente se puede unir en una conformación condensada que no puede inhibir la enzima.

La EPSPS es codificada en el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de tránsito o CTP, que es posteriormente removido por una metaloproteasa sitio específica (Della-Cioppa *et al.*, 1986), motivo por lo cual para asegurar que la proteína va a cumplir con su función adecuadamente, el uso de la CP4:EPSPS en transgénesis requiere la fusión a un péptido de tránsito en el extremo 5' del gen.

Al introducir el gen cp4 epsps en una planta, cuando esta es sometida a tratamiento con glifosato, no se ve afectada debido a que la CP4:EPSPS es capaz de proveer a la planta de los aminoácidos aromáticos que necesita, en contraste con plantas convencionales sometidas al herbicida, que muestran una reducción severa de crecimiento y finalmente la muerte (Padgett *et al.*, 1995).

Aunque la CP4:EPSPS es la enzima más utilizada para conferir esta característica a nivel comercial, también se ha reportado el uso de otros genes. Entre ellos el gen GOX, aislado de *Ochrobactrum anthropi*, que descompone el glifosato en ácido aminometilfosfónico un compuesto no tóxico; ha sido utilizado en conjunto con el CP4:EPSPS, ya que por sí solo no es suficiente para generar los niveles de resistencia necesarios para un cultivo comercial.

Otro gen que confiere tolerancia a glifosato y que ha sido utilizado para la producción de líneas transgénicas comerciales es el gen GAT (Castle *et al.*, 2004). Éste fue aislado de *Bacillus licheniformes*, codifica para una N-acetil transferasa la cual convierte el glifosato en N-acetil glifosato, la forma acetilada del glifosato tiene baja afinidad por el sitio activo de la EPSPS, por lo cual no tiene actividad herbicida (Siehl *et al.*, 2007). Aunque la versión nativa produjo niveles de tolerancia bajos, mediante barajado de

DNA se logró un nivel de tolerancia apropiado para el desarrollo de líneas transgénicas (Castle *et al.*, 2004).

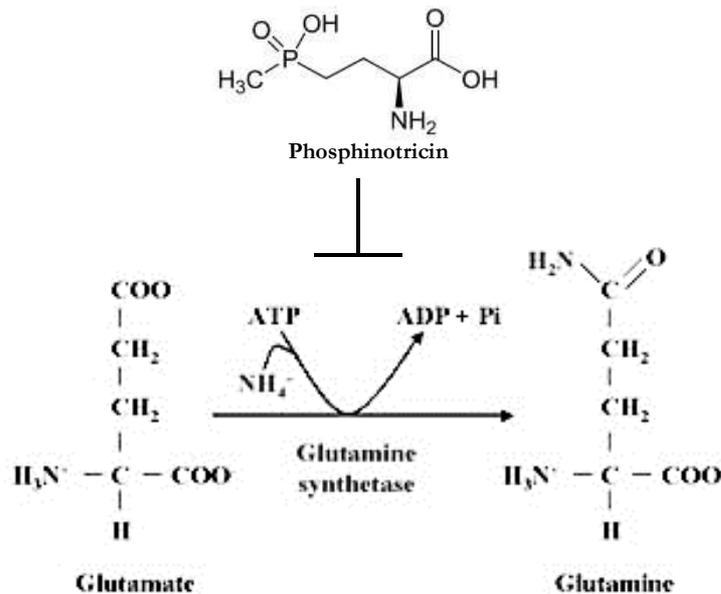
### **1.2.2 Genes que confieren tolerancia a glufosinato de amonio**

El glufosinato de amonio o fosfotricina (PPT) es el ingrediente activo de varios herbicidas comerciales, es un análogo del ácido L-glutámico que contiene dos residuos L-alanina (De Block *et al.*, 1987). Tanto en plantas como en bacterias las peptidasas intracelulares remueven los residuos de alanina y liberan la PPT activa (Thompson *et al.*, 1987), la cual se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima glutamina sintetasa.

Esta cataliza la conversión de glutamato a glutamina utilizando amonio como sustrato en una reacción dependiente de ATP (Cren & Hirel, 1999) (figura 1-2), siendo ésta la primera reacción del ciclo del glutamato, que es la vía primaria de asimilación de nitrógeno en plantas (Temple *et al.*, 1998). Como consecuencia, la inhibición de la glutamina sintasa causa acumulación de amonio. El amonio es tóxico para las células vegetales debido a su capacidad para desacoplar la respiración en bajas concentraciones, por lo cual debe ser rápidamente convertido en compuestos orgánicos no tóxicos (Temple *et al.*, 1998).

Adicionalmente, la carencia de glutamina conduce a la inhibición de biosíntesis de proteínas, acumulación de glyoxylato en el ciclo de fotorrespiración y una deficiencia en los componentes del ciclo de Calvin lo que conlleva a la interrupción de la fotorrespiración, y en conjunto esta serie de reacciones conducen a la inhibición de la fotosíntesis (Sauer *et al.*, 1987).

**Figura 1-2:** Reacción catalizada por la glutamina sintetasa (modificado de Hartzler, 2012).



La PPT es producido naturalmente como antibiótico por cepas del genero *Streptomyces* por lo cual algunas contienen enzimas que les confieren resistencia al compuesto (Thompson *et al.*, 1987). La enzima fosfinitricina-acetil-transferasa (PAT) es un ejemplo de ello; esta proteína acetila el grupo  $\text{NH}_2$  de la PPT dando lugar a la formación de N-acetil fosfinitricina, que no tiene actividad herbicida (Dröge *et al.*, 1992). La resistencia es entonces conferida mediante modificación del herbicida, más que sobre el blanco de su actividad.

La enzima PAT es codificada por el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.*, 1987) y el gen *bar* de *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988). Las proteínas codificadas por estos genes tienen un porcentaje de identidad del 84.7%, y han sido utilizadas para el desarrollo de plantas tolerantes a PPT. La expresión del gen *bar* confiere resistencia a fosfinitricina hasta un nivel 10 veces

mayor a la dosis de aplicación en campo (Wohlleben *et al.*, 1988). Actualmente todas las plantas transgénicas con tolerancia a glufosinato que han sido liberadas comercialmente tienen uno de estos dos genes (CERA, 2014).

En este trabajo se diseñaron versiones de genes semi-sintéticos que confieren la característica tolerancia a glifosato y tolerancia a glufosinato de amonio. Además de las consideraciones biológicas para el diseño de los constructos, se tuvo en cuenta que los elementos genéticos utilizados para el diseño de los mismos cumplieran con el concepto de libertad de operación en Colombia, es decir que no estuvieran cubiertos por derechos de propiedad intelectual. A continuación se detallan los conceptos de propiedad intelectual necesarios para comprender este aspecto del trabajo.

### **1.3 Análisis de libertad de operación en biotecnología vegetal**

#### **1.3.1 Conceptos generales sobre patentes**

La propiedad intelectual es una forma de propiedad que se aplica a las ideas o a los “productos de la mente” y da al propietario un grupo de derechos que son comparables a los derechos de propiedad tangibles (Bennett *et al.*, 2008). Existen varias formas de propiedad intelectual, incluyendo patentes de utilidad, derechos de autor, marcas comerciales, y secretos comerciales (SIC, 2008a). En la biotecnología agrícola, la forma dominante de propiedad intelectual es la patente (Bennett *et al.*, 2008).

Una patente es un título de propiedad otorgado por el estado, que da a su titular el derecho de explotar e impedir temporalmente a otros la fabricación, venta o utilización de la invención protegida(SIC, 2008a). Las patentes son de gran importancia en la biotecnología, y la biotecnología vegetal no es la excepción. Las

secuencias de DNA, proteínas, técnicas de transformación, y las plantas transgénicas en sí mismas, todas tienen utilidad, pueden ser consideradas invenciones, y por tanto son patentables (Bennett *et al.*, 2008). Es importante tener en cuenta, que una patente es conferida por un gobierno nacional durante un período específico de tiempo, generalmente 20 años. La patente se puede hacer cumplir únicamente en aquellos países en los cuales fue otorgada, después de cumplir los 20 años expira, y la invención puede ser utilizada por cualquiera sin restricciones. Así entonces, una patente proporciona un derecho de propiedad intelectual que está limitado geográficamente y temporalmente (Bennett *et al.*, 2008).

Al hablar de patentes, es necesario conocer que información se encuentra en este tipo de documento. Típicamente una patente se divide en tres sesiones principales: 1. Página de cubierta que contiene información bibliográfica, 2. Una especificación que describe la invención y 3. Reivindicaciones las cuales definen el alcance de la actividad de la cual el propietario de la patente tiene el derecho de excluir a otros, a menos que se firmen acuerdos de licenciamiento (CAMBIA, 2014).

En la página inicial se encuentran datos como: número de la patente y fecha de concesión, título de la patente, nombre del inventor, nombre del solicitante, número de solicitud, fecha de prioridad, clasificación internacional de patentes, citas y referencias, resumen y dibujo (Ortiz & Escorsa, 2010).

La especificación contiene una descripción de la invención que debe satisfacer ciertos requerimientos de escritura, los cuales varían entre diferentes países. La especificación tiene un valor fundamental ya que permite interpretar el alcance de las reivindicaciones; así la especificación de la patente es redactada tanto para satisfacer los requerimientos de escritura para patentabilidad como para definir el alcance de las reivindicaciones (CAMBIA, 2014).

---

Las reivindicaciones corresponden a la parte más importante del documento de patentes, pues en ellas se detalla la invención a proteger (Ortiz & Escorsa 2010). El objetivo de las reivindicaciones es señalar particular y claramente la materia que el solicitante considera su invención (CAMBIA, 2014). Éstas están enumeradas en orden ascendente y se pueden dividir en dos grandes grupos reivindicaciones independientes y reivindicaciones dependientes. Una reivindicación es independiente cuando define la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación es dependiente cuando define la materia que desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior (CAN, 2000).

La obtención de una patente requiere que el solicitante haga público su invento a través de una solicitud de patente, de forma que un experto en la materia referida por dicha solicitud, pueda reproducir la invención (Ortiz & Escorsa 2010). Para la concesión de una patente se evalúan tres criterios fundamentales: Novedad, Nivel inventivo y aplicación industrial (SIC, 2008a). La novedad, significa que la invención no sea conocida previamente en el ámbito mundial, en otras palabras una invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica antes de la presentación de la solicitud de patente. El nivel inventivo hace referencia a que la invención no sea obvia ni se derive del estado de la técnica de una manera evidente para una persona con un conocimiento medio del ámbito técnico de la invención. Y la aplicación industrial significa que la invención puede ser fabricada o utilizada en cualquier tipo de industria, entendiéndose por industria la referida a cualquier actividad productiva, incluida los servicios(SIC, 2008a).

Es posible proteger una invención en varios países, para lo cual existen diferentes opciones. Se pueden presentar solicitudes de patente al mismo tiempo en todos los países en los que se desee proteger la invención, o se puede presentar una solicitud

en virtud del Tratado de Cooperación en materia de Patente (PCT), que es un medio más simple, y fácil (OMPI, 2014). El PCT es un tratado internacional administrado por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) y suscrito por más de 140 países. El PCT permite solicitar simultáneamente y en un gran número de países la protección de una invención por patente mediante la presentación de una única solicitud "internacional" de patente sin necesidad de presentar varias solicitudes nacionales o regionales (SIC, 2008b).

De esta forma, el solicitante tiene un año para registrar su invención en la oficina mundial de propiedad intelectual y designar una serie de países miembros en los que desea preservar su derecho (Roa-Rodriguez & Nottenburg, 2003). Finalmente, para obtener la patente en esos países, el solicitante necesita registrarse en las oficinas nacionales de patentes, pagar impuestos, tener el documento traducido, y cumplir con las regulaciones de cada oficina particular. Dependiendo de algunas cuestiones de procedimiento y pago de impuestos, el solicitante tiene entre 20 a 30 meses desde la fecha original de registro, para registrarse en cada uno de esos países; dado los costos, muchas solicitudes son registradas únicamente en unos pocos países (Roa-Rodriguez & Nottenburg, 2003).

La información de patentes que cubre todos los campos de la tecnología, desde los más grandes y pequeños, hasta los más complejos y sencillos, está disponible al público, en la mayoría de los países, a partir de los 18 meses de haberse presentado la solicitud (SIC, 2008a). En la actualidad, esta información puede consultarse principalmente en bases de datos en línea; para acceder a estas existen tres mecanismos principales: 1. Portales de búsqueda de las oficinas de patentes, 2. portales de búsqueda gratuitos y 3. portales de búsqueda por suscripción (Ortiz & Escorsa, 2010).

### 1.3.2 Análisis de libertad de operación

Los diferentes elementos, procesos, técnicas e incluso genotipos que se utilicen en la creación de una línea transgénica pueden estar protegidos por varios derechos de propiedad intelectual. Por ello, es importante conocer desde el comienzo de la investigación cuales derechos de propiedad intelectual están relacionados, su vigencia y aplicación en los países donde se ha proyectado la comercialización del producto (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2013). Explorar el complejo panorama de la propiedad intelectual de un proyecto de investigación en biotecnología agrícola requiere de algunas herramientas y capacidades analíticas especiales; éste análisis requiere un conocimiento legal y científico, así como el acceso tanto a patentes y bases de datos bibliográficas (Bennett *et al.*, 2008).

Un estudio de libertad de operación es una evaluación legal de sí un proyecto de investigación o el desarrollo de un nuevo producto puede proceder con una baja o tolerable probabilidad de que no violará las patentes existentes u otros tipos de derechos de propiedad intelectual (Bennett *et al.*, 2008). El primer paso en una investigación de este tipo es definir claramente el objeto de estudio y establecer un panorama de patentes, éste debe incluir patentes y solicitudes de patentes estrechamente relacionadas con el objeto de estudio (Bennett *et al.*, 2008).

Una búsqueda eficiente de documentos de patentes supone, con frecuencia, un conocimiento profundo del ámbito técnico al que pertenece la invención; lo fundamental es identificar con total claridad lo que se desea buscar, expresándolo en un conjunto acotado de palabras clave que describen la tecnología o el problema que se pretende resolver (Ortiz & Escorsa, 2010). Diferentes autores señalan la

importancia de establecer una estrategia de búsqueda. La preparación de una estrategia de búsqueda de patentes comprende la selección adecuada de la o las bases de datos, determinación específica de palabras clave, y códigos de clasificación de patentes con el fin de obtener patentes relevantes para el objeto de estudio (Nagori & Mathur, 2009).

Cuando se realizan búsquedas relacionadas con datos biológicos, algunas bases permiten la búsqueda de secuencias de nucleótidos o de proteínas en la patentes y en sus reivindicaciones. Esto es posible gracias a que las bases de datos incorporan algoritmos de búsqueda como FASTA y BLAST, que permiten comparación de secuencias (Connett-Porceddu *et al.*, 2005). Para lograr buenos resultados es necesario estructurar una búsqueda que incluya múltiples fuentes (Hincapie, 2012).

Las patentes identificadas en la búsqueda deben ser evaluadas en un proceso de dos etapas. En el primero, cada una ella es evaluada para determinar si puede ser eliminada razonablemente para consideraciones futuras. Esto se puede hacer cuando no se tiene un argumento de violación o infracción razonable, por ejemplo, si la especificación cubre claramente un objeto diferente del que se está buscando, y todas las reivindicaciones incluyen limitaciones definidas que no podrían ser encontradas en el objeto de estudio. En la segunda etapa las patentes que no pudieron ser eliminadas durante el primera etapa son evaluadas en detalle, incluyendo un análisis de violación de las reivindicaciones (Nagori & Mathur, 2009). Este mismo proceso debe realizarse con las solicitudes de patente (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2013).

En el análisis de patentes tal vez el punto más importante es la evaluación de las reivindicaciones. El alcance de la protección y los derechos sobre lo que el titular quiere proteger están delimitados en las reivindicaciones (Hincapie & Chaparro-

---

Giraldo, 2013). La interpretación de las mismas puede ser difícil, un análisis apropiado se realiza leyendo las reivindicaciones en el contexto de la especificación y de la historia de procesamiento (Roa-Rodriguez & Nottenburg, 2003). Se debe hacer un análisis literal de las reivindicaciones, clasificándolas en dependientes e independientes y determinando si se relacionan con algún elemento o proceso involucrado en la obtención de la línea transgénica (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2013).

Al hacer este tipo de análisis de patente también hay que tener en cuenta las diferencias en la legislación entre los diferentes países. En el ámbito internacional especialmente en los Estados Unidos, las patentes en biotecnología vegetal involucran todos los elementos de un desarrollo que llega hasta la obtención de una planta transgénica. Así se tienen patentes de genes, promotores del gen, células transformadas, métodos de cultivo, semillas, partes de la planta y la planta completa, en las que usualmente cada elemento tiene un titular de la patente diferente. Esto se debe a que en dicha jurisdicción se pueden patentar todos estos elementos incluso cuando corresponden a aislamientos de genes, promotores y vectores tal como se encuentran en la naturaleza (Lamprea & Salazar, 2013). En Colombia, por el contrario, las patentes en biotecnología vegetal pueden proteger el método de transformación, el de detección del organismo transgénico, y el vector recombinante, mientras que la planta transformada y sus partes pueden ser protegidas por derechos de obtentor (Lamprea & Salazar, 2013).

A pesar de esto se pueden patentar ácidos nucleicos cuando difieren de la forma como se encuentran en la naturaleza (ej. modificaciones de uso codónico) y construcciones genéticas con identificación de cada uno de sus componentes (Lamprea & Salazar, 2013).

Para sacar conclusiones adecuadas en un análisis de este tipo, también es importante tener en cuenta que una patente puede perder su vigencia por no pago de la tasa anual para su mantenimiento, por vencimiento del término de la protección (20 años desde la solicitud), porque la autoridad competente dictamine que se le concedió a quien no tenía derecho a obtenerla y cuando no se cumplan los requisitos de patentabilidad (Hincapie, 2012), en estos casos se pierde el derecho y se vuelve de dominio público.

Las conclusiones del análisis de libertad de operación pueden llevar a identificar tecnologías de uso libre. Sin embargo, cuando se obtengan resultados de patentes y solicitudes que puedan estar involucradas en el desarrollo del producto se debe proceder a plantear las posibles estrategias de negociación de la tecnología antes de introducir en el mercado un producto que pueda tener elementos protegidos e infringir derechos de terceros (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2013).

Debido a la importancia de este tipo de análisis en el desarrollo de proyectos con finalidad comercial, en este trabajo se realizó un estudio de libertad de operación de los elementos genéticos utilizados para el diseño de genes semi-sintéticos.

## 2. Metodología

### 2.1 Estudio de libertad de operación

En este trabajo se diseñaron versiones semi-sintéticas de genes para la característica tolerancia a herbicidas. Con el fin de que los genes diseñados cumplieran con el concepto de libertad de operación para Colombia, antes de iniciar el diseño *in silico* de los mismos se realizó una búsqueda de patentes y solicitudes de patentes para Colombia de las secuencias seleccionadas y del vector de transformación. Las bases de datos utilizadas para las búsquedas se escogieron de acuerdo a las sugerencias de Hincapie (2012). Se utilizaron tres bases de datos internacionales: Patentlens (<http://www.patentlens.net>), especializada en el campo de la biotecnología, Patentscope (<http://www.wipo.int/patentscope/en/>), base de datos de la OMPI, Spacenet (<http://www.epo.org/>), de la oficina europea de patentes y la base de datos nacional de la superintendencia de industria y comercio (SIC) (<http://www.sic.gov.co/es/banco-patentes>), todas de acceso público.

Teniendo en cuenta que las bases de datos internacionales permiten realizar búsquedas avanzadas y descargar el documento completo en línea, mientras que la base de datos nacional solo permite búsquedas simples y ver el resumen de la solicitud o patente, primero se hicieron búsquedas y recolección de documentos en las bases internacionales y con esta información se hizo una búsqueda dirigida en la base de datos nacional.

En Patentlens se realizaron búsquedas avanzadas de patentes mediante palabras clave dentro de las reivindicaciones; las palabras utilizadas fueron los nombres de los genes y elementos seleccionados como CP4 EPSPS, “bar gene”, CaMV35S, FMV, Gmubi, así como también los términos “glyphosate tolerance”, “phosphinotricin tolerance”, “herbicide tolerance” “constitutive promoter”, “soybean constitutive promoter”. Una vez obtenidas las secuencias, algunas de las mismas patentes y otras del banco de genes, se realizaron búsquedas directamente con las secuencias de DNA y de amino ácidos. Para ello Patentlens tiene una base de datos de secuencias de patentes y solicitudes, que permite realizar búsquedas mediante un algoritmo basado en BLAST. También discrimina si la secuencia está en las reivindicaciones o en el resto del documento. Para este caso, solo se tuvo en cuenta, las secuencias que se encontraron dentro de las reivindicaciones, ya que estas últimas determinan el objeto de protección.

En Patenscope se realizó la búsqueda de solicitudes de patentes que entraron mediante PCT y que tuvieran entre sus países designados Colombia, y Spacenet se utilizó con el fin de recolectar la mayor cantidad de documentos y evitar posibles pérdidas de información. Se recolectaron los documentos que podrían afectar el uso de las secuencias seleccionadas y se realizó su análisis, primero una evaluación preliminar de acuerdo al título y resumen con el fin de dejar únicamente los documentos específicamente relacionados con el objeto de estudio. Posteriormente se realizó una evaluación literal de las reivindicaciones.

Una vez obtenidas las patentes de las secuencias de estudio y teniendo en cuenta que estas corresponden a patentes de otros países, se hizo la búsqueda de sus homólogas en la base de datos colombiana. Esta búsqueda se realizó mediante palabra clave en el campo inventor y/o asignatario, de acuerdo a la información encontrada en las patentes internacionales. También se hicieron búsquedas en esta

base de datos con palabras clave relacionadas con el objeto de estudio, con el fin de obtener toda la información posible.

Una vez seleccionadas las patentes o solicitudes que podrían afectar el uso de estas secuencias en Colombia, se registró su número de expediente y se obtuvo el documento en físico en la oficina de la SIC, con el fin de realizar un análisis del documento completo y de las reivindicaciones. Una vez se determinó el estado de propiedad intelectual para Colombia de las secuencias se inició el diseño de los genes.

## **2.2 Diseño *in silico* de genes semi-sintéticos**

En primer lugar se determinó que elementos o secuencias genéticas se iban a utilizar para cada uno de los constructos, teniendo en cuenta genes cuyo funcionamiento estuviera validado experimentalmente y su estatus de propiedad intelectual para Colombia.

Puesto que la característica de interés “tolerancia a herbicidas” puede ser utilizada como marcador de selección vegetal, y está ampliamente demostrado este tipo de uso en sistemas de transformación genética de soya (Clemente *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2004b; Zeng *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1999), los constructos se diseñaron con la intención de que fueran el único elemento en el T-DNA del vector de transformación, lo que a su vez facilitará el análisis del paquete regulatorio para liberación comercial.

Se diseñaron tres constructos que confieren tolerancia a glifosato y dos tolerancia a glufosinato de amonio. Para los constructos de tolerancia a glifosato se utilizó el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, en combinación con los promotores poliubiquitina de la soya y p35S en su versión simple y duplicada. Para los constructos de tolerancia a glufosinato, se utilizó el gen *bar* de *S. hygrosopicus* en combinación con el promotor FMV y el p35S. Las secuencias de genes,

promotores y terminadores se obtuvieron de los bancos de genes del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) y/o del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), y en algunos casos de patentes.

El vector de transformación seleccionado fue el pCambia 1301, al cual se le eliminó la región correspondiente del gen marcador de selección vegetal y el gen reportero Gus como se explicara en detalle más adelante.

A pesar de que la optimización de secuencias codificantes, es una herramienta utilizada rutinariamente para el desarrollo de versiones modificadas de genes que mejoren la expresión en el organismo huésped, no hay en la literatura una guía metodológica sobre cómo realizar este proceso, y menos aún en los aspectos relacionados con el diseño *in silico* de todo el constructo genético. Por ello, se realizó una revisión actualizada de los programas que podrían utilizarse para el diseño *in silico* de casetes de expresión, y una estrategia para cumplir con ese propósito.

Existen varios programas y plataformas web que pueden ser utilizadas para el diseño de genes sintéticos, entre las que se encuentran Gene Design 3.0 (Richardson 2010) Gene Designer 2.0 (Villalobos 2006), GeMS (Jayaraj *et al.*, 2005), Optimizer (Puigbo *et al.*, 2007), Visual Gene Developer 1.3 (Jung & McDonald, 2011), entre otros. Para el desarrollo de este trabajo se seleccionaron los programas Gene designer 2.0 (Villalobos 2006) y Visual Gene Developer 1.3 (Jung & McDonald, 2011), debido a las herramientas que ofrecen para la optimización de las secuencias, y por ser programas de uso libre.

### **2.2.1 Modificación de la secuencia codificante**

La secuencia del gen *bar* de *S. hygroscopicus* se descargó del EBI (ID X17220), y la del gen *cp4 epsps* de la patente US 5633435 SEQ ID No.9, y se visualizaron con el programa bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). Teniendo en cuenta que las secuencias son de

origen bacteriano, se realizaron las modificaciones correspondientes para que la secuencia de DNA tuviera mayor semejanza a secuencias de soya.

En primer lugar se determinó el ORF de los genes mediante la herramienta ORF Finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>), el resto de la secuencia se eliminó; posteriormente se realizaron cambios silenciosos de la secuencia de los ORF (cambios en la secuencia de nucleótidos que no afectan la proteína esperada) con el fin de modificar el uso codónico y favorecer los codones preferentes de la soya, eliminar sitios de splicing crípticos, señales de poliadenilación prematuras, y remoción de sitios de restricción indeseables. Estos procesos se realizaron con el software Visual Gene Developer (VGD) 1.3 (Jung & McDonald, 2011).

Para la optimización codónica este software tiene un módulo predefinido que está basado en el algoritmo de Monte Carlo, utiliza una tabla de uso codónico para reemplazar los codones originales con otros manteniendo la identidad de los aminoácidos (Jung & McDonald, 2011). Según este algoritmo la escogencia de cada codón es un evento probabilístico independiente, así el software puede iterar la optimización cada vez encontrando una nueva e igualmente buena solución (secuencia de DNA). VGD 1.3 viene con algunas tablas de uso codónico incorporadas, y también permite al usuario descargar o crear sus propias tablas de uso codónico. Para este trabajo se descargó el uso codónico de la soya *Glycine max* (tabla 2-1) de la base de datos kazusa (Nakamura *et al.*, 2000) y se acopló al software.

Para la selección de la secuencia final se tuvieron en cuenta parámetros como CAI, contenido de GC, y Nc, los cuales son proporcionados por el mismo software. Como se mencionó en el marco teórico, no existen reglas fijas sobre cuanto modificar la secuencia. El CAI se dejó en un valor de 0.8 aproximadamente, para el contenido de GC se tuvo como parámetro de referencia el contenido de GC promedio de los genes de la soya reportado en la base de uso codónico Kazusa.

**Tabla 2-1:** Uso codónico de *Glycine max* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Tripleta	Amino ácido	Fracción	Frec. x 1000	No. codones	Tripleta	Amino ácido	Fracción	Frec. x 1000	No. codones
TTT	Phe	0.5	21.2	10493	ATT	Ile	0.46	25.1	12411
TCT	Ser	0.24	18.4	9107	ACT	Thr	0.34	17.1	8490
TAT	Tyr	0.51	15.7	7779	AAT	Asn	0.5	22.4	11088
TGC	Cys	0.5	8	3980	AGT	Ser	0.17	12.6	6237
TTC	Phe	0.5	21.2	10487	ATC	Ile	0.3	16.3	8071
TCC	Ser	0.17	12.9	6409	ACC	Thr	0.28	14.3	7100
TAC	Tyr	0.49	14.9	7367	AAC	Asn	0.5	22.8	11284
TGT	Cys	0.5	8.1	3995	AGC	Ser	0.15	11.3	5594
TTA	Leu	0.1	9.2	4545	ATA	Ile	0.24	12.9	6386
TCA	Ser	0.21	15.6	7712	ACA	Thr	0.29	14.9	7391
TAA	Stop	0.38	0.9	463	AAA	Lys	0.43	26.9	13334
TGA	Stop	0.4	1	480	AGA	Arg	0.31	14.8	7337
TTG	Leu	0.24	22.9	11340	ATG	Met	1	22.7	11218
TCG	Ser	0.06	4.8	2397	ACG	Thr	0.09	4.3	2147
TAG	Stop	0.22	0.5	263	AAG	Lys	0.57	35.9	17797
TGG	Trp	1	13	6412	AGG	Arg	0.28	13.3	6574
CTT	Leu	0.25	23.9	11829	GTT	Val	0.39	26.1	12911
CCT	Pro	0.36	18.9	9358	GCT	Ala	0.38	26.7	13201
CAT	His	0.55	14	6930	GAT	Asp	0.61	32.4	16040
CGT	Arg	0.14	6.6	3291	GGT	Gly	0.3	20.9	10353
CTC	Leu	0.18	17.1	8479	GTC	Val	0.18	11.9	5894
CCC	Pro	0.19	10.1	5010	GCC	Ala	0.23	16.2	8026
CAC	His	0.45	11.6	5759	GAC	Asp	0.39	20.4	10097
CGC	Arg	0.13	6.2	3093	GGC	Gly	0.19	13.4	6650
CTA	Leu	0.09	8.5	4216	GTA	Val	0.11	7.7	3803
CCA	Pro	0.36	19.1	9461	GCA	Ala	0.3	21.4	10577
CAA	Gin	0.56	20.5	10162	GAA	Glu	0.5	33.2	16438
CGA	Arg	0.08	4.1	2018	GGA	Gly	0.32	22.3	11022
CTG	Leu	0.13	12.7	6304	GTG	Val	0.32	21.4	10610
CCG	Pro	0.09	4.7	2312	GCG	Ala	0.09	6.3	3123
CAG	Gin	0.44	16.2	8038	GAG	Glu	0.5	33.2	16426
CGG	Arg	0.06	3.1	1510	GGG	Gly	0.19	13	6431

Puesto que el ORF de un gen heterólogo puede incluir secuencias indeseables como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, secuencias potenciales de

poliadenilación o sitios de splicing críticos, se realizó la búsqueda y eliminación de las mismas. Para ello, el software VGD 1.3 proporciona una función que permite remover tales secuencias sin cambiar la secuencia de aminoácidos resultante.

El algoritmo está basado en una sustitución sinónima similar a la utilizada para la optimización codónica excepto que reemplaza únicamente unos pocos codones con sus correspondientes codones sinónimos en la región de la secuencia blanco que necesita ser modificada (Jung & McDonald, 2011).

De esta manera, se realizó un procedimiento iterativo de eliminación de dichas secuencias hasta obtener una secuencia final sin ninguno de estos elementos, y con los parámetros de CAI y contenido GC deseados.

### 2.2.2 Ensamblaje de las secuencias

Una vez modificadas la secuencias de los genes de interés, se acoplaron con las secuencias promotoras, terminadoras, y péptidos de transito seleccionados. Para los constructos que confieren tolerancia a glifosato, se utilizó el gen *cp4 epsps* optimizado, el péptido de transito de *petunia hybrida* (Della-Cioppa *et al.*, 1986), el promotor Gmubi (Chiera *et al.*, 2007) en un caso, el p35S (Odell *et al.*, 1985) en el otro, y el terminador Nos. También se diseñó un constructo utilizando la versión nativa del gen, el p35S duplicado (Kay *et al.*, 1987), y el terminador Nos.

Para los constructos de tolerancia a fosfotricina, se utilizó el gen *bar* optimizado, con el promotor FMV (Maiti *et al.*, 1997; Sanger *et al.*, 1990) y el terminador E9 en un caso, y en el otro la versión nativa del gen con el promotor y el terminador del CaMV35S (Odell *et al.*, 1985).

El ensamblaje se realizó con el software Gene Designer 2.0 (Villalobos *et al.*, 2006), al finalizar se exporó la secuencia del gen completo a formato FASTA.

Con el fin de seleccionar un grupo de enzimas que no cortaran en ninguna parte de la secuencia del gen ni del vector de transformación, y poder insertar sitios de restricción en los extremos del constructo, se realizó el mapa de restricción de cada una de las secuencias de los genes diseñados y del vector de transformación seleccionado utilizando el software Bioedit 7.2.5. En todos los casos se seleccionaron enzimas que generan extremos cohesivos.

En los extremos del gen se colocaron secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción presentes en el polilinker del vector y que no cortaban en ninguna parte de la secuencia del gen. Los sitios de restricción se insertaron utilizando el software Gene Designer 2.0 (Villalobos *et al.*, 2006). Con este mismo software se verificó que los sitios insertados no corrieran el marco de lectura y al terminar se generó la secuencia final en formato FASTA.

### **2.2.3 Análisis traduccional *in silico***

Como las modificaciones realizadas en la secuencia de DNA son modificaciones silenciosas, la proteína esperada para todos los constructos diseñados debe tener la misma secuencia de aminoácidos reportada en los bancos genéticos, razón por la cual la predicción de la estructura de la proteína solo se realizó a nivel de estructura primaria.

Esta predicción se realizó con dos herramientas diferentes para mayor seguridad, ORF Finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y Genmark (Lomsadze *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó el alineamiento pareado de la secuencia de aminoácidos predicha con la de la proteína esperada, utilizando el algoritmo de Smith-Waterman ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)).

Para los constructos que llevan un péptido de tránsito (constructos con tolerancia a glifosato) se confirmó la presencia del mismo mediante la herramienta CloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>).

Una vez se comprobó *in silico* que cada uno de los genes diseñados produjera la proteína esperada, se generaron formatos FASTA finales de cada secuencia.

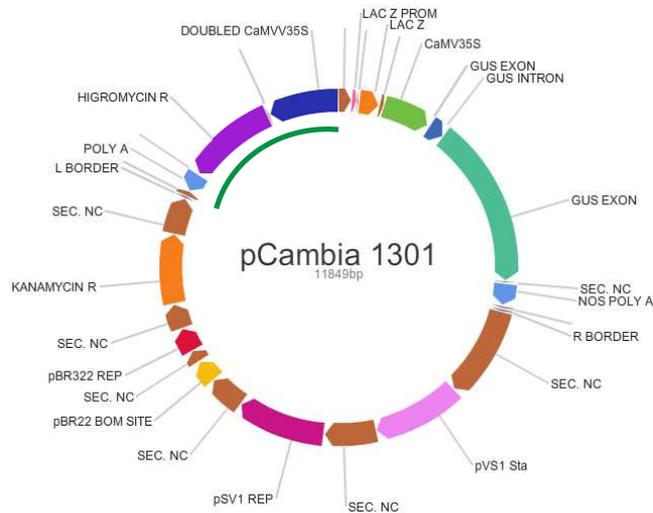
#### **2.2.4 Síntesis de los constructos y clonación en el vector de transformación**

Como el objetivo de este trabajo es utilizar el casete de expresión diseñado como marcador de selección y como gen de interés, se quería utilizar un plásmido que no tuviera ningún otro gen en la zona del T-DNA. Dado que no fue posible obtener directamente dicho plásmido se seleccionó el vector pCAMBIA 1301 (figura 2-1), el cual tiene como marcador de selección el gen de la higromicina y el gen reportero Gus. Se contrató la eliminación del gen de selección vegetal del plásmido, y la síntesis y clonación de cinco constructos génicos (tres que contienen el gen de tolerancia al glifosato y dos con el gen de tolerancia al glufosinato) en dicho vector. Este proceso lo realizó la compañía Shanghai Generay Biotech Co., Ltd. El gen reportero se eliminó en el laboratorio.

Los vectores se recibieron en viales donde la muestra venía liofilizada (4 µg por vial). Fueron resuspendidos en agua tipo molecular libre de nucleasas y quedaron a una concentración final de 200 ng/µl. Se almacenaron a -20°C.

Se realizó el diseño de primers de cada uno de los genes de interés con la herramienta primer 3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)).

**Figura 2-1:** Vector de transformación<sup>1</sup>.



## **2.3 Caracterización molecular de los constructos génicos y transformación de bacterias**

### **2.3.1 Transformación de *Escherichia coli***

Una vez se recibieron los genes sintetizados y clonados en el vector seleccionado, cada plásmido fue clonado en la bacteria *E. coli* cepa DH10B para tener suficiente cantidad para su posterior uso y caracterización. La transformación bacteriana se

---

<sup>1</sup> La línea verde indica la región eliminada del vector correspondiente al gen marcador de selección vegetal. El vector se diagramó con el programa Gene Designer 2.0

realizó mediante electroporación, utilizando en cada caso 30  $\mu\text{l}$  de células electrocompetentes y 1  $\mu\text{l}$  de vector a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{l}$ . Las células sometidas a transformación se sembraron sobre medio LB + kanamicina 50 mg/l, y se dejaron crecer por una noche en incubadora a 37°C. A partir de las colonias que crecieron sobre este medio, se seleccionaron 5 o 6 colonias para efectuar PCR en cada colonia.

Para ello, se picó cada colonia y se diluyó en 10  $\mu\text{l}$  de agua tipo molecular en tubos de PCR, al tiempo que se repicó en medio LB + kanamicina 50mg/l. Se ejecutó una denaturación preliminar del DNA bacteriano a 95°C durante 7 minutos en el termociclador. Posteriormente se adicionó la mix de PCR a cada tubo, cada reacción contenía 2.5  $\mu\text{l}$  de Buffer PCR 10X, 1  $\mu\text{l}$  de cada dNTP 10uM, 1  $\mu\text{l}$  de Mg 50mM, 1.5  $\mu\text{l}$  de cada primer 10  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{l}$  de taq polimerasa, y agua tipo molecular hasta completar 25  $\mu\text{l}$  x reacción. Los tubos se colocaron nuevamente en el termociclador con el siguiente ciclo de temperaturas: Denaturación (95°C 5 min x 1 ciclo), anillamiento (95°C 1 min, 54°C 1.5 min, 72°C 1 min x 30 ciclos), elongación (72 °C 5 min x 1 ciclo).

Como control negativo se utilizó bacteria no transformada, y como control positivo el vector correspondiente en cada caso. Las amplificaciones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó en todos los casos el marcador "1kb plus DNA ladder" de Invitrogen, que permite evaluar el tamaño de fragmentos desde 100 hasta 12000 bp.

Para cada uno de los plásmidos clonados en la bacteria, se seleccionó una de las colonias PCR positivas y se realizó aislamiento de DNA plasmídico utilizando el kit "GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit\*" de Thermo Scientific. El DNA plasmídico obtenido

en la extracción se utilizó para las PCR siguientes, y la transformación de *A. tumefaciens*.

Para comprobar que los genes sintetizados correspondían a los diseñados se hicieron pruebas de PCR para amplificar los genes de interés, digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

### **2.3.2 Eliminación del gen reportero del vector de transformación**

Con el fin de tener un plásmido con la menor cantidad de elementos posibles en el T-DNA y facilitar los procesos regulatorios cuando se obtengan plantas transgénicas, se diseñó una estrategia para eliminar el gen *gus* del vector de transformación. Se seleccionó uno de los plásmidos que contiene el gen de tolerancia a glifosato (denominado E-IGP) y uno con el de tolerancia a glufosinato (denominado Bar-IGP) como plásmidos de trabajo.

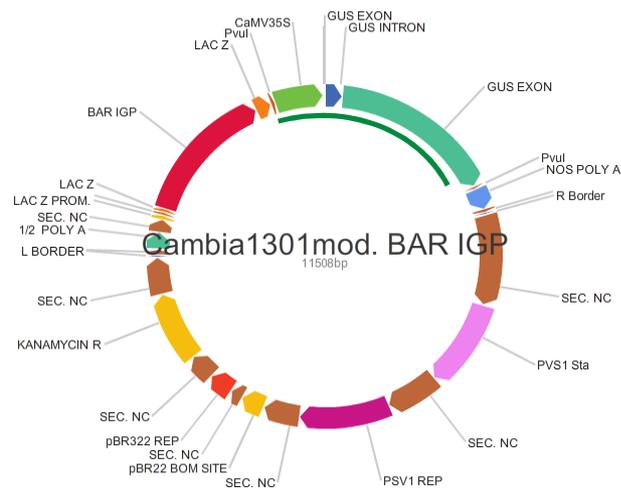
Se generó un mapa de restricción de cada plásmido en Bioedit con el fin de detectar una enzima de restricción que cortara en las regiones circundantes del gen *gus* pero no en otras partes del vector. En total se encontraron 120 enzimas que generaban cortes en la zona de interés, y de ellas se encontraron cuatro enzimas que cumplían con el objetivo:

NruI:	Elimina 1644 bases del gen <i>gus</i>
MfeI:	Elimina el promotor y 340 bases del gen <i>gus</i>
BsrGI:	Elimina 427 bases del gen <i>gus</i>
PvuI:	Elimina todo el promotor y el gen <i>gus</i>

La enzima más adecuada para eliminar el gen *gus* del plásmido es la PvuI, ya que corta todo el gen incluyendo su región promotora (p35S). La figura 2-2 muestra un diagrama del plásmido indicando los sitios de corte de la enzima PvuI y la región a

eliminar. Como esta enzima genera extremos cohesivos, se puede eliminar la región del gen *gus* y volver a unir los extremos del plásmido.

**Figura 2-2:** Diagrama Vector de Transformación<sup>2</sup>.



Las digestiones se realizaron en una reacción de 20  $\mu$ l, utilizando 15  $\mu$ l de agua tipo molecular, 2  $\mu$ l del vector (250ng/  $\mu$ l), 2  $\mu$ l de buffer 1X (10 mM Tris- HCl (pH 8.5 a 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.1mg/ml BSA) y 1  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l) de la enzima. La reacción se colocó en baño de maría a 37°C durante 4 horas.

Los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Para la visualización la muestra se colocó en dos carriles consecutivos del gel, después correr la electroforesis, el gel se dividió longitudinalmente entre los dos carriles, y sólo un carril se expuso a UV; se hizo una

<sup>2</sup> La línea verde corresponde al segmento de 2712 bp eliminado del vector.

muesca en la región correspondiente a la banda de interés, esta muesca se utilizó para ubicar la posición del fragmento en el gel no irradiado.

Para cada plásmido se esperaban dos fragmentos:

Bar-IGP Fragmento 1: 8796 bp - vector y Fragmento 2: 2712 bp - Promotor + gen *gus*; E-IGP Fragmento 1: 10030 bp - vector y Fragmento 2: 2712 bp - Promotor + gen *gus*.

Se cortó cuidadosamente el fragmento correspondiente a la banda de interés (vector sin gen *gus*), y se eluyó el DNA utilizando el kit "QIAquick Gel Extraction" de Qiagen, con el fin de obtener un DNA puro. Se midió la concentración de la muestra en el nanodrof, obteniendo un valor promedio de 27 ng/μl. Hasta este momento se tendría una molécula linear de DNA con los extremos cohesivos generados por la enzima PvuI. Con el fin de re-circularizar el vector se realizó una reacción de ligación con la T4 DNA ligasa de invitrogen, utilizando 15 μl de DNA, 4 μl de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilen glicol-8000) y 1 μl de ligasa (1U/ μl), se incubó a temperatura ambiente toda la noche.

Posteriormente se utilizó 1μl de la reacción de ligación para transformar cepas de *E. coli* DH10B, utilizando la misma metodología de transformación explicada anteriormente. Sobre las bacterias crecidas se realizó una PCR de colonia utilizando primers para los genes de interés (*cp4 epsps* y *bar*). Se realizó aislamiento de DNA plasmídico de una colonia positiva para cada gen y se realizaron pruebas de PCR, digestión con enzimas de restricción específicas y secuenciación con el fin de comprobar que el gen *gus* había sido eliminado exitosamente del plásmido.

Para las pruebas de PCR se utilizaron primers específicos para el gen *gus*; el programa utilizado fue el siguiente: denaturación (94° C 3 min x 1 ciclo), anillamiento (94° C 45 segundos, 57.5° C 30 segundos, 72° C 45 segundos x 30 ciclos), elongación 72° C 5

minutos x 1 ciclo). Como control negativo se utilizó el vector pCAMBIA 1300, el cual no contiene el gen *gus*, como control positivo los vectores E-IGP y Bar-IGP respectivamente. Los plásmidos finales se denominaron E-IGP modificado y Bar-IGP modificado (mod).

Para los perfiles de restricción se seleccionaron enzimas que generarían un patrón diferencial de cortes entre el vector con y sin gen *gus*. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 20 µl, 2 µl de buffer de reacción, 1 µl de enzima y un volumen variable del vector dependiendo del número de bandas esperadas. La reacción se llevó a cabo en baño de maría a 37° C durante cuatro horas. Se determinó la concentración adecuada de agarosa en el gel para visualizar adecuadamente el patrón de bandas esperado (0.8%). La electroforesis se realizó a 100V durante 45 minutos.

Adicionalmente se comprobó la eliminación del gen *gus* mediante secuenciación utilizando primers específicos para las secuencias ubicadas corriente abajo de dicho gen.

Una vez validados estos aspectos, se escogieron los vectores Bar-IGP mod. y E-IGP mod. como vectores de trabajo para evaluar la funcionalidad de los constructos diseñados.

### **2.3.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Se transformaron bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 con los vectores BAR-IGP mod. y E-IGP mod. Las células transformadas se cultivaron en placas de Petri sobre medio LB con kanamicina 50mg/l y se incubaron a 28°C en oscuridad durante tres días. Se realizó PCR a partir de las colonias crecidas con el fin de asegurar que efectivamente porten el plásmido. Las PCR en colonias se hicieron

utilizando la misma metodología mencionada en la transformación de *E-coli*. Una vez confirmada la transformación, las bacterias se dejaron crecer en medio LB líquido y kanamicina 50 mg/l hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0, posteriormente se criopreservaron en glicerol (concentración final 25%) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4 Evaluación de la funcionalidad de los genes**

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los genes se transformó la planta modelo *N. benthamiana* utilizando un protocolo básico de transformación. Previamente se establecieron las concentraciones adecuadas para la utilización de los herbicidas glifosato y glufosinato como agentes de selección. Posteriormente se realizó la caracterización molecular de las plantas putativamente transgénicas mediante pruebas de PCR y se hicieron pruebas de inmunostrip y ELISA para comprobar que se estuviera expresando la proteína esperada. A continuación se detalla cada uno de estos procesos.

### **2.4.1 Curvas de selección con herbicidas para *Nicotiana benthamiana***

Teniendo en cuenta que los genes de interés se utilizaron también como genes marcadores de selección, se realizó una curva de selección para para cada uno de los herbicidas.

- Curva de selección para el herbicida glifosato

Se evaluó el efecto del glifosato sobre la regeneración de explantes de hoja de *N. benthamiana*, utilizando ocho concentraciones diferentes del herbicida glifosato. Para

ello, se utilizaron plántulas in vitro de cuatro semanas de edad, se seleccionaron hojas verdes, evitando tomar hojas muy jóvenes o muy viejas. Se cortaron explantes de 1 cm<sup>2</sup> aprox. evitando los bordes y la nervadura central. Los explantes fueron sembrados sobre el lado adaxial en medio de regeneración (sales MS 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30g/l, BAP 1mg/l, agar PTC 7g/l y pH 5.8) con diferentes concentraciones del herbicida: 0 (control), 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 µM. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo a lo reportado para la especie cercana *N. tabacum* (Akbarzadeh *et al.*, 2010; Roudsari *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2011)

El herbicida fue adicionado antes de ajustar el pH en la concentración indicada para cada tratamiento, se utilizó glifosato (N-(Phosphonomethyl)glycine) para cultivo de tejidos de PhytoTechnology. El medio se esterilizó en autoclave, y la hormona se adicionó posteriormente en cámara de flujo laminar. Se sembraron 35 explantes por tratamiento (7 cajas, 5 explantes por caja) y se colocaron en cuarto de crecimiento a 28°C y un fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad. Se midió el porcentaje de regeneración de cada tratamiento, como número de explantes que regeneraron sobre número de explantes totales por cien.

- Curva de selección para el herbicida glufosinato de amonio

Se evaluó el efecto de la PPT, agente activo del herbicida glufosinato de amonio, sobre la regeneración de explantes de hoja de *N. benthamiana*, utilizando ocho concentraciones diferentes de PPT: 0 (control), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 3, 5, y 7 mg/l. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo a lo reportado para la especie cercana *N. tabacum* (Almeida *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006; Kutty *et al.*, 2011; Lutz *et al.*, 2001)

Se utilizó PPT para cultivo de tejidos de PhytoTechnology. La metodología fue la misma que para la curva de selección del glifosato a excepción que la PPT fue adicionada en cámara de flujo laminar después de esterilizar en autoclave el medio de cultivo.

#### **2.4.2 Transformación de *Nicotiana benthamiana***

- Transformación de *Nicotiana benthamiana* con el gen *cp4 epsps*

Se usaron explantes de hoja de *N. benthamiana* y se cocultivaron con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* previamente transformada con el vector E-IGP mod. siguiendo la siguiente metodología:

*Inducción de la bacteria:* Se colocaron 10 ml de medio LB líquido estéril en un tubo de 50 ml, con 500 µl de sacarosa 10% y 10 µl de kanamicina (stock 50 mg/ml). Se adicionó un inóculo de 20 µl de la cepa bacteriana conservada a -80°C. Se incubó toda la noche a 28°C y 150 rpm. Al día siguiente se centrifugó el crecimiento bacteriano a 3000 rpm durante 6 minutos, se resuspendió en 20 ml de medio LB líquido, 1000 µl de glucosa 10%, 20 µl de kanamicina (stock 50 mg/ml), y 20 µl de acetosiringona (stock 20 mg/ml). Se incubó toda la noche a 28°C y 150 rpm. Al día siguiente se verificó la densidad óptica del inóculo a 600 nm, y se usó el cultivo cuando la lectura de absorbancia estaba entre 0.7 y 1.0, momento en el que la bacteria está lista para ser utilizada en la transformación.

*Transformación y cocultivo:* Se tomaron hojas de tabaco grandes de color verde y se cortaron explantes de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, sin bordes ni la nervadura central. Los explantes se cocultivaron con la bacteria y se agitaron suavemente durante 2

minutos. Posteriormente se secaron sobre una toalla de papel estéril y se sembraron sobre medio de regeneración con acetosiringona 200  $\mu$ M. Se dejaron 2 días en este medio a 28°C y en condiciones oscuridad.

Selección: Los explantes se lavaron en medio de regeneración líquido con una agitación de 100 rpm a temperatura ambiente durante media hora tres veces. En el segundo y tercer lavado se adiciono el antibiótico cefotaxima 400mg/l al medio de lavado. Posteriormente los explantes se secaron muy bien con toallas de papel estériles y se sembraron en medio de selección (medio de regeneración, cefotaxima 400 mg/l y glifosato 25  $\mu$ M). Se dejaron en cuarto de crecimiento a 28°C fotoperíodo 16/8, realizando cambio de medio cada 2 semanas.

En cada experimento de transformación se sembró un control absoluto (explantes sin transformar sobre medio de regeneración) y un control negativo (explantes sin transformar sobre medio de selección).

Una vez empezaron a aparecer regenerantes, se sembraron en medio de elongación (sales MS 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30g/l, Gelzan 2.5g/l y cefotaxima 400mg/).

La evaluación de transformantes se realizó mediante pruebas de PCR. Para ello se utilizó el producto "KAPA3G PCR kit" de Kapabyosystems, que permite hacer las pruebas directamente sobre tejido vegetal. Las condiciones de PCR se estandarizaron efectuando gradientes de temperatura. El programa utilizado fue el siguiente: denaturación (95°C 3 min x 1 ciclo), anillamiento (95°C 20 segundos, 56.8°C 15 segundos, 72°C 30 segundos x 35 ciclos), elongación 72°C 30 segundos x 1 ciclo). Se utilizaron los primers específicos para el gen *cp4 epsps*. Como control negativo se utilizó una planta no transformada y como control positivo el vector. Los productos de

amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

- Transformación de *Nicotiana benthamiana* con el gen *bar*

Se transformaron explantes de hoja de *N. benthamiana* con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* previamente transformada con el vector Bar-IGP mod., utilizando la misma metodología que para la transformación con el gen *cp4 epsps* que confiere tolerancia a glifosato, con la excepción que se utilizó como agente de selección PPT en dos concentraciones, 0.8mg/l y 3 mg/l.

La evaluación de transformantes se realizó mediante PCR con el producto “KAPA3G PCR kit”, utilizando el mismo programa que para los transformantes de glifosato, a excepción que la temperatura de anillamiento utilizada en este caso fue de 66°C.

### **2.4.3 Evaluación de la funcionalidad de los genes**

Con el fin de evaluar la expresión, se hicieron pruebas inmunológicas sobre plantas PCR positivas. Para las plantas PCR positivas para el gen *cp4 epsps* se realizaron pruebas de ELISA cualitativas, con el Kit Pathoscreen™ Agdia para detección de la proteína CP4:EPSPS. La prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando como control negativo una planta no transformada, y como control positivo la proteína CP4:EPSPS que viene con el kit.

Para las plantas PCR positivas para el gen *bar* se realizó RT PCR, con el fin de determinar si el gen se transcribe. Para ello se realizó extracción de RNA a partir de hojas, utilizando el Kit RNA/DNA/protein purification de Norgen biotek corp. Se visualizó el RNA aislado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y tinción con

bromuro de etidio y se midió la concentración del mismo en el nanodrop. Se realizó una limpieza de la muestra con el fin de eliminar cualquier posible contaminación con DNA, utilizando el kit DNaseI RNA free de ThermoScientific. Este proceso se realizó en una reacción con las siguientes cantidades: 1 µg de RNA, 1µl de buffer de reacción 10X (100 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>), 1µl de la enzima DNaseI(1U/µl), y se llevó a un volumen final de 10µl con agua tratada con DEPC. El proceso se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente se comprobó que no quedaran remanentes de DNA, realizando una PCR de la muestra con primers específicos para el gen *bar* (primers BAR-IGP). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: Denaturación (95°C 5 min x 1 ciclo), anillamiento (95°C 1 min, 57°C 1.5 min, 72°C 1 min x 30 ciclos), elongación (72 °C 5 min x 1 ciclo). Como control positivo de la prueba se utilizó DNA aislado de una planta PCR positiva para este gen. La amplificación se visualizó y una vez se comprobó que no había DNA en la muestra se realizó síntesis de cDNA.

Para ello se utilizó el kit “First Strand cDNA synthesis” de Thermo Scientific, en una reacción con los siguientes componentes: 1 µg de RNA, 1 µl de primers oligoDT (100µM). Estos fueron incubados a 65°C durante cinco minutos y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: 4µl de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1µl de RiboLock inhibidor de RNasa (20u/µl), 2µl de dNTP mix (10mM), y 2µl de M-MuLV transcriptasa reversa (20u/µl). La reacción se realizó de acuerdo a las especificaciones del producto.

Posteriormente se realizó una prueba de PCR sobre el cDNA obtenido, utilizando primers específicos para el gen *bar*, y el mismo programa de PCR especificado anteriormente. La amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.



## **3. Resultados y discusión**

### **3.1 Análisis de propiedad Intelectual de las secuencias utilizadas para el diseño de genes**

Con el objetivo de que los genes diseñados cumplan con el concepto de libertad de operación para Colombia, se buscaron las patentes que afectan el uso de las secuencias de interés, se hizo el seguimiento de las mismas y se determinó si fueron presentadas y aprobadas en Colombia. A continuación se describe el estado de propiedad intelectual de cada una de las secuencias seleccionadas para el diseño de genes semi-sintéticos, la tabla 3-1 muestra un resumen de los resultados obtenidos.

#### **3.1.1 Secuencias promotoras**

Se determinó el estado de propiedad intelectual para Colombia de los promotores FMV, CaMV35S, y Gmubi.

- **Promotor FMV**

Se encontraron 3 patentes principales relacionadas con el uso de este promotor, todas ellas son patentes estadounidenses: US 5378619 (Rogers, 1995), US 5994521 (Maiti & Shepherd 1999) y US6051753 A (Comai *et al.*, 2000).

Tabla 3-1: Listado de las patentes más importantes relacionadas con las secuencias de estudio

Elemento	Solicitudes / Patentes relacionadas	Título/Objeto de Protección	Emp.	Año Exp.	S.col.
Promotor FMV	US 5378619	<b>Promoter for transgenic plants:</b> El uso de la secuencia del promotor, la utilización de esté en constructos quiméricos y en vectores de transformación.	MO	2013	No
	US5994521	<b>Full length transcript (Flt) promoter from figwort mosaic caulimovirus (FMV) and use to express chimeric genes in plant cells:</b> El uso de la secuencia, el plásmido y un vector que contienen la longitud total del transcripto del promotor más una o dos regiones amplificadoras.	K. U	2016	No
Promotor CaMV35S	US 5352605 US 5530196	<b>Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters:</b> El uso del CaMV35S y/o CaMV19S como parte de constructos genéticos, dirigiendo la expresión heteróloga de genes en células vegetales y en vectores de transformación para plantas. La utilización de dichos constructos en plantas dicotiledóneas.	MO	2013	No
Promotor CaMV35S duplicado	US5196525 US5164316	<b>DNA construct for enhancing the efficiency of transcription:</b> Se especifica la localización del enhancer del CaMV35S y definen el constructo como una región química para la iniciación de la transcripción. Especifican que cuando la secuencia nucleotídica es transcrita sobre el control de este promotor, se aumenta el producto de transcripción comparado con la secuencia del promotor único	MO	2011	No
Promotor Gmubi	US 5322938	<b>DNA construct for enhancing the efficiency of transcription:</b> Un constructo de ADN que contenga un enhancer duplicado del CaMV35S, una región promotora, un gen de interés, y una región terminadora. Células vegetales que porten dicho constructo.	BR. U	2011	No
	WO200814076 6A2 US8395021B2	<b>Highly Active Soybean Promoters and Uses Thereof:</b> El uso de las secuencias de varios promotores aislados de soya, entre ellos el Gmubi el uso del promotor unido a otras secuencias reguladoras, a ácidos nucleicos que codifiquen para genes de selección, reporteros y proteínas que confieran resistencia a diferentes plagas estrés abiótico, entre otras; la inclusión de estas secuencias en constructos genéticos, en vectores su utilización para producir plantas transgénicas, y los productos derivados de las mismas.	OHIO U	2028	No
Gen Cp4 EPSPS	WO92/04449 US5633435 US5627061	<b>Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-phosphate synthases:</b> La secuencia del gen, su utilización en constructos para transformación genética, constructos con las secuencias promotoras, terminadoras y péptidos de tránsito que especifican en la patente; proceso para producir plantas tolerantes a glifosato mediante el uso de este gen en diferentes cultivos; método para controlar malezas; uso de otras EPSPS de clase II descubiertas en el mismo estudio.	MO	2014	No

Tabla 3-1: Continuación

Elemento	Solicitudes / Patentes relacionadas	Título/Objeto de Protección	Emp.	Año Exp.	S.col.
Gen CP4 EPSPS	WO06/130436	Soybean event MON89788 and methods for detection thereof: Evento Mon89788, que es una planta de soja con tolerancia a glifosato, protegen el constructo utilizado, secuencias flanqueantes del sitio de inserción, método para detectar molecularmente este evento, semillas y los elementos derivados del mismo.	MO	2026	Si
	US7632985				
	US8053184				
	US7608761				
	US7608761	Method for disease control in MON89788 soybean: El método de control de enfermedades del evento MON89788 causadas por patógenos, en el que se utiliza glifosato	MO	2026	No
	Solicitud colombiana	Evento mon89788 de soja y métodos para detección del mismo: El evento Mon89788, que es una planta de soja con tolerancia a glifosato, protegen el constructo utilizado, las secuencias flanqueantes del sitio de inserción	MO		Si
	Solicitud colombiana	Elementos reguladores del gen factor de iniciación de la traducción eucariótico para uso en plantas: Promotores y elementos reguladores aislados de <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>A. Thaliana</i> , y <i>Medicago truncata</i> útiles para modular la expresión transgénica, y el uso de los mismos dentro de constructos que confieran tolerancia a herbicidas	MO		Si
Gen BAR	US 5561236	Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors: Células vegetales transformadas con el gen que codifica para la acetil transferasa con la capacidad de inactivar inhibidores de la glutamina sintasa. En las divisiones de la patente principal se protegen además el proceso de producción de plantas tolerantes a PPT o a cualquier compuesto que tenga alguna fracción de PPT mediante procesos de integración del gen bar de <i>S. hygrosopicus</i> o <i>S. viridochromogenes</i> en el genoma de células vegetales; Vectores de transformación genética que comprendan el gen bar; modificaciones en la secuencia de nucleótidos o a.a del gen.	Bayer	2013	No
	US5646024				
	US 5648477				
	US 7112665				
Péptido de tránsito de <i>Petunia hybrida</i>	US 5633435	Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthases: El uso de péptido de tránsito dentro de una secuencia que incluye un promotor, una secuencia que codifica para una EPSPS y una región terminadora	MO	2014	No
	USRE039247E1				
Vector Pcambia	US6641996B1	Microbial beta-glucuronidase genes, gene products and uses thereof: El uso de vectores pCAMBIA que contengan el casete gus plus	CA	2019	No
	US7176006B2				
	US 7148407				

Abreviaturas utilizadas:

Emp.: Empresa Año Exp Año Expiración, S. Col. Solicitada en Colombia, MO:Monsanto, K.U: Kentucky University, BR.U: British University, CA: Cambia

La patente US 5378619 (Rogers, 1995) se relaciona con el descubrimiento que la longitud total del promotor del FMV funciona como un fuerte, y uniforme promotor para genes quiméricos insertados en células vegetales; la planta transformada utilizando un gen dirigido por este promotor expresa la proteína en un nivel más alto y uniforme en todos los tejidos y células, a comparación del mismo gen dirigido por los promotores CaMV35S y el CaMV35S duplicado. La secuencia del promotor está localizada entre los nucleótidos 6368 y 6930 del FMV (SEQ ID NO.11 de la patente). Se protege el uso de la secuencia del promotor, y su utilización en casetes de expresión y en vectores de transformación.

En esta patente también aclara las posibles secuencias líder 5' a utilizar para el buen funcionamiento de este promotor. Sugieren el uso de las secuencias líderes 5' no traducidas (5'UTRs) de petunia HSP70 (SEQ ID: 1, 2, 3, y 4), Soya HSP17.9 (SEQ ID: 5 y 6) y maíz HSP70 (SEQ ID 7, 8 9 y 10), como parte del promotor, y del constructo génico y del vector generado.

Esta patente está asignada en las siguientes jurisdicciones: Austria (AT 196318 T), Australia (AU 626473 B2, AU 1990/065588 A), Canadá (CA 2028903 A1, CA 2028903 C),Alemania (DE 69033628 D1, DE 69033628 T2), Dinamarca (DK 0426641 T3), Unión Europea (EP 0426641 A2 EP 0426641 A3, EP 0426641 B1), España (ES 2150900 T3), Grecia (GR 3034680 T3), Israel (IL 96176 D0), Japón (JP 3198781 A), Nueva Zelandia (NZ 235887 A), Estados Unidos (US 5378619 A, US 6018100 A), y Sudáfrica (ZA 9008699 A).

La patente US 5994521 (Maiti & Shepherd, 1999), protege el uso de la secuencia, y un vector que contiene el promotor más una o dos regiones amplificadoras, que aumentan la expresión del gen heterólogo presente en el constructo. Esta patente entró por PCT en 1998, fue solicitada y aprobada para Australia, Canadá, la Unión Europea y Estados Unidos.

La patente US 6051753 A (Comai *et al.*, 2000) protege un constructo que contiene un promotor FMV diferente al mencionado en las patentes anteriores, es un promotor que por ser de un tamaño menor lo han denominado FMV 34S. Esta patente sólo se encontró para Estados Unidos.

El uso del promotor FMV requiere la utilización de una secuencia líder 5' no traducida. Las secuencias líderes por definición están localizadas en el extremo 5' del mRNA y no son traducidas. También pueden ser definidas como la porción de la molécula de mRNA que se extiende desde el capuchón 5' hasta el codón de iniciación AUG de la proteína (Austin, 1994). Esta región del mRNA juega un rol crucial en la iniciación de la traducción y en la regulación de la expresión génica. Para el diseño del gen con tolerancia a glufosinato de amonio se utilizó la secuencia líder 5' no traducida de la proteína HSP17.9 de la soya. Las patentes relacionadas con el uso de esta secuencia son: US 5362865 (Austin, 1994) y US 5659122 (Austin, 1997), US 5378619 (Rogers, 1995).

Las patentes US 5362865 (Austin, 1994) y US 5659122 (Austin, 1997) protegen moléculas de DNA que comprenden secuencias líderes 5' no traducidas derivadas de genes de plantas que codifican para proteínas de choque térmico (petunia HSP70, Soya HSP17.9 y maíz HSP70), las cuales aumentan la expresión cuando se incluyen dentro de genes quiméricos). Estas patentes protegen constructos génicos generales donde se utilicen estas secuencias, y el uso como método para aumentar la expresión de genes quiméricos. Ninguna de las dos fue solicitada para Colombia.

En la US 5378619 (Rogers, 1995) también se protege el uso del promotor FMV unido a cualquier secuencia líder 5' no traducida heteróloga con respecto a FMV (reivindicación 3), sin embargo, como se mencionó en la sección precedente esta patente no fue solicitada para Colombia.

La búsqueda en la base de datos nacional arrojó 94 patentes publicadas para regiones promotoras y 24 solicitudes, ninguna de las cuales corresponde a este promotor.

Como se mencionó en el marco teórico para la concesión de una patente se evalúan tres criterios fundamentales, uno de los cuales es la novedad de la invención. Según el artículo 16 de la decisión 486 (CAN, 2000) una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica, éste comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente. Teniendo en cuenta este criterio, si estas patentes no se solicitaron para Colombia en el momento que eran una invención novedosa, actualmente si se llegasen a solicitar no pasarían el examen de patentabilidad, por lo tanto se concluye que no están protegidas por derechos de propiedad intelectual en Colombia.

- Promotor CaMV35S

Se encontraron varias patentes relacionadas con el uso del promotor CaMV35S y 19S, una principal y varias continuaciones de la misma. La patente más antigua es la US 5352605 (Fraley *et al.*, 1994) de la compañía Monsanto. En esta patente se protege el uso de los dos promotores CaMV35S y 19S como parte de casetes de expresión, dirigiendo la expresión heteróloga de genes en células vegetales y en vectores de transformación para plantas. La patente US 5530196 (Fraley *et al.*, 1996) es una continuación de la anterior, en la que protegen la utilización de dichos constructos en plantas dicotiledóneas.

La patente US 5858742 (Fraley *et al.*, 1999) es una continuación de la anterior en la que se protege el método de transformación de una célula vegetal utilizando constructos quiméricos donde se utilicen los promotores CaMV35S o 19S. La US

6255560 (Fraley *et al.*, 2001) es una continuación de la anterior en la que básicamente se protege el uso de los promotores CaMV35S y 19S en constructos génicos que dirijan la expresión de genes de resistencia a antibióticos como kanamicina, los mismos constructos en plásmidos de transformación intermedios y plantas dicotiledóneas que porten dichos constructos .

Estas patentes tienen sus homologas en Austria AT61406T, Brasil BR1101069 A, Alemania DE3484215 D1, Unión europea (varias versiones) EP0131623 A1/A4/B1/B2, y Japón JP6315381A, JP2645217 B2, JP 7014349 B, JP S60500796 A.

En la búsqueda en la bases de datos colombiana no se encontró ninguna patente ni solicitud relacionada; en las solicitudes que ingresan por medio de PCT relacionadas con las palabras clave , promotores constitutivos + planta, se encontraron 59 registros, sólo uno de ellos aparentemente relacionado, la solicitud WO/2001/032897 (Groenewald & Botha, 2001) En ésta se solicita proteger un promotor que incluye un segmento del CaMV35S y uno del promotor del gen de la ubiquitina del Maíz; dentro de los países designados no incluyen Colombia. En la búsqueda relacionada con promotores constitutivos de origen viral, se encontraron ocho registros, ninguno de los cuales corresponde al promotor de interés. Aunque la mayoría de las patentes relacionadas con el uso del promotor CaMV35S ya expiraron o están próximas a expirar, es importante anotar que ninguna de estas patentes fue solicitada para Colombia.

- Promotor Gmubi

En la búsqueda de solicitudes que entraron por PCT relacionadas con promotores constitutivos se encontraron 42 registros, ninguno de los cuales está relacionado con los promotores de interés. En la búsqueda de solicitudes relacionadas con promotores de genes de soya se encontraron 22 registros en total, de los cuales tres

corresponden a promotores constitutivos. De ellas la única relacionada con el objeto de estudio es la solicitud WO2008140766 A2 (Finer & Bouchard, 2008), la cual solicita la protección del uso del promotor Gmubi, fue realizada por la Universidad de OHIO a través de PCT en mayo 8 del 2008, incluyendo 110 países designados entre los cuales se encuentra Colombia. Esta solicitud consta de 27 reivindicaciones, 19 de las cuales se relacionan con el uso de estas secuencias promotoras, y las 8 restantes con las metodologías de evaluación de promotores utilizando el sistema de captura de imágenes y el modelo de transformación transitoria de cotiledones de frijol lima. Para este caso interesan las primeras reivindicaciones.

En resumen se solicitó proteger el uso de las secuencias de varios promotores aislados de soya, entre ellos el Gmubi asociado al intrón del gen *Gmubi* y sin el mismo SEQ ID:1 y 3, el uso del promotor unido a otras secuencias reguladoras, a ácidos nucleicos que codifiquen para genes de selección, genes reporteros, enzimas, genes que confieran resistencia a insectos, hongos, bacterias, virus o nematodos, secuencias de nucleótidos o proteínas que medien la resistencia en plantas a sequía, frío, calor, sal, un inhibidor, lecitina, ARNasas, ribozimas, anticuerpos, vacunas, fármacos, proteínas, anti-congelantes, citocromo p-450, activadores o represores de la transcripción y proteínas involucradas en la biosíntesis de químicos finos; así como también, la inclusión de estas secuencias en constructos genéticos, en vectores su utilización para producir plantas transgénicas, y los productos derivados.

La solicitud US 2010/0186119 A1 (Finer & Bouchard, 2010) para Estados Unidos, amplió las reivindicaciones a 65. Fue aprobada la solicitud US 8395021 B2 (Finer & Bouchard, 2013) para Estados Unidos una versión reducida con diez reivindicaciones, en la que se protege la secuencia del promotor Gmubi en construcciones génicas.

La búsqueda de patentes relacionadas con el uso de este promotor en las bases de datos internacionales muestra las solicitudes mencionadas, indicando que la fase nacional de esta solicitud solo fue gestionada para Estados Unidos. Hay que tener en

cuenta que cuando una solicitud es gestionada mediante PCT, para entrar a fase nacional se tiene un tiempo máximo de 31 meses ([http://www.wipo.int/pct/en/texts/time\\_limits.html](http://www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html)). Según la fecha de solicitud sí se hubiera solicitado la fase nacional en Colombia, tendría que haberse realizado antes del 8 de enero del 2011, por consiguiente como no se encontró ningún registro relacionado en las patentes y solicitudes de la base de datos nacional, se concluye que este promotor puede estar libre de patentes en el país.

### 3.1.2 Secuencias codificantes

- Patentes relacionadas con el gen *bar*

Las patentes del gen *bar* están asignadas a Plant Genetic Systems, N.V. , (empresa que fue adquirida en 2002 por Bayer CropScience) y Biogen Inc,. La solicitud de patente para el gen *bar* fue presentada por PCT con el número WO1987/005629 (Leemans *et al.*, 1987), siendo los estados designados, Australia, Benín, Brasil, República Centroafricana, Congo, Camerún, Dinamarca, Finlandia, Gabón, Hungría, Japón, República de Corea, Malí, Mauritana, Noruega, Senegal, Chad, Togo, y Estados Unidos. Las patentes estadounidenses relacionadas con esta solicitud son las patentes No. US 5561236 (Leemans *et al.*, 1996), US 5646024 (Leemans *et al.*, 1997a), y US 5648477 (Leemans *et al.*, 1997b).

La patente US 5561236 (Leemans *et al.*, 1996), protege células de plantas transgénicas que contengan un fragmento heterólogo de DNA que codifique una proteína con actividad acetil transferasa, especifican la secuencia de DNA y de aminoácidos correspondiente al gen *bar*. En la patente US 5646024 (Leemans *et al.*,

1997a) se protege el proceso para la producción de células vegetales tolerantes o resistentes a la actividad herbicida de inhibidores de la glutamina sintetasa incluyendo la PPT o un compuesto con fracciones del mismo, se especifican las secuencias de genes aislados de *Streptomyces* sp., lo cual incluye *Streptomyces hygroscopicus* (gen *bar*) y *Streptomyces viridochromogenes* (gen *pat*). En la patente US5648477 (Leemans *et al.*, 1997b), específicamente se protege un vector que contiene un fragmento de DNA foráneo capaz de inactivar un inhibidor de la enzima glutamina sintetasa mediante acetilación, siendo este fragmento el gen *bar* o el *pat*.

Estas patentes están relacionadas con sus homologas en diferentes países, como lo son: Austria AT 57390 y AT 82323, Alemania DE 3765449, y DE 3782526 T2, España ES 2052588 T3, Europa EP 242236 B2, Hungría HU 213580 B, Portugal PT 84448 B; Australia AU 612570 B2, Japón JP 3142848 B2, y Sudáfrica ZA 8701754. Colombia no estaba entre los países designados para la solicitud de PCT, ni la patente fue solicitada directamente en el país.

La última patente concedida en relación a estos genes es la número US 7112665 (Leemans *et al.*, 2006) que es una segmentación de la US 5561236, en la que se amplía la protección del gen *bar*, a cualquier cambio posible en la secuencia de DNA que pueda producir un polipéptido con las mismas propiedades para generar resistencia a Bialaphos (modificación de uso codónico). Esta patente expira en el año 2023 y no fue solicitada para Colombia.

La búsqueda de patentes en la base de datos nacional no arrojó ninguna solicitud de patente, ni patente relacionada con este gen. Hasta agosto del 2012 la compañía Bayer CropScience tenía 46 patentes asignadas en Colombia ninguna de las cuales está relacionada con el uso de estas secuencias. Para las compañías Plant Genetic Systems y Biogen Inc, no se encontró ninguna patente ni solicitud de patente, por lo

tanto se concluye que la secuencia del gen *bar* no está protegida por derechos de propiedad intelectual en el país.

- Gen *cp4 epsps*

Para el gen *cp4 epsps* se encontraron dos familias de patentes asociadas directamente con el uso de la secuencia de este gen. La primera familia está compuesta por las patentes que tienen como título “Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthases” del grupo Monsanto. Esta fue la patente donde se registró el descubrimiento del gen y sus posibles usos; corresponde a las solicitudes y patentes estadounidenses: WO92/04449 A1 (Barry *et al.*, 1992) US 5627061 (Barry *et al.*, 1997b), US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a), US 5804425 (Barry *et al.*, 1998), US RE39247 E1 (Barry *et al.*, 2006), US 6248876 (Barry *et al.*, 2001), (se mencionan únicamente las de USA, aunque está también patentado en otros países). Ninguna de estas patentes fue solicitada para Colombia.

La segunda familia corresponde a las patentes que llevan por título “Soybean event MON89788 and methods for detection thereof”, la cual fue solicitada por PCT con el número WO06/130436 A2 (Malven *et al.*, 2006), y corresponde a las patentes US 7632985 (Malven *et al.*, 2009), US 7608761 (Baley *et al.*, 2009) y US 8053184 B2 (Malven *et al.*, 2011) de Estados Unidos. En este grupo se patenta un evento de transgénesis en soya, que confiere resistencia a glifosato, y hace mención del uso de la secuencia del gen *cp4 epsps* para este efecto.

La solicitud internacional fue presentada para 101 países, entre los cuales está Colombia. Entró a fase nacional el 27 de diciembre del 2007 con el número de expediente 7136194 (Malven *et al.*, 2007). El expediente es titulado “EVENTO MON89788 DE SOYA Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DEL MISMO”, solicitado por

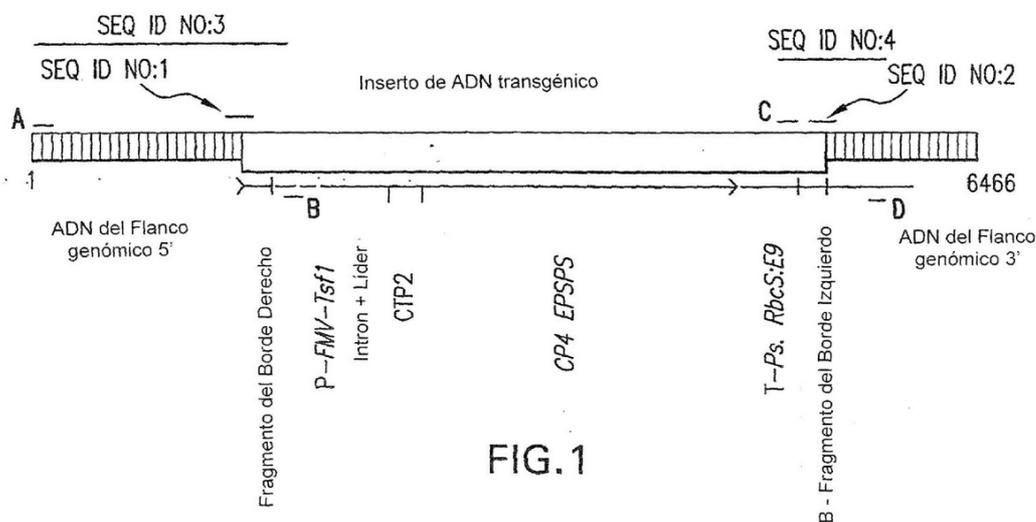
Monsanto Technology LLC. Esta patente fue aprobada el 26 de noviembre del 2012 según la resolución 71489 de la misma fecha.

Se realizó un análisis literal de las reivindicaciones para determinar la posibilidad que esta patente afecte el uso del gen *cp4 epsps* en Colombia. En este caso aprobaron siete reivindicaciones, las cuales se detallan a continuación.

La reivindicación 1 protege una molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias SEQ ID Nos 1, 2, 3, 4 o 9.

La figura 3-1 es un esquema del constructo del evento MON89788, tomado de la patente, donde están señaladas las secuencias 1,2,3 y 4 que mencionan en las reivindicaciones.

**Figura 3-1:** Esquema componentes del evento MON89788 de soya (Malven *et al.*, 2007).



**FIG. 1**

Las secuencias 1 y 2 son primers, las secuencias 3 y 4 corresponden a regiones 5' y 3' que flanquean el inserto, y la secuencia 9 aunque no está señalada, corresponde a las 6466 bp que están graficadas. Estos 6466 bp incluyen los flancos genómicos 5' y 3'

los fragmentos de los bordes derecho e izquierdo del transgen, y el constructo del evento compuesto por: un promotor quimérico obtenido a partir del promotor FMV y el promotor del factor de elongación EF-1 Alfa de *Arabidopsis thaliana* (*tsf1*), la secuencia líder (UTR 5') y el intrón del mismo, unido al péptido de tránsito de *A. thaliana*, el gen *cp4 epsps*, y el terminador de la subunidad pequeña de la Rubisco (gen *E9*) de *P. sativum*.

Puesto que en esta reivindicación se protegen las 6466 bp, la violación del derecho de propiedad intelectual necesariamente incluiría el uso de un constructo idéntico al mencionado en el que se utilicen las mismas secuencias promotoras y terminadoras, y donde en la planta transgénica producida, el inserto se localice en el punto exacto del genoma en el que está el evento MON 89788.

Para este caso particular se utilizará el gen *cp4 epsps* en combinación con elementos reguladores diferentes a los mencionados, por lo cual no se estaría violando ningún derecho de propiedad intelectual.

Las reivindicaciones 2 y 3 se relacionan con el uso de primers que comprendan al menos 11 nucleótidos contiguos iguales o complementarios a los de las secuencias 3 y 4, y que produzcan un amplicón diagnóstico del evento MON89788 definido por la secuencias 1, 2, 3, 4 y 9. Las reivindicaciones 4, 5, 6 y 7 protegen un método para detectar la presencia de DNA correspondiente al evento MON89788, en el cual se debe colocar la muestra de ADN de soya, en presencia de los primers especificados, y obtener un amplicón diagnóstico para el evento MON89788. Estas reivindicaciones no aplican para este trabajo puesto que no se intentara diagnosticar dicho evento.

También se encontró otra de patente colombiana relacionada con el gen *cp4 epsps*, corresponde al expediente 726332 titulado "ELEMENTOS REGULADORES DEL GEN FACTOR DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EUCARIÓTICO PARA USO EN PLANTAS" de Monsanto Technology LLC. Esta patente fue aprobada el 24 de agosto del 2012,

según la resolución 50037. Esta invención provee promotores y elementos reguladores aislados de *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, y *Medicago truncatula* útiles para modular la expresión transgénica.

Solicitaron patentar 14 reivindicaciones, aprobaron las reivindicaciones 1-4 y 11-14. Las reivindicaciones que podrían afectar el uso de los genes de interés son las siguientes:

1. Un constructo polinucleotídico que comprende un polinucleótido que tiene actividad regulatoria génica que comprende la SEQ ID NO. 1 o un complemento de longitud total del mismo enlazado funcionalmente a una molécula heteróloga polinucleotídica transcribible.
2. El constructo polinucleotídico de la reivindicación 1, en donde dicha molécula polinucleotídica es un gen de interés agronómico.
3. El constructo polinucleotídico de la reivindicación 1, en donde dicha molécula polinucleotídica transcribible es un gen de tolerancia a herbicida.
4. El constructo polinucleotídico de la reivindicación 3, en donde dicho gen de tolerancia a herbicida se selecciona del grupo conformado por genes que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, EPSPS resistente a glifosato, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, delapon dehalogenasa, nitrilasa resistente al bromoxinil, antranilato sintasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato N-acetil transferasa.

En este caso se está protegiendo el uso de los genes que codifican para las enzimas EPSPS y PAT unidos a la SEQ No. 1 la cual es un elemento regulador de *N. tabacum*, *A. thaliana*, y *M. truncatula*. En el caso del presente trabajo, se utilizarán estos genes asociados a elementos reguladores diferentes a los de la SEQ No. 1, por lo tanto no se viola el derecho de propiedad intelectual otorgado por esta patente.

Las reivindicaciones 11-14, se refieren al método de control de malezas, aplicando glifosato sobre un campo de plantas de cultivo transgénicas tolerantes a glifosato, donde estas plantas son transformadas con el constructo descrito en la reivindicación 1. En el caso de este trabajo, es posible que al obtener plantas transgénicas de soya con tolerancia a glifosato, se utilice dicho método para el control de malezas, sin embargo se estaría utilizando un constructo diferente al descrito en la reivindicación 1 de esta patente, por lo cual no se estaría violando la protección otorgada por esta patente.

Como parte final del análisis de libertad de operación del gen *cp4 epsps*, es necesario tener en cuenta que la patente donde se protege su secuencia y el uso de la misma es la US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a), que tiene fecha de inicio de septiembre 13 de 1994, que indica que se vencerá en el año 2014. Esta patente no fue solicitada en Colombia, pero es fundamental en nuestro análisis ya que demuestra que el uso de este gen no podría patentarse en este país, ya que no cumple con el principio de novedad, puesto que se conoce hace más de veinte años.

### 3.1.3 Otras secuencias

- Péptido de Transito

La búsqueda de patentes relacionadas con el uso de péptidos de transito se realizó utilizando la secuencia del péptido de transito de la EPSPS de *Petunia hybrida*; se encontraron dos patentes directamente relacionadas con esta secuencia: US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a) y US RE39247 E1 (Barry *et al.*, 2006). Éstas son las mismas donde inicialmente se protegió el gen *cp4 epsps*. La US 5633435 es la patente más antigua, y la US RE039247 E1 es una reasignación de la misma.

En estas patentes, se protege el uso de péptido de tránsito dentro de una secuencia que incluye un promotor, una secuencia que codifica para una EPSPS y una región terminadora. Estas patentes son del grupo Monsanto y no fueron solicitadas para Colombia.

- Terminador de la subunidad pequeña de la Rubisco (gen *E9*) de *P. sativum*.

Las patentes relacionadas con el uso de esta secuencia protegen su uso, dentro de constructos específicos.

En la patente US 5633435 y sus relacionadas (patente original del gen *cp4 epsps*), se protege su uso dentro de un constructo relacionado con tolerancia a glifosato (reivindicaciones 14, 49-52, 69, 74, 98, 100, 108, 114, 136 y 142). Como ya se ha mencionado esta patente no fue solicitada para Colombia.

Las patentes US 5362865 (Austin, 1994) y US 5659122 (Austin, 1997) protegen el uso de casetes de expresión compuestos por secuencias líderes específicas que aumentan la expresión de genes heterólogos, una secuencia codificante y secuencias 3' no traducidas como la del gen *Nos*, genes que codifican para la proteína de almacenamiento de la soya 7S y el gen *E9* de la subunidad pequeña de la Rubisco de *P. sativum*. Estas patentes no fueron solicitadas en Colombia.

En la patente US 6531649 B1 (Mannerloef *et al.*, 2013) la secuencia terminadora del gen *E9* está incluida dentro de una secuencia mayor, se protege el uso de la misma dentro de un constructo que confiera tolerancia a glifosato, específicamente en plantas transgénicas de remolacha azucarera (reivindicación 8). Para este caso se estará utilizando en plantas de soya, por lo cual no se estará violando ningún derecho de propiedad intelectual, si esta patente aplicase para Colombia. Sin embargo, la búsqueda en la base de datos nacional indica que esta patente no se solicitó para Colombia.

En la patente US 8034997 B2 (Bogdanova *et al.*, 2011) se protege el uso de la secuencia en cuestión asociado a una secuencia que confiera tolerancia a insectos (reivindicaciones 7, 10 y 18), por lo cual no aplica para este caso. De este análisis se concluye que hasta el momento no hay ninguna solicitud de patente, ni patente colombiana en la que se proteja el uso de la secuencia. Dadas las fechas de publicación de las patentes mencionadas, si se presentarían nuevas solicitudes relacionadas el uso de esta secuencia, se incumpliría el principio de novedad.

No se encontraron patentes relacionadas directamente con el uso de las secuencias terminadoras *NOS* y *CaMV35S*, se menciona su uso dentro de constructos génicos, más no se protege su uso.

- Vector de transformación

Los constructos serán clonados en el vector pCambia 1301, por lo cual se buscaron patentes relacionadas con el uso de vectores pCambia. Se encontraron dos familias de patentes.

La familia de patentes titulada “Microbial beta-glucuronidase genes, gene products and uses thereof” que protege el uso de vectores pCambia que contengan el casete *gus plus*. Esta solicitud entro por PCT con el número WO 2000/055333 A1 con 101 países designatarios, fue solicitada y aprobada para los siguientes países: Estados Unidos US6641996 (B1), US7176006 (B2), Unión europea: EP1175495 (A1), EP1175495 (B1), Canadá CA2366839 (A1), Australia AU4172400 (A), AU775238 (B2) y Austria AU775238 (B2).

La otra familia es la titulada “Fungal beta-glucuronidase genes and gene products”, en la que se protege el uso de vectores de expresión que contienen el gen *gus* de origen fúngico. Ésta entró por PCT en el año 2005 con el número WO2005068617 (A2), con

101 países designados, sin embargo sólo fue solicitada en Estados Unidos y aprobada con el número US 7148407.

Se encontró otro documento relacionado: la solicitud estadounidense US 2009/0075358 A1, en la cual se solicita proteger el uso de los vectores pCambia 5105 y 5106. Este documento tiene fecha de solicitud de marzo 29 del 2008, pero aún no hay una patente, probablemente fue negada, o el trámite no se llevó a cabo hasta la obtención de la patente.

En las búsquedas para Colombia no se encontró ninguna solicitud ni patente relacionada.

### **3.1.4 Consideraciones finales**

El desarrollo de una línea transgénica, involucra la utilización de varias técnicas y procesos que pueden estar protegidos por derechos de propiedad intelectual, es importante tener en cuenta estos aspectos al iniciar un proyecto de investigación que tenga finalidad comercial.

Para el desarrollo de este trabajo, se buscaron las solicitudes y patentes relacionadas con el uso de las secuencias que se iban a utilizar en el diseño de los constructos génicos. A pesar que todas ellas están cubiertas por múltiples patentes en el exterior, principalmente en Estados Unidos, únicamente para el gen *cp4 epsps* se encontró una patente que potencialmente podría afectar este proyecto. Un análisis más detallado mostró que se protegía su uso dentro de un constructo muy específico, la utilización de la misma secuencia en constructos diferentes no viola ningún derecho de propiedad intelectual en Colombia.

El análisis de las solicitudes de patente que entran por PCT, mostró un patrón muy conservado, las solicitudes más antiguas (solicitadas hace 15 años o más) tenían un

número pequeño de países designados, que correspondían a las grandes potencias económicas. Sin embargo, en las solicitudes más recientes, siempre se incluyen 101 países designados, entre los cuales generalmente está Colombia. Que un país sea sugerido como país designado dentro de una solicitud PTC, no implica que obligatoriamente se vaya a solicitar la patente en ese país. Sin embargo, muestra que Colombia es un blanco de solicitudes de patentes en biotecnología vegetal por parte de entidades extranjeras.

El análisis de patentes realizado incluyó secuencias descubiertas 15 a 20 años atrás, tiempo en el que estaba empezando la tecnología del DNA recombinante, y las patentes asociadas a dichas secuencias se solicitaron principalmente para Estados Unidos, algunos países europeos, Australia, y Japón. Sin embargo, la biotecnología se ha desarrollado durante estos años, por lo que secuencias, técnicas y procesos están asociados a derechos de propiedad intelectual en muchos países. El estudio de los documentos encontrados permite concluir que secuencias antiguas tienen muy baja probabilidad de haberse patentado en Colombia. Pero, si se trabaja con secuencias descubiertas más recientemente, se debe tener más precaución, ya que existen más probabilidades de tener una patente o solicitud colombiana.

Se muestra que todas las secuencias utilizadas para el diseño de los casetes de expresión objetivo de este trabajo, no registran derechos de propiedad intelectual en Colombia, y pueden ser usadas sin violar derechos de terceros. Adicionalmente el análisis ejecutado será de utilidad si en algún momento se desea comercializar las futuras líneas transgénicas al extranjero, pues estará disponible la información de las patentes en otros territorios, involucradas en los constructos génicos diseñados.

En los análisis de libertad de operación para cultivos modificados genéticamente involucra una desconstrucción total del producto, involucrando también técnicas y procesos utilizados para el desarrollo de mismo. También es necesario hacer un

análisis detallado de otros documentos, como por ejemplo, títulos de obtentor de las variedades que se van a transformar, acuerdos de transferencia de material, acuerdos de confidencialidad, entre otros (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2013). Se recomienda continuar con este análisis, de acuerdo con los futuros desarrollos del proceso de investigación.

## **3.2 Diseño de genes semi-sintéticos**

### **3.2.1 Genes con tolerancia a glifosato**

- Elementos seleccionados para los constructos génicos

Aunque se han caracterizado varios genes que confieren tolerancia al glifosato, el gen *cp4 epsps* es el que cuenta con mayor evidencia empírica, estando presente en la mayor parte de líneas transgénicas comerciales. Está caracterizado desde el punto de su función biológica, y cuenta con estudios de alergenicidad y pruebas de seguridad ambiental (CERA, 2010) por lo que es un candidato ideal, si se piensa en producir líneas transgénicas con fines comerciales.

Como se mencionó en el marco teórico la enzima EPSPS es codificada en el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de tránsito (Della-Cioppa *et al.*, 1986). Los péptidos de tránsito de *Petunia hybrida* y *Arabidopsis thaliana* han sido usados para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto de plantas transgénicas en cultivos como algodón, canola, soya, maíz entre otros. Así la mayor parte de las líneas transgénicas comerciales con tolerancia a glifosato tienen una u otra secuencia. Para el diseño de estos constructos se utilizó el péptido de *Petunia hybrida* (Della-Cioppa *et al.*, 1986).

Es preferible utilizar promotores que tengan alta expresión en todos los tejidos meristemáticos ya que el glifosato se transloca y acumula en estos tejidos (Barry *et al.*, 1997c), por eso se incluyen promotores constitutivos en el diseño de los casetes de expresión, promotores que han mostrado eficiencia cuando se han utilizado en la transformación genética en soya. Se utilizó el conocido promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S), caracterizado por producir altos niveles de expresión en virtualmente todas las regiones de la planta transgénica en su versión simple (Odell *et al.*, 1985) y duplicada (Kay *et al.*, 1987).

Por otro lado, y teniendo en cuenta una de las preocupaciones de la opinión pública en cuanto a los cultivos transgénicos, la utilización de secuencias provenientes de bacterias y virus, se decidió utilizar un promotor constitutivo de origen vegetal, el promotor del gen de la polibuiquitina de la soya o Gmubi (Chiera *et al.*, 2007; Hernandez-Garcia *et al.*, 2010; Hernandez-Garcia *et al.*, 2009). La ubiquitina es una de las proteínas más conservadas, está relacionada con procesos celulares vitales incluyendo mantenimiento de proteínas, estructura de la cromatina y reparación de DNA, además es muy abundante en el citoplasma de la mayoría de las células vegetales (Potenza *et al.*, 2004).

El promotor Gmubi fue identificado por Chiera *et al.* (2007) mediante aislamiento de secuencias genómicas de soya con motivos estructurales semejantes a la región 5' del gen de poliubiquitina I del maíz. Estos autores compararon la expresión de este promotor y el p35S mediante fusión con el gen reportero *gfp* y encontraron que el promotor Gmubi genera niveles de expresión de dos a cinco veces más fuertes que el p35S.

Hernandez-Garcia *et al.* (2009) evaluaron la expresión del gen *gfp* dirigido por el promotor Gmubi en tejido embriogénico de soya establemente transformado. La expresión de la proteína GFP fue analizada en callo embriogénico transformado, en

órganos y tejidos de plántulas y plantas en desarrollo. La proteína GFP mostró una fuerte expresión en todos los tejidos.

Aunque los promotores heterólogos son usados a menudo para regular la expresión de transgenes, los factores que regulan los promotores podrían no estar presentes en dichos sistemas y la expresión genética podría no ser predecible. Hay ejemplos de promotores de ubiquitina que muestran expresión alta en la planta de origen y no en sistemas heterólogos (Hernandez-Garcia *et al.*, 2009), puesto que el objetivo final es utilizar los genes diseñados en soya, es ideal tener un promotor de la misma especie.

En total se diseñaron tres constructos que confieren tolerancia al herbicida glifosato (tabla 3-2).

**Tabla 3-2:** Estructura de los genes semi-sintéticos con tolerancia a glifosato.

<b>E-IGP</b>	Gmubi	CTP- Petunia hybrida	<i>cp4-epsps</i> optimizado	Nos	2807bp
<b>E-IGP2</b>	CaMV35S	CTP- Petunia hybrida	<i>cp4-epsps</i> optimizado	Nos	2424bp
<b>E-2</b>	35S duplicado	CTP- Petunia hybrida	<i>cp4-epsps</i> original	Nos	2617bp

- Modificación de la secuencia codificante

La secuencia de el gen *cp4 epsps* se obtuvo de la patente US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a) SEQ ID No.9. Esta secuencia originalmente tenía 1982bp, se determinó el ORF utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI, se eliminó la secuencia no codificante y se trabajó con una secuencia final de 1368 bp.

Mediante el software VGD 1.3 se realizaron cambios iterativos en la secuencia de la ORF del gen *cp4 epsps*, favoreciendo los codones preferentes de la soya. Cuando se realizan modificaciones de uso codónico hay que tener en cuenta que existe un

número enorme de secuencias de DNA que pueden codificar para una misma secuencia de aminoácidos. Haciendo un cálculo hipotético, cada aminoácido podría ser codificado por un promedio de tres codones diferentes, entonces una secuencia de 100 aminoácidos podría ser codificada por alrededor de  $3^{100}$  ( $\sim 5 \times 10^{47}$ ) secuencias de nucleótidos diferentes (Gustafsson *et al.*, 2004). Por este motivo, para seleccionar la secuencia final se tuvieron en cuenta algunos parámetros que permiten medir el sesgo codónico.

Aunque hay diversas aproximaciones para mejorar la expresión de una secuencia se ha demostrado que el que más influyente es el sesgo codónico (Iannaccone *et al.*, 1997; Perlak *et al.*, 1991), por ello el parámetro al que mayor peso se le dio en el diseño de genes fue el CAI (Sharp *et al.*, 1987).

Como se ha mencionado a lo largo de este escrito, no existe una regla clara sobre cuanto modificar una secuencia. A pesar de que la mayoría de los genes usados en transgénesis vegetal son modificados para favorecer el uso codónico de la planta receptora, hay muy pocos autores que indiquen el valor de CAI o algún otro parámetro modificado en la secuencia. Ello puede deberse a que la modificación de uso codónico es un servicio ofrecido por empresas que se reservan esta información, o a que las multinacionales productoras de plantas transgénicas han patentado este tipo de procesos o lo consideran secreto comercial y por lo tanto no lo publican. Así, para el desarrollo de este trabajo se tuvieron en cuenta los pocos reportes relacionados.

Kucho *et al.* (2013) mejoraron la eficiencia de traducción del gen que confiere resistencia a la gentamicina utilizando una versión modificada, cuyo valor de CAI era de 0.835, Laguía-Becher *et al.* (2010) lograron el mismo efecto con el antígeno SAG1 de *Toxoplasma gondii* en tabaco, utilizando una versión del gen con un CAI de 0.83, mientras que Yan *et al.* (2011) encontraron que versiones modificadas del gen

*Pparo1*, que confiere tolerancia a glifosato, con valores de CAI de 0.7 y 0.9. De acuerdo con estos reportes, la secuencia codificante se modificó hasta tener un CAI de 0.8 aproximadamente.

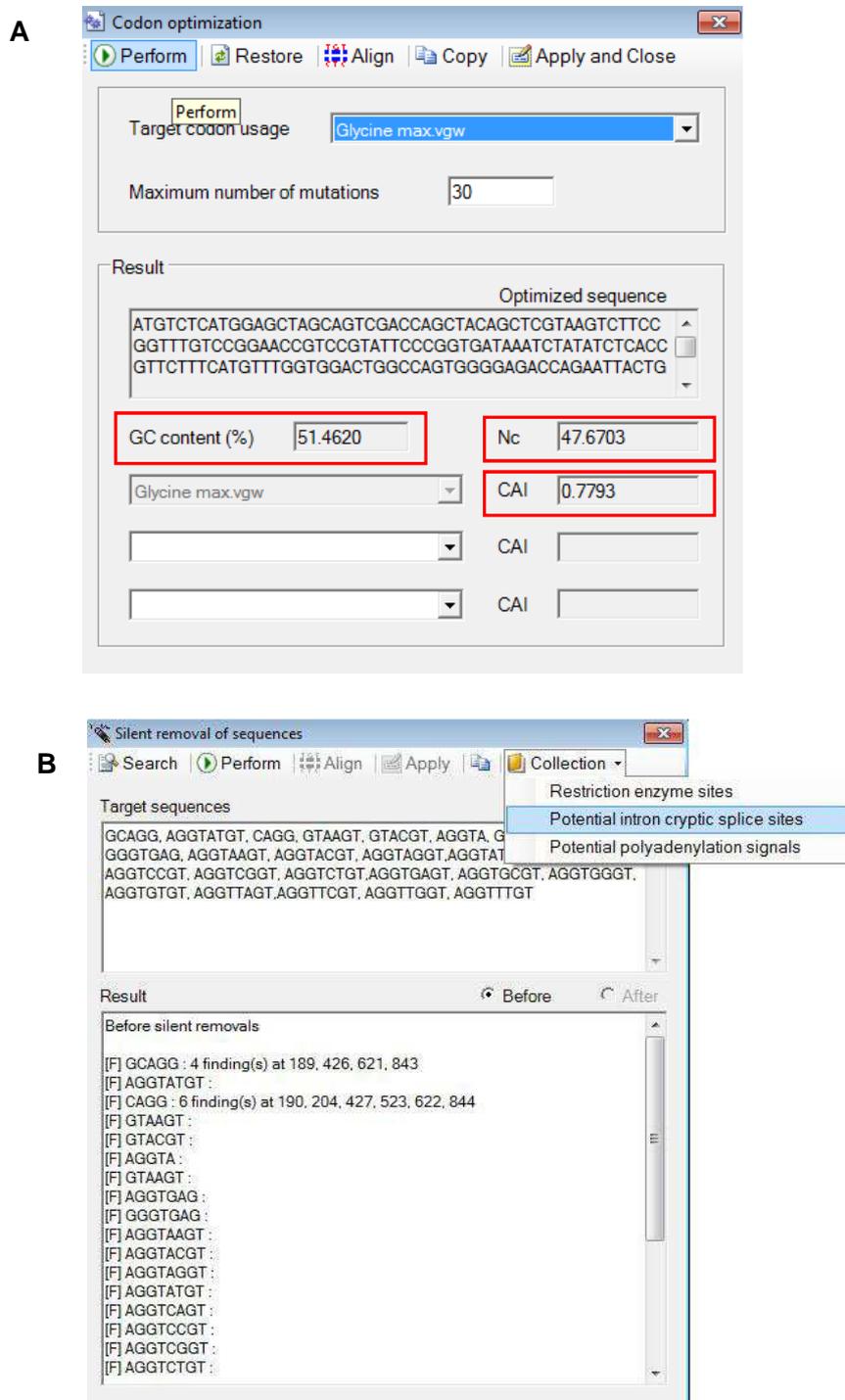
Como se observa en la figura 3-2, la secuencia sin modificar tenía un alto contenido G-C sobretodo en el tercer codón (84.21%), que es un valor más alto que el valor reportado para genomas vegetales (Kawabe & Miyashita, 2003). Utilizando la función de optimización codónica de VGD 1.3, a medida que se iban cambiando los codones originales hacia codones preferentes de la soya (figura 3-3), este porcentaje fue variando hasta una valor final de 48.21%.

**Figura 3-2:** Comparación Parámetros iniciales (A) y finales (B) de la secuencia del gen *cp4 epsps*.

A		B	
Parameter	Value	Parameter	Value
w-table file for CAI	Glycine max.vgw	w-table file for CAI	Glycine max.vgw
CAI	0.6161	CAI	0.7756
Nc	27.093	Nc	49.426
Overall GC content (%)	65.8626	Overall GC content (%)	51.7818
GC content at 1st place (%)	65.1316	GC content at 1st place (%)	58.9091
GC content at 2nd place (%)	48.2456	GC content at 2nd place (%)	48.2182
GC content at 3rd place (%)	84.2105	GC content at 3rd place (%)	48.2182

El contenido de GC en la tercera base también es el factor más importante para discriminar el uso codónico entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, en monocotiledóneas 16 de 18 aminoácidos favorecen GC en esta posición, mientras que en dicotiledóneas únicamente 7 de 18 aminoácidos posibles lo hacen (Murray *et al.*, 1989).

**Figura 3-3:** A. Optimización codónica en VGD 1.3<sup>3</sup>. B. Búsqueda de sitios críticos de splicing.



<sup>3</sup> Cada vez que se da clic en el comando “perform” el programa VGD 1.3 cambia el uso codónico, lo que origina cambios en los parámetros subrayados (contenido de GC, CAI, Nc).

Adicionalmente un porcentaje elevado de GC en la tercera posición, favorece la formación potencial de estructuras tipo “hairpins” que pueden afectar la expresión y estabilidad del RNA (Barry *et al.*, 1992), por lo cual 48.2% de GC en la tercera base es un valor más apropiado para que el gen se exprese en la soya, o en dicotiledóneas en general. La secuencia final quedó con un contenido global GC global de 51.78% que es más cercano al de la soya (46%).

El Número efectivo de codones Nc (Wright, 1990), un parámetro que mide el grado de sesgo codónico, es un número entre 20 y 61, donde 20 significa extremadamente sesgado, y 61 un sesgo o patrón de uso igual entre los codones sinónimos. La secuencia original tenía un Nc de 27, lo que indica que había un uso codónico muy sesgado solo hacia 27 de 61 codones posibles, las modificaciones en la secuencia permitieron aumentarlo a 49.5 lo que puede brindar mayor versatilidad al proceso de traducción.

En total se cambiaron 379 bases (27.56%) y 325 codones (70.91%). Hay que tener en cuenta que cada cambio generado en la secuencia, así sea para acercarla al patrón de uso codónico de la planta huésped, puede generar en la nueva secuencia otro tipo de señales que perjudiquen su expresión como señales crípticas de splicing y sitios de poliadenilación prematuros, por lo cual es necesario realizar iterativamente la eliminación de dichos sitios mediante cambios de uso codónico. De la secuencia original se eliminaron 10 sitios de splicing crípticos (4 GCAGG, 6 CAGG, figura 3-3 B) y de la secuencia optimizada 16 (5 GCAGG/11 CAGG) y 4 sitios de poliadenilación prematuros (2 AAGAAA/2 AATAAC).

El alineamiento pareado mediante el algoritmo de Needle Wunch entre la secuencia nucleotídica optimizada y la secuencia original mostró un porcentaje de identidad del 74%.

La secuencia del péptido de tránsito se obtuvo de la patente US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a) SEQ ID 14. En el péptido de tránsito solo se realizaron modificaciones para eliminar sitios de splicing crípticos y señales de terminación prematuras ya que el CAI de la secuencia original era de 0.86, esto es debido a que las dicotiledóneas tienen sesgo codónicos similares entre sí (Murray *et al.*, 1989; Wang & Roossinck, 2006). En total se cambiaron 13 pares de bases (5.94%) y 11 codones (15.07%) que permitieron eliminar cuatro sitios de poliadenilación prematura (1 CATAAA/2 AAAAAA/1 AATTAA) y un sitio de splicing críptico (1 CAGG).

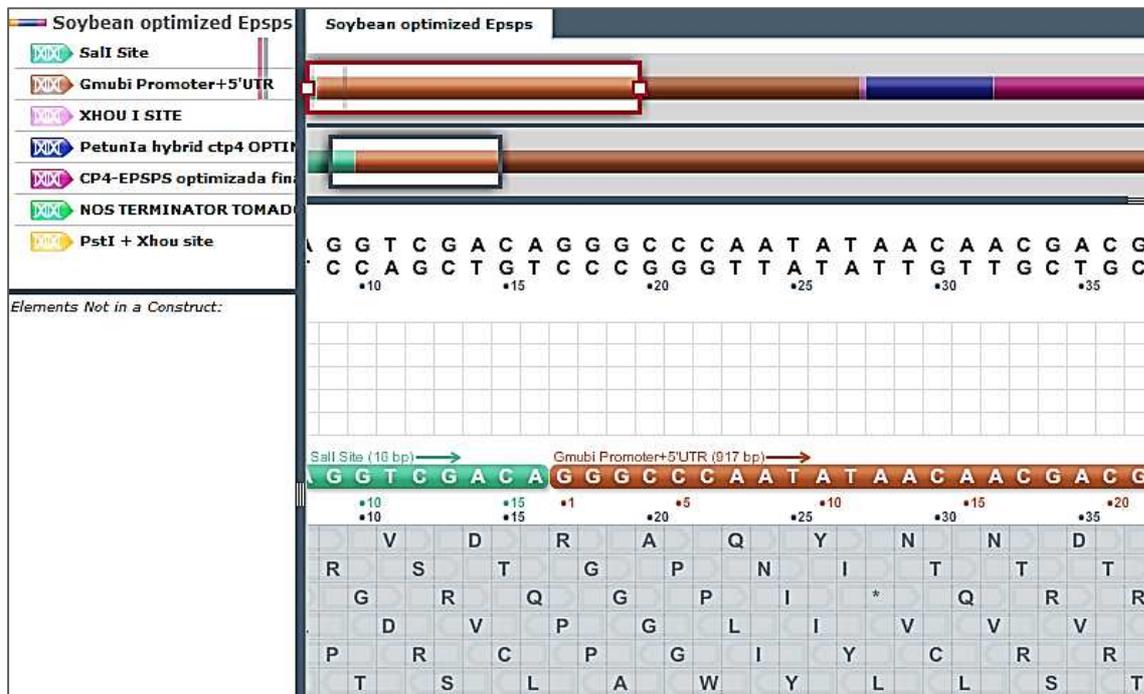
- Ensamblaje de los constructos génicos

Una vez se obtuvieron las secuencias modificadas para utilizar en el constructo génico, se ensamblaron con el software Gene Designer 2.0 (Villalobos *et al.*, 2006). Este programa permite unir las secuencias según el orden que se desee en el constructo y generar una secuencia final en formato FASTA. De esta manera se colocaron consecutivamente las secuencias del promotor, péptido de tránsito, secuencia optimizada del gen y terminador (figura 3-4).

La secuencia del promotor Gmubi se tomó del banco genético ID gi|162280984|, es una secuencia de 917 bp, contiene una región 5' UTR entre las bases 241-325 y una región intrónica de la 326-917. Las secuencias del gen y del péptido de tránsito de la patente US 5633435 (Barry *et al.*, 1997a) SEQ ID No.9 y SEQ ID No. 14. La secuencia del terminador Nos del banco de genes gb|AF234316.1|:2085-2337.

Se colocaron en los extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall y PstI. Se escogieron debido a que cortan una sola vez en el vector de transformación seleccionado, en la zona del polilinker, lo que permite que puedan ser clonados dentro del vector.

**Figura 3-4:** Ensamblaje elementos del constructo en Gene Designer 2.0.<sup>4</sup>



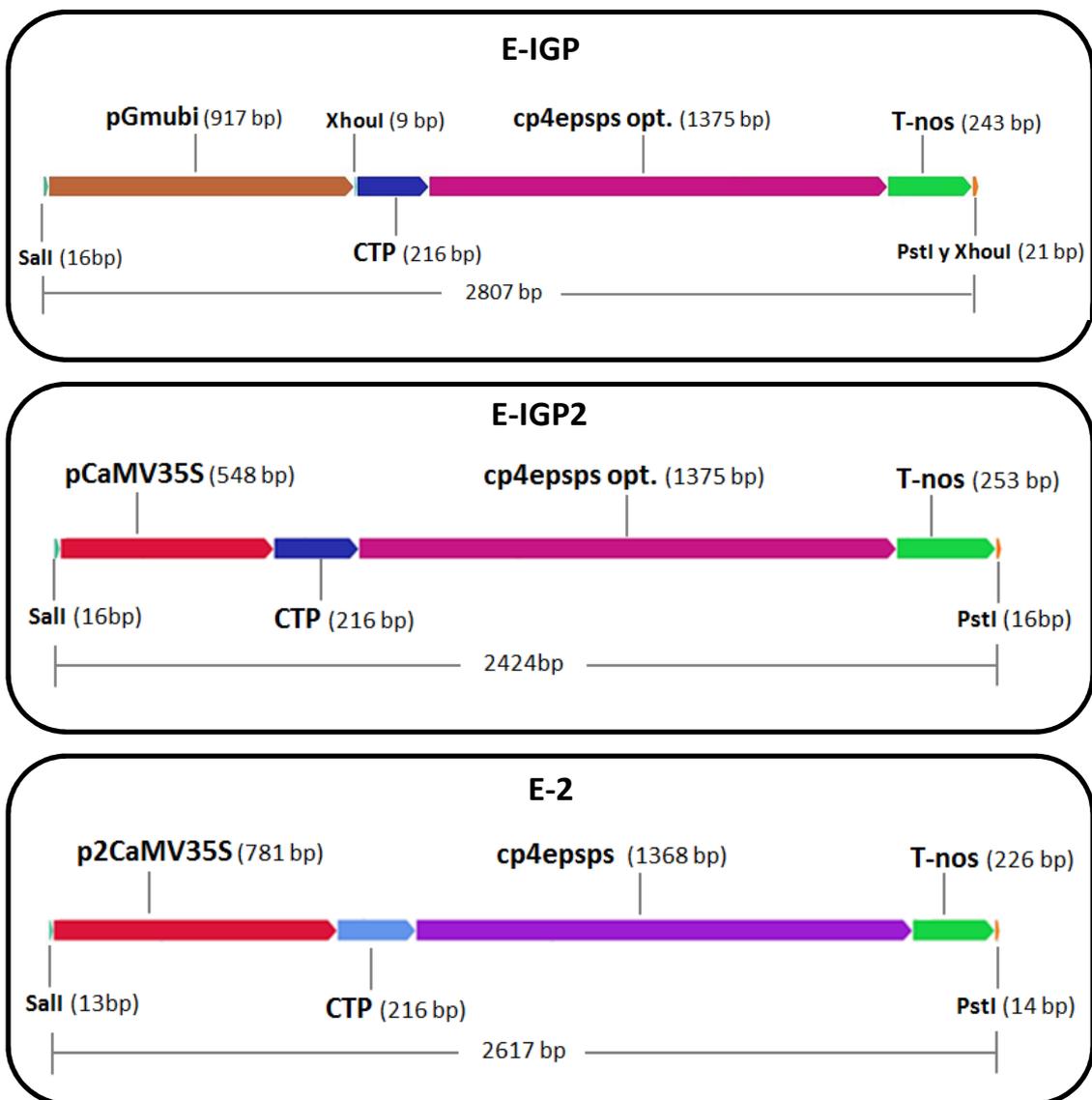
Como algunas de las secuencias codificantes dentro de los constructos tenían secuencia de reconocimiento para la enzima PstI, se realizaron cambios silenciosos en la secuencia para eliminar dichos sitios, este proceso se realizó con el software VGD 1.3.

Al insertar la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción se tuvo cuidado de no alterar el marco de lectura, verificando con la herramienta ORF del software Gene Designer 2.0. En los casos en que se observó que se afectaba el marco de lectura, se adicionaron uno o dos nucleótidos al inicio de la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción hasta que se obtuvo la ORF correcta.

<sup>4</sup> En el panel de la izquierda se observan los diferentes elementos genéticos del constructo incluyendo sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, promotor, péptido de tránsito, gen y terminator. El programa da la posibilidad de ordenarlos según se desee, y darle un sentido Forward o Reverse. A la derecha se observa como cada barra de color está asociada con su respectiva secuencia de DNA, y en la parte inferior se observa el tamaño de cada segmento y su posible traducción en los seis marcos de lectura.

La figura 3-5 es un diagrama de los constructos finales, donde se muestran los elementos de cada uno de los constructos, y sus respectivos tamaños. El anexo A muestra las secuencias finales.

**Figura 3-5:** Diagrama genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a glifosato.



- Análisis traduccional *in silico*

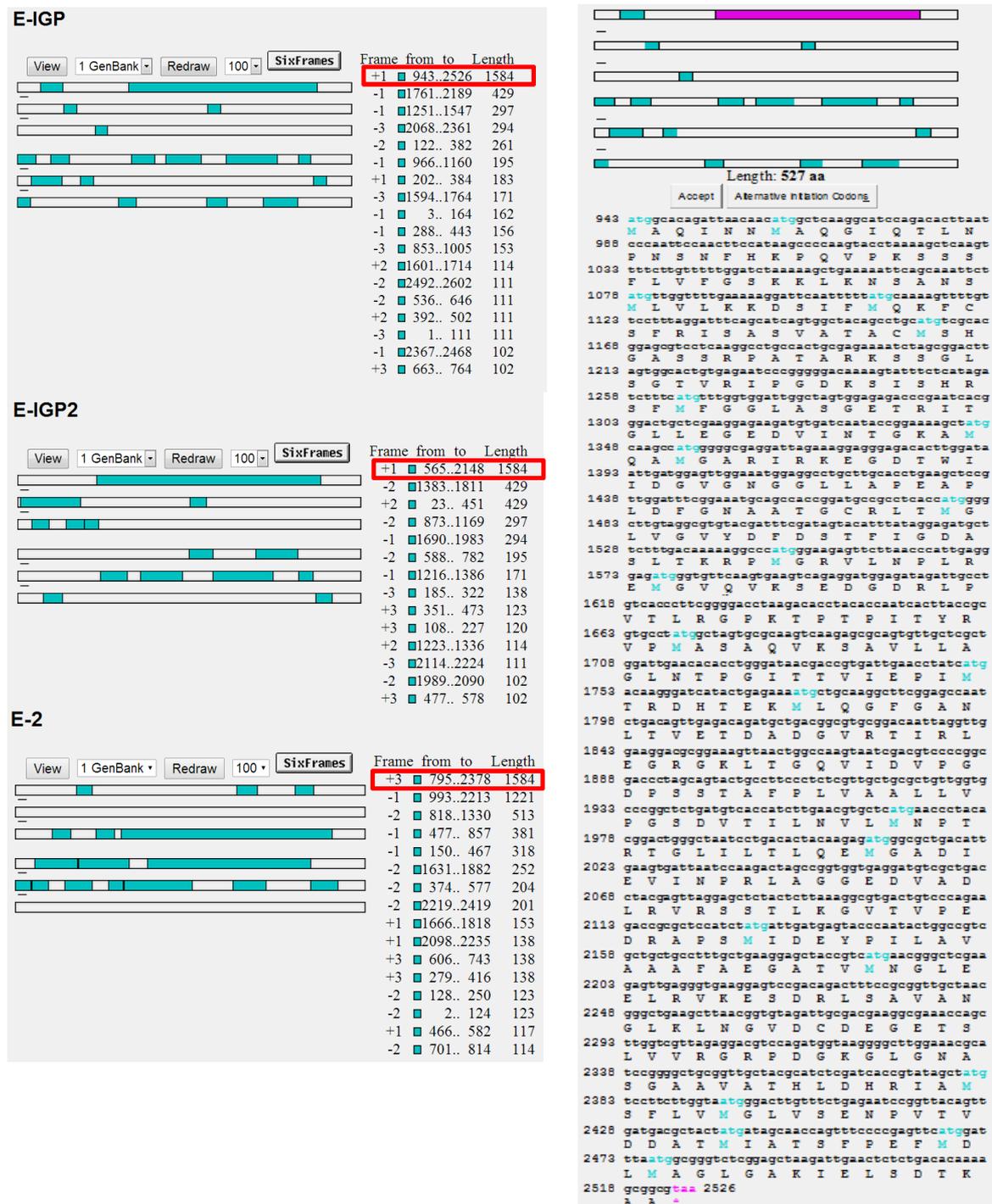
Obtenida la secuencia final en formato FASTA de cada uno de los constructos, se realizó el análisis traduccional *in silico* utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y con el algoritmo Genmark (Lomsadze *et al.*, 2005).

La herramienta ORF Finder permite determinar los seis marcos de lectura en los que podría realizarse el proceso de traducción como se observa en el lado izquierdo de la figura 3-6. Puesto que los constructos se diseñaron en sentido 5'-3' la proteína debería generarse en los marcos de lectura +1,+2 o +3, y en este caso corresponden al segmento de 1584 nucleótidos (CTP: 216 bp + *cp4epsps*:1368 bp). A la derecha se observa la predicción de la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida. Para los tres constructos los programas generaron una proteína de 527 aminoácidos, que corresponden a la proteína CP4 EPSPS y su péptido de tránsito. Se realizó alineamiento entre los aminoácidos 73-527 de la proteína predicha contra la proteína esperada (US 5633435 SEQ ID No. 3), evidenciándose un alineamiento perfecto. De la misma manera ocurrió al alinear los primeros 72 aminoácidos con la secuencia del péptido señal (anexo B).

Adicionalmente, la secuencia de la proteína fue examinada con la herramienta ChloroIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), que permite detectar la presencia de péptidos de tránsito en una secuencia de aminoácidos. De acuerdo al CS-score de la salida (anexo B), se confirma la existencia de un péptido de tránsito que dirige la proteína hacia el cloroplasto, en esta secuencia.

Estos resultados demuestran, en el análisis *in silico*, que los constructos diseñados efectivamente se traducen en la proteína CP4-EPSPS (|Q9R4E4|) que confiere tolerancia al herbicida glifosato.

**Figura 3-6:** Traducción *in silico* de los genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a glifosato.



### 3.2.2 Genes con tolerancia a glufosinato de amonio

- Elementos seleccionados para los constructos génicos

Los dos genes más utilizados para conferir resistencia al herbicida glufosinato de amonio son el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) y el gen *bar* de *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988). El ORF de los dos genes tiene un tamaño semejante y los dos producen la proteína fosfotricina *n*-acetil transferasa (PAT); las proteínas codificadas por estos genes tienen un porcentaje de identidad del 84.7%.

En plantas transgénicas liberadas comercialmente se han utilizado los dos genes. Se escogió utilizar la secuencia de *S. hygroscopicus*, ya que hay varios reportes del uso de este gen como marcador de selección específicamente en plantas de soya (Paz *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2004a; Zeng *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1999).

El glufosinato es un inhibidor competitivo de la enzima glutamina sintetasa. La enzima está presente en la célula en dos formas, una citoplasmática y una cloroplástica (Cren & Hirel, 1999). La mayoría de las plantas transgénicas con tolerancia a glufosinato portan el gen de tolerancia a PPT sin ninguna clase de péptido señal. Únicamente algunos híbridos transgénicos de canola (ej. MS1, RF1 =>PGS1)) producidos por Bayer CropScience, direccionan el gen hacia el cloroplasto. Dadas las dos formas celulares de la enzima, puede ser que las dos opciones sean válidas para que las plantas transformadas expresen tolerancia al glufosinato.

Lutz *et al.* (2001) desarrollaron plantas transplastómicas de tabaco, transformando el genoma del cloroplasto, con tolerancia a glufosinato. A pesar de que la enzima se expresó y las plantas mostraron tolerancia al herbicida, no pudieron realizar la selección de plantas utilizando glufosinato. Estos autores concluyeron que no sólo la enzima sino también la localización subcelular de la proteína PAT es crítica para seleccionar las plantas transgénicas. Puesto que el objetivo de los constructos que se

diseñaron en este trabajo es la utilización como gen de interés y gen marcador de selección vegetal, la mejor opción es no incluir un péptido señal en su estructura.

Como elementos promotores de los constructos que confieren tolerancia a glufosinato, se seleccionaron promotores de expresión constitutiva, ya que se requiere que el gen se exprese en todos los tejidos de la planta transformada. Se seleccionaron los promotores 35S (Odell *et al.*, 1985) y FMV (Maiti *et al.*, 1997; Sanger *et al.*, 1990). El p35S es el promotor constitutivo más utilizado en transformación genética de plantas. Y el promotor FMV, ha sido utilizado en varios eventos de transformación genética mostrando una buena expresión del gen heterólogo que dirige (ej. MON89788, GTSB77, HT-1, GT73, RT73 entre otros).

El uso del promotor FMV debe incluir preferiblemente una secuencia líder 5', que puede provenir del mismo promotor o de una fuente heteróloga (Rogers, 1995). Para el diseño constructo con el promotor FMV se utilizó la secuencia líder 5' no traducida de la proteína HSP17.9 de la soya, sugerida por Rogers (1995).

Como secuencias terminadoras se utilizaron la región terminadora del 35S y la secuencia terminadora de la subunidad pequeña de la Rubisco gen *E9* de *P. sativum*, que ha sido utilizada en varias líneas transgénicas comerciales (ej, GTSB77, HT-1, MON89788 entre otras).

Se diseñaron dos constructos que confieren tolerancia al herbicida glufosinato, cuya estructura se muestra en la tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Estructura de los genes semi-sintéticos con tolerancia a fosfinotricina

Nombre	Promotor	Gen	Terminador	Tamaño
Bar-IGP	FMV	Bar <i>S. hygroscopicus</i> optimizado	E9	1562 bp
Bar-2	CaMV35S	Bar <i>S. hygroscopicus</i> original	CaMV35S	1331 bp

- Modificación de la secuencia codificante

La secuencia del gen *bar* se obtuvo del banco genético ID X17220, se determinó su ORF entre los nucleótidos 31-582, el resto de la secuencia se eliminó. Mediante el software VGD 1.3 se realizaron cambios iterativos en el ORF del gen *bar* favoreciendo los codones preferentes de la soya, se eliminaron sitios de splicing crípticos, señales de poliadenilación prematuras y un sitio de restricción para la enzima PstI. Al igual que para el gen *cp4 epsps*, el contenido GC en el tercer codón de la secuencia inicial era más alto que el utilizado en plantas (89.13%), por ello para la escogencia de la secuencia optimizada se tuvo en cuenta la disminución de este parámetro (Figura 3-7).

**Figura 3-7:** Parámetros iniciales (A) y finales (B) de la secuencia del gen *bar*.

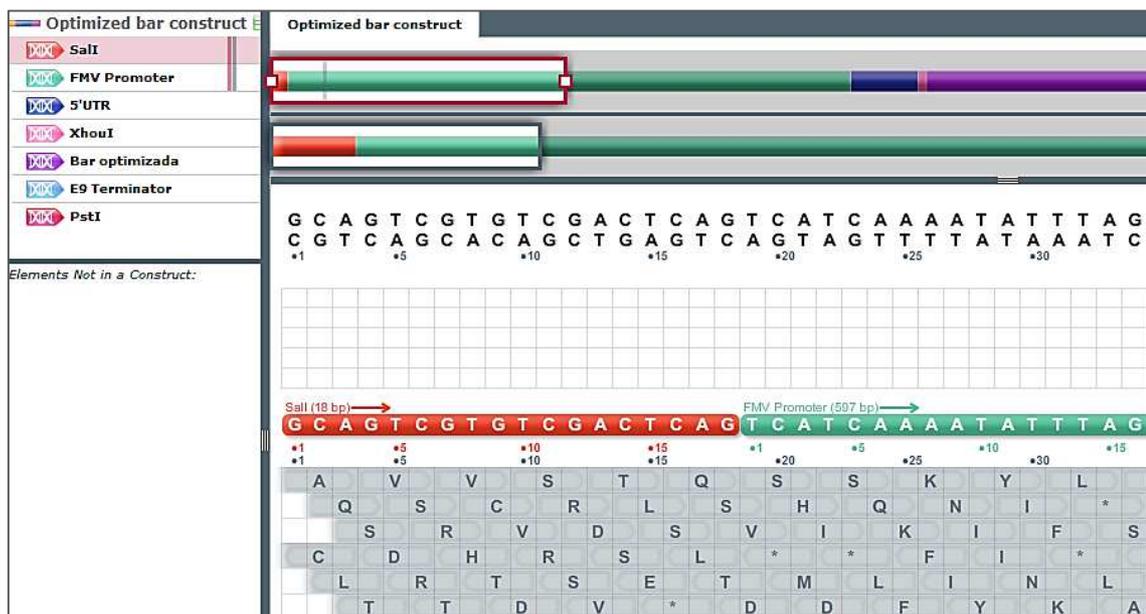
A		B	
Parameter	Value	Parameter	Value
w-table file for CAI	Glycine max.vgw	w-table file for CAI	Glycine max.vgw
CAI	0.6016	CAI	0.7782
Nc	22.636	Nc	44.219
Overall GC content (%)	68.2971	Overall GC content (%)	48.3696
GC content at 1st place (%)	67.3913	GC content at 1st place (%)	57.6087
GC content at 2nd place (%)	48.3696	GC content at 2nd place (%)	47.8261
GC content at 3rd place (%)	89.1304	GC content at 3rd place (%)	39.6739

En total se cambiaron 153 pares de bases (27.72%) y 132 codones (71.74%). Estos cambios permitieron eliminar 7 señales crípticas de splicing de la secuencia original (GCAGG /CAGG /GTACGT), y 8 de la secuencia optimizada (1 GCAGG/ 5 CAGG/1 GCAGG/1 GTAAGT), no se encontraron señales de poliadenilación prematuras. El CAI subió de 0.60 a 0.78, lo que favorecerá su expresión en plantas de soya. El alineamiento pareado de la secuencia nucleotídica final con la secuencia original reveló un porcentaje de identidad de 72.4%.

- Ensamblaje de las secuencias del constructo

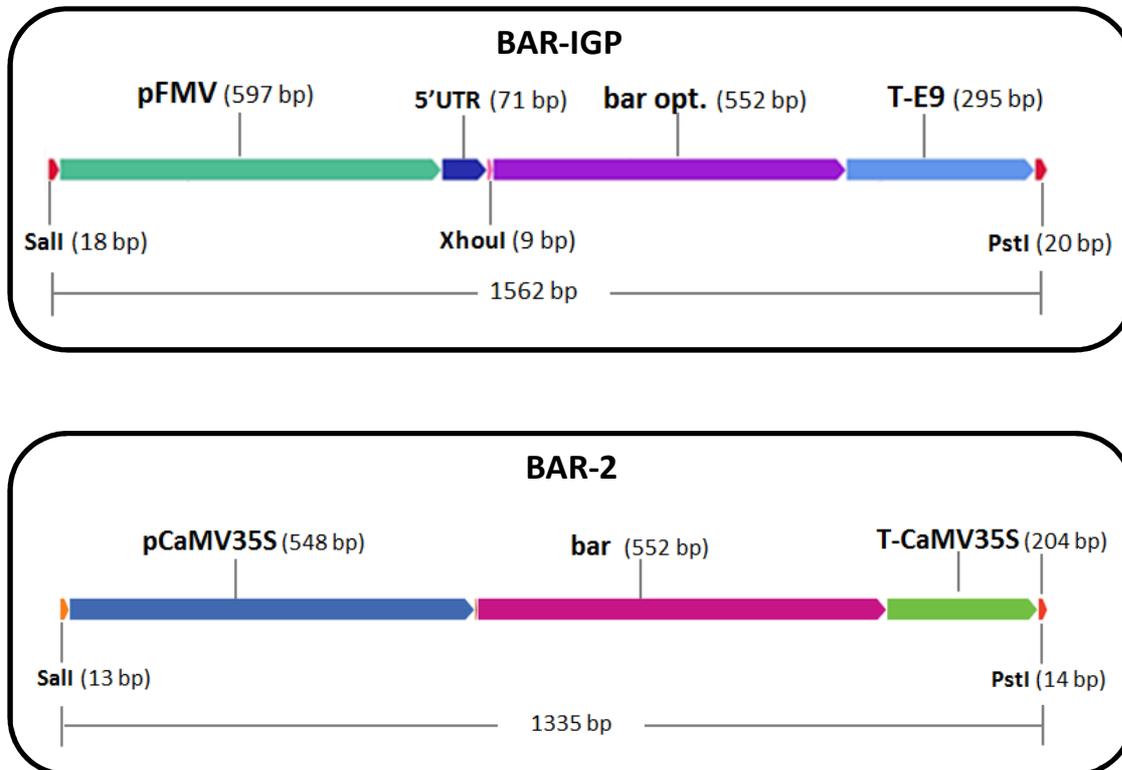
El ensamblaje de los elementos del constructo se realizó con el software Gene Designer 2.0. La secuencia del promotor FMV y la región 5'UTR se tomaron de la patente US 5378619 SEQ ID No 11 y SEQ ID No 5 respectivamente. La secuencias del promotor y terminador CaMV35S, y el terminador E9 del banco genético |HQ698853.1|:1967-2514, AF234316.1|:8727-8930, |AF309825.2|:1882-2176 respectivamente. La figura 3-8A muestra un pantallazo del ensamblaje de los elementos del constructo. Y la figura 3-8B el diagrama final de los dos constructos, donde se observa los elementos genéticos utilizados y sus respectivos tamaños.

**Figura 3-8A:** Ensamblaje de los elementos del constructo.<sup>5</sup>



<sup>5</sup> En el panel de la izquierda se observan los diferentes elementos genéticos del constructo incluyendo sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, promotor, 5'UTR, gen y terminador. A la derecha se observa como cada barra de color está asociada con su respectiva secuencia de DNA, y en la parte inferior se observa el tamaño de cada segmento y su posible traducción en los seis marcos de lectura.

**Figura 3-8B:** Diagrama genes semi-sintéticos con tolerancia a fosfinotricina.



- Análisis traduccional *in silico*

La figura 3-9 muestra la predicción de la secuencia de aminoácidos generada mediante la herramienta ORF Finder. En el panel de la izquierda, se observa gráficamente la traducción de los constructos en los seis marcos de lectura. Es de anotar que en algunos casos, se puede observar más de una proteína predicha en un mismo marco de lectura; esto se debe a que la herramienta determina las posibles proteínas mediante la detección de un codón de inicio (ATG) y un codón de parada (TAA, TAG, TGA), estas secuencias pueden encontrarse a lo largo del constructo.

La proteína esperada debe ser codificada por una secuencia nucleotídica de 552 bp (longitud del gen *bar*). Como se observa, a la izquierda de la figura 3-9, la herramienta detectó la proteína codificada por esta secuencia en los marcos de lectura +3 y +2 en cada caso. Para los dos constructos, esta secuencia traduce para una proteína de 183 aminoácidos (panel de la derecha). Mediante alineamiento con la proteína esperada [P16426], se confirmó que efectivamente los constructos diseñados codifican para la fosfinotricina acetil transferasa. Teniendo en cuenta que las modificaciones realizadas en la secuencia nucleotídica son modificaciones silenciosas, las dos proteínas muestran un porcentaje de identidad del 100% (ANEXO B).

**Figura 3-9:** Traducción *in silico* de los genes semi-sintéticos que confieren tolerancia a fosfinotricina.



### 3.3 Caracterización molecular de los genes diseñados y transformación de bacterias

#### 3.3.1 Transformación de *Escherichia coli* y pruebas de PCR

Se transformó la cepa DH10B de *E. coli* con cada uno de los constructos diseñados. Las colonias transformadas fueron seleccionadas sobre medio LB con kanamicina 50mg/l. Para la caracterización molecular de las colonias transformadas se diseñaron primers específicos para los genes de interés (Tabla 3-4), y se efectuaron pruebas de PCR de colonias.

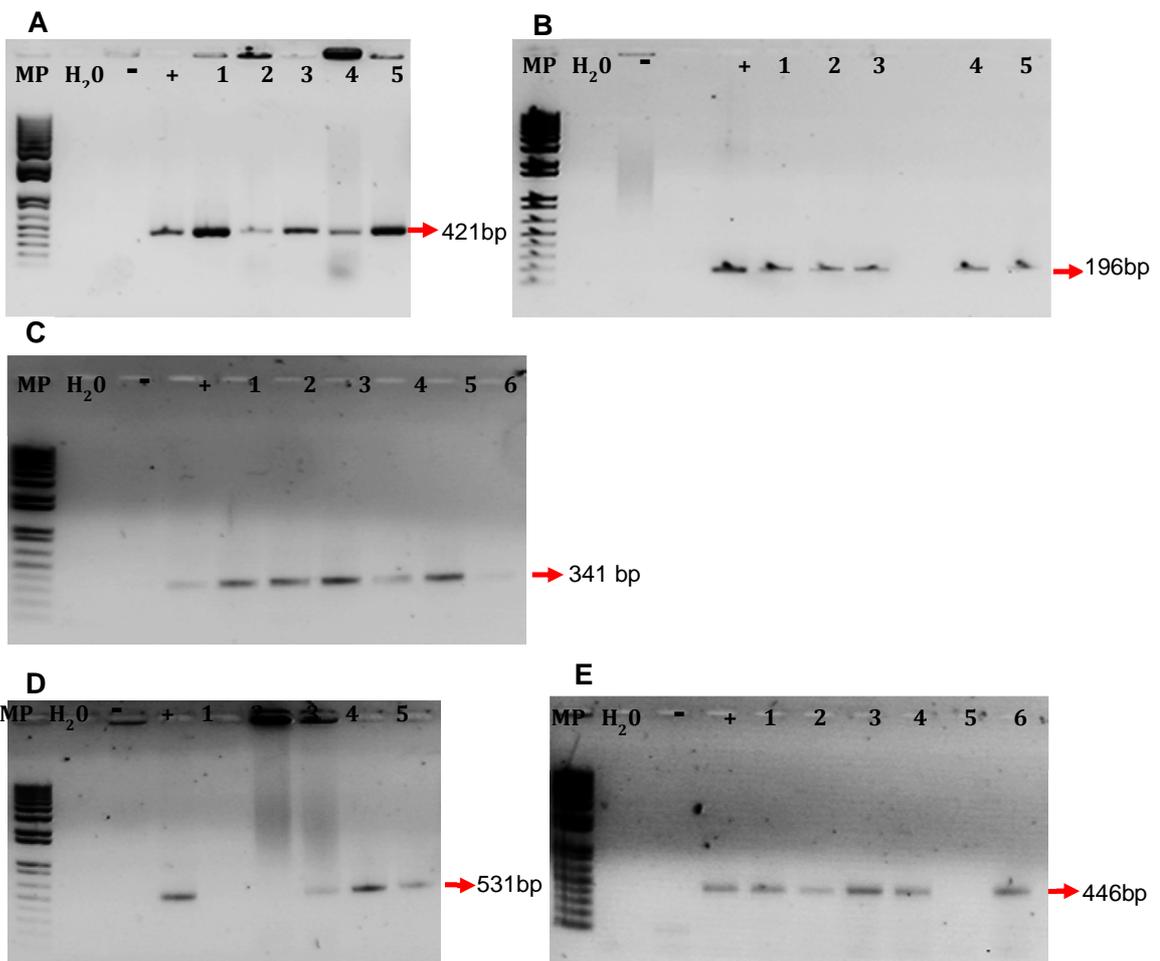
**Tabla 3-4:** Primers utilizados para la caracterización molecular de los constructos.

Región que amplifica	Nombre Primers	Secuencia	Tamaño de Amplicon
<i>cp4 epsps</i> optimizado	E-IGP	FW: ACGTGCTCATGAACCCTACAC RV: GCTATACGGTGATCGAGATGC	421 bp
<i>cp4 epsps</i> optimizado	EPSPS1	FW: TCACCATGGGGCTTGTAG RV: AACGAGAGGGAAGGCAGT	446 bp
<i>cp4 epsps</i>	E-2	FW: ATATCCGATTCTCGCTGTCCG RV: CCATCAGGTCCATGAACTCC	341 bp
<i>bar</i> optimizado	BAR-IGP	FW: GCGTCCTGCCGATATTAGG RV: TCTGTAACGGGCAATACGG	531 bp
<i>bar</i>	BAR2	FW: GTCTGCACCATCGTCAACC RV: CTGAAGTCCAGCTGCCAGA	446 bp
<i>gus</i>	GUS	FW: CAGAACTCGCCGTAAGACTG RV: AGGGTCTTGCGAAGGATAGTG	458 bp
Promotor Gmubi	GMUBI	FW: GGGCCCAATATAACAACGAC RV: AACCTTGAAGGGAGAGGTAGG	328 bp
Promotor CaMv35S	35S	FW:GCTCCTACAAATGCCATCA RV: GATAGTGGGATTGTGCGTCA	196 bp

La Figura 3-10 muestra los resultados de las pruebas de PCR, en cada caso se observan las amplificaciones obtenidas para cinco o seis colonias transformadas con cada uno de los constructos. Para el vector E-IGP se utilizaron primers que

amplificaban el gen *cp4 epsps* optimizado y se observó el amplicón esperado de 421 bp (Fig. 3-10 A).

**Figura 3-10:** PCR de colonias de *E. coli* transformadas con cada constructo. A. E-IGP, B. E-IGP2, C. E-2, D. BAR-IGP, E. BAR-2. MP: marcador de peso molecular 12kb, - : control negativo +: control positivo, 1 a 6: colonia 1 a 6.

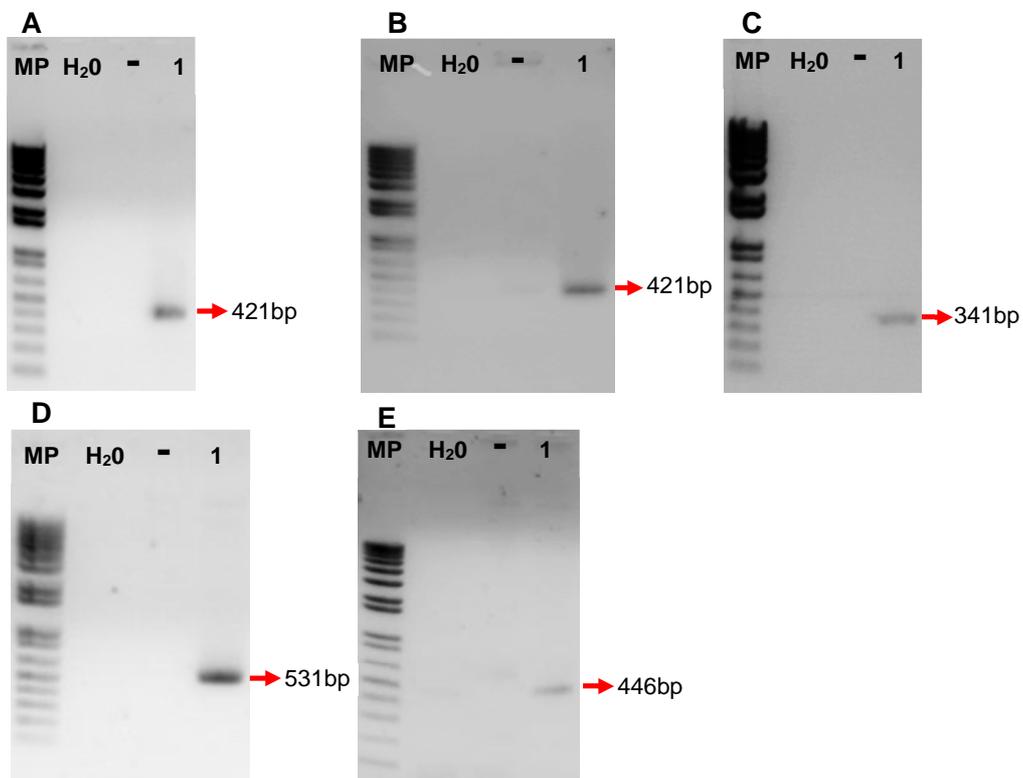


Para el vector E-IGP2 se utilizaron primers para el p35S, y se observó el amplicón de 196bp (Fig. 3-10 B). Para el vector E-2 primers que amplifican el gen *cp4 epsps* y se observó el amplicón 341 bp esperado (Fig. 3-10 C). Para el vector Bar-IGP primers para el gen *bar* optimizado, y se observó el amplicón de 531 bp (Fig. 3-10 D). Para el

vector Bar-2 primers que amplifican el gen *bar* y se observó el amplicón 442 bp esperado (Fig. 3-10 E). En todos los casos se utilizó una colonia de *E. coli* cepa DH10B sin transformar como control negativo, la cual no amplificó en ninguno de los casos, de acuerdo a lo esperado.

Se realizaron pruebas de PCR sobre DNA plasmídico aislado de colonias PCR positivas, con el fin de caracterizar los constructos. En todos los casos la PCR se realizó utilizando primers para el gen de interés (*cp4 epsps* o *bar*). En la figura 3-11 se observa que en todos los casos las muestras amplificaron, confirmando la presencia del gen de interés en cada uno de los plásmidos. Mientras los controles negativos no amplificaron en ningún caso de acuerdo a lo esperado. Se seleccionó una colonia positiva para cada constructo y se criopreservó.

**Figura 3-11:** Amplificación de los genes de interés para cada vector. A. E-IGP, B. E-IGP2, C. E-2, D. BAR-IGP, E. BAR-2. MP: marcador de peso molecular 12 kb, H<sub>2</sub>O: control absoluto, - : control negativo, 1: DNA plasmídico.



Se mandó a secuenciar la región correspondiente al gen de interés de cada vector con la compañía Macrogen. Este proceso se realizó sobre el DNA plasmídico aislado de las bacterias PCR positivas, para lo cual se diseñaron primers que se apareaban con las secuencias presentes 100 bp corriente arriba y 100 bp corriente abajo del constructo, con el fin de garantizar una cobertura total de los genes. La secuenciación demostró que todos los genes tenían las secuencias esperadas.

### 3.3.2 Eliminación de gen reportero del vector de transformación

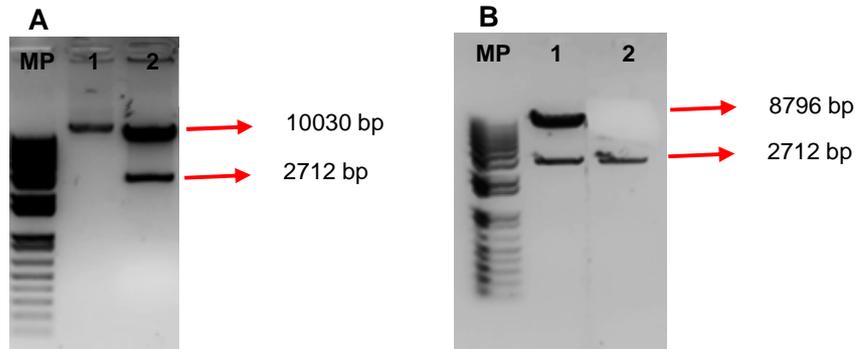
Con el fin de eliminar el gen *gus* de los vectores E-IGP y BAR-IGP se realizó digestión de cada uno de los plásmidos con la enzima de restricción PvuI. La digestión del vector E-IGP generó dos fragmentos, uno de 10030 bp sin el gen, y otro de 2712 bp con la región p35S – *gus*. La digestión del vector BAR-IGP, genera también dos fragmentos, uno de 8796 bp sin el gen y otro de 2712 bp con el gen (Figura 3-12).

Tras la digestión, se visualizó el DNA en gel de agarosa, observándose las bandas esperadas (Figura 3-13). Luego, se cortó cuidadosamente el fragmento correspondiente a la banda de interés (plásmido sin gen *gus*), y se eluyó el DNA utilizando el kit “QIAquick Gel Extraction” de Qiagen.

En este punto se tenía una molécula linear de DNA con los extremos cohesivos generados por la enzima PvuI. Para re-circularizar el vector se efectuó una reacción de ligación con la T4 DNA ligasa de Invitrogen. Las ligasas catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre las terminaciones hidroxilo 3' y fosfato 5' de los ácidos nucleicos (Sambrook & Russel, 2001), permitiendo la unión de los extremos de la molécula linear y su circularización.



**Figura 3-13:** Digestión plásmidos con la enzima PvuI. A. Plásmido E-IGP. Carril 1: Vector E-IGP, 2: Digestión. B. Plásmido BAR-IGP. Carril 1: Digestión BAR-IGP, 2: corte de la banda de interés.

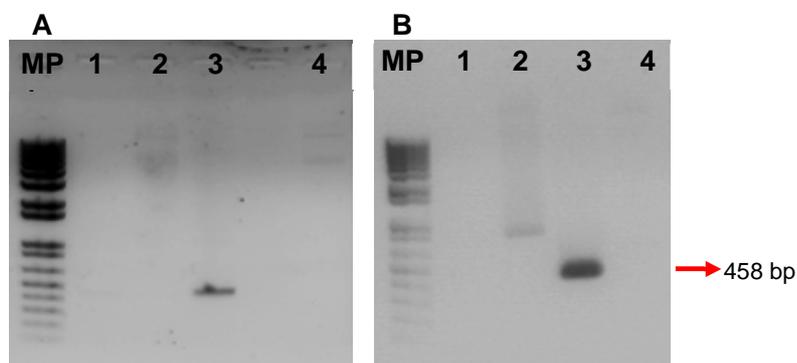


Con el producto de la reacción de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* cepa DH10B, se cultivaron en placas de Petri sobre medio de selección con kanamicina. Sobre las colonias crecidas se realizó PCR de colonia utilizando primer para los genes *cp4 epsps* y *bar*, todas las colonias evaluadas en cada caso (dos para la ligación con el vector E-IGP y cinco con el vector Bar-IGP) fueron PCR positivas, lo que indica que habían sido transformadas.

Posteriormente se realizó aislamiento de DNA plasmídico para confirmar la eliminación del gen *gus* del vector. La reacción de PCR se realizó utilizando los primers para el gen *gus* (tabla 3-4).

La visualización de la reacción de PCR (Figura 3-14) mostró que hubo amplificación para los positivos (vectores con gen *gus*), mientras que para el DNA plasmídico producto de la reacción de ligación y el control negativo (pCAMBIA 1300) no la hubo, lo que indica que el gen fue eliminado efectivamente del vector.

**Figura 3-14:** PCR para el gen *gus* sobre los vectores modificados. A. Vector E-IGP, carril 1: H<sub>2</sub>O, 2: control negativo, 3: control positivo, 4: Producto de ligación, B. vector BAR-IGP, carril 1: H<sub>2</sub>O, 2: control negativo, 3: control positivo, 4: Producto de ligación. Amplicón esperado 458bp.



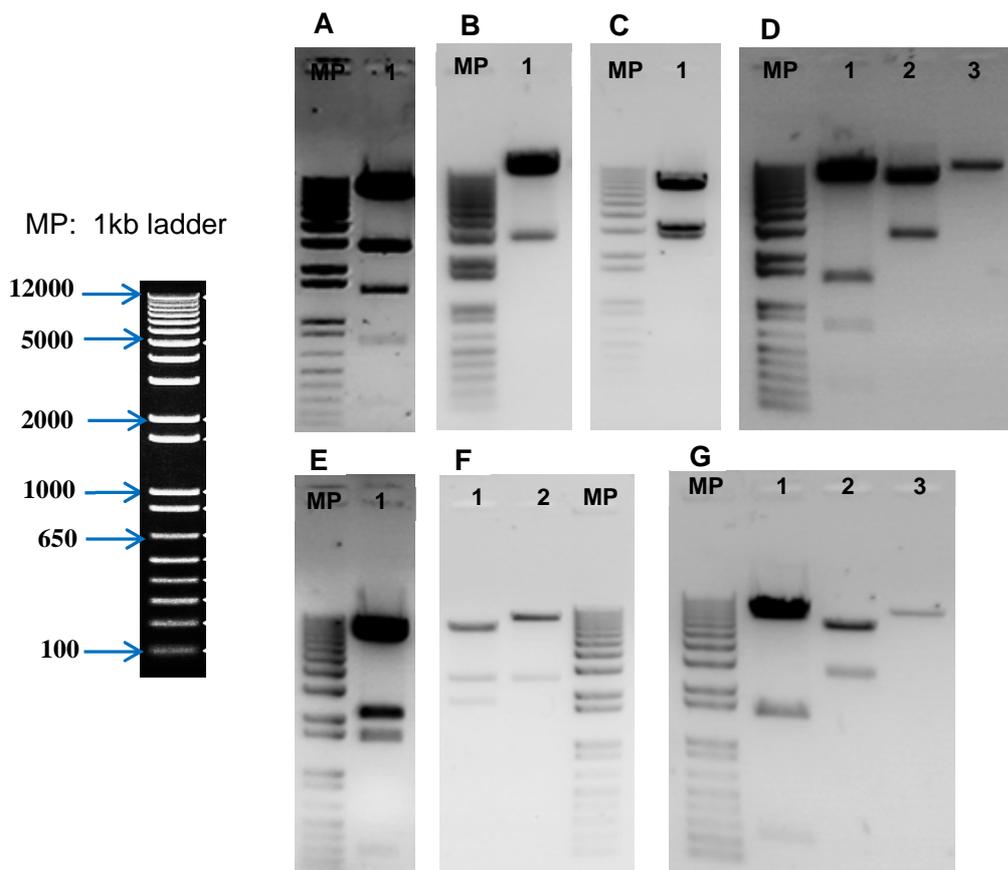
Se seleccionaron enzimas de restricción que generarían un patrón diferencial de cortes entre el plásmido con el gen y sin el gen y se ejecutó un perfil de restricción para cada uno de ellos (Figura 3-15). La tabla 3-5 muestra los fragmentos esperados para cada perfil.

**Tabla 3-5:** Perfil de restricción esperado para la digestión de los vectores.

Vector	Enzima	No. Fragmentos	Tamaños (bp)
E-IGP	AseI	5	7562,2701,1141,737,251
E-IGP mod.	AseI	4	7543, 1442,738,251
E-IGP	XmiI	3	6860, 3147,2742
E-IGP mod.	XmiI	2	7287, 2744
E-IGP	PvuI	2	10030, 2722
E-IGP mod.	PvuI	1	10030
BAR-IGP	AseI	4	7562, 2090, 1547,251
BAR-IGP mod.	AseI	3	6929, 1549,250
BAR-IGP	XmiI	3	6862, 2741, 1905
BAR-IGP mod.	XmiI	2	6044, 2744
BAR-IGP	PvuI	2	8788, 2721
BAR-IGP mod.	PvuI	1	8788

Como se puede observar en la figura 3-15, para cada caso se obtuvo el patrón de bandas esperado. Está es una prueba adicional de que el gen fue eliminado exitosamente de los vectores BAR-IGP y E-IGP, de aquí en adelante denominados BAR-IGP modificado y E-IGP modificado (mod.). Finalmente se mandaron a secuenciar los fragmentos correspondientes a los genes sintetizados, con lo cual se verifico su secuencia y la eliminación del gen *gus* de los vectores de trabajo.

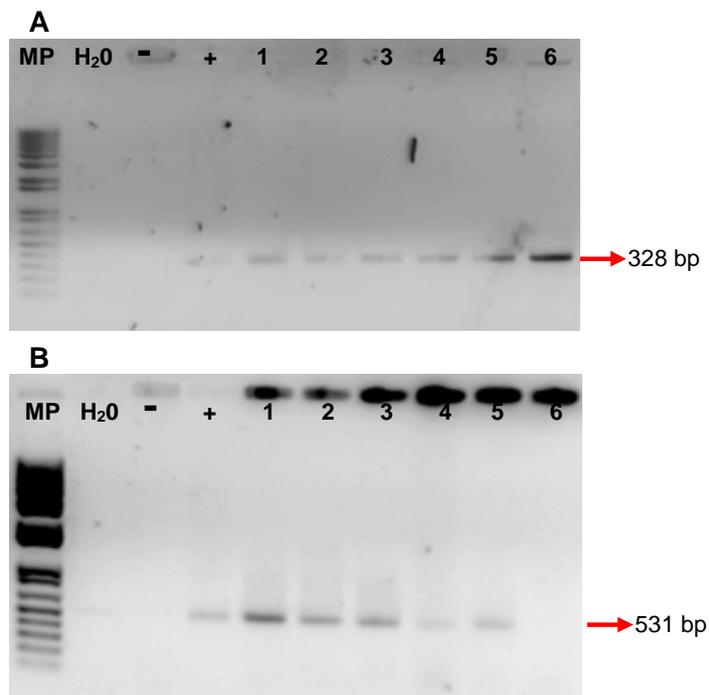
**Figura 3-15:** Perfil de Restricción de los vectores modificados y sin modificar. Vector E-IGP A. Digestión con AseI, B. Digestión con XmiI, C. Digestión con PvuI,. D. Vector E-IGP modificado, Carril 1: Digestión con AseI, 2: Digestión con XmiI, 3: Digestión con PvuI,. Vector BAR-IGP E. Digestión con AseI, F. Carril 1: Digestión con XmiI, 2: Digestión con PvuI,. G. Vector BAR-IGP modificado, Carril 1: Digestión con AseI, 2: Digestión con XmiI, 3: Digestión con PvuI.



### 3.3.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se transformó la cepa LBA4404 con los vectores Bar-IGP mod. y E-IGP mod. Se efectuaron PCRs sobre seis colonias cultivadas sobre medio con antibiótico de selección. La Figura 3-16 muestra la visualización de la reacción de amplificación en gel de agarosa. Para el vector E-IGP mod. se utilizaron los primers para el promotor Gmubi y se observó el amplicón esperado de 328 bp en las seis colonias (Fig. 3-16 A). Para el vector Bar-IGP se utilizaron los primers para el gen *bar*, también se observó el amplicón de 531 bp esperado en las cinco de seis colonias. Estos resultados muestran que el plásmido fue exitosamente introducido en la bacteria. Estas Bacterias fueron las que se utilizaron para los experimentos de transformación de *Nicotiana benthamiana*.

**Figura 3-16:** Visualización PCRs de colonia de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas con: A. E-IGP mod. (primers Gmubi, amplicón esperado 328 bp) MP: marcador de peso molecular 12kb, - : control negativo +: control positivo, 1 a 6: colonia 1 a 6. B. BAR-IGP mod. (primers BAR-IGP, amplicon esperado 531 bp).



### 3.4 Evaluación de la funcionalidad de los genes

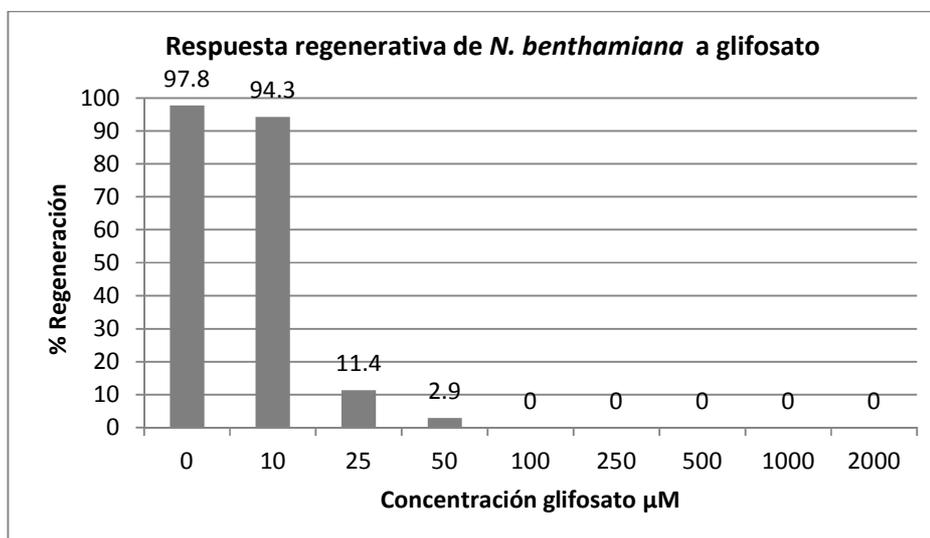
#### 3.4.1 Curvas de selección con herbicidas para *Nicotiana benthamiana*

- Curva de selección para glifosato

El glifosato ha sido utilizado como marcador de selección en varias especies de plantas como arroz, maíz, algodón y trigo, utilizando concentraciones en el medio de cultivo que varían entre 0.5mM y 10mM. También ha sido utilizado como marcador de selección en *N. tabacum* (Akbarzadeh *et al.*, 2010), aunque en la mayoría de los reportes para esta especie, el gen que confiere tolerancia a glifosato es utilizado como gen de interés y la selección de plantas transformadas es realizada con antibióticos (Wang *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2001). Para *N. benthamiana* no se encontró información, las concentraciones utilizadas para la curva de selección se tomaron con base a la información encontrada para *N. tabacum*.

En este trabajo se evaluó el efecto del herbicida sobre la regeneración de *N. benthamiana* utilizando glifosato a concentraciones de 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M.

En el tratamiento control se observaron los primeros brotes hacia la cuarta semana después de haber sido sembrados, con un porcentaje de regeneración del 98% (figura 3-17). Los explantes sembrados en la concentración más baja tuvieron un comportamiento muy similar en cuanto a regeneración, los regenerantes se observaban saludables y de buen color (figura 3-18), indicando que esta concentración no afecta su desarrollo.

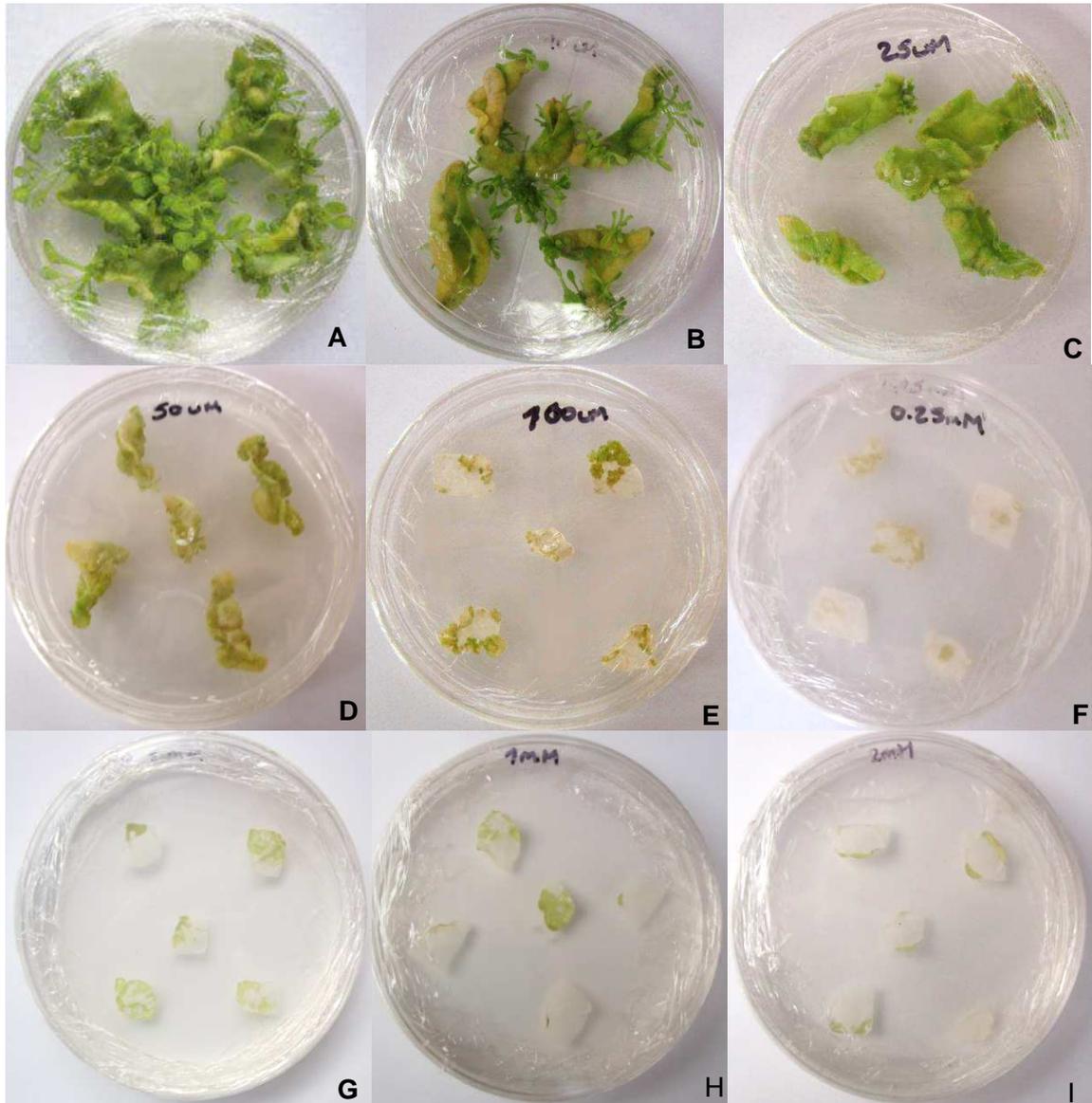
**Figura 3-17:** Respuesta regenerativa de *N. Benthamiana* frente a glifosato.

A 25  $\mu\text{M}$ , 85.7% explantes mostraron un color verde pálido, y hubo un porcentaje de regeneración del 11.4% de regeneración, lo regenerantes encontrados eran pequeños y débiles.

En 50  $\mu\text{M}$ , 57.1 % de los explantes se volvieron blancos, y el 42.9% mostraron un color verde pálido, hubo un porcentaje de regeneración del 2.85%, y se observó solo un solo regenerante con aspecto débil. Se ha reportado que las células de explantes de hoja de tabaco tratadas con esta concentración de glifosato muestran desintegración de las membranas tilacoidales (Ye et al., 2003), lo que es consistente con la gran cantidad de explantes blancos encontrados en este tratamiento.

En 100  $\mu\text{M}$ , 48.5 % de los explantes mostró un color verde pálido, 36.4 % se volvieron blancos con pequeñas zonas color verde pálidas, y el 15.1 % de los explantes se volvieron totalmente blancos. A pesar de que Akbarzadeh *et al.* (2010) reportan el uso de una concentración de 0.1mM para seleccionar plantas transgénicas de *N. tabacum*, los resultados de este trabajo indican que para *N. benthamiana* esta concentración inhibe totalmente la regeneración.

**Figura 3-18:** Efecto del glifosato sobre la regeneración de explantes de hoja de *Nicotiana benthamiana*. Fotos 4ª semana: A. control B. glifosato 10 $\mu$ M, C. glifosato 25 $\mu$ M D. glifosato 50 $\mu$ M, E. glifosato 100 $\mu$ M, F. glifosato 250 $\mu$ M, G. glifosato 500 $\mu$ M, H. glifosato 1000 $\mu$ M, I. glifosato 2000 $\mu$ M.



Los resultados encontrados también son congruentes con lo reportado por Wang *et al.* (2003). Estos autores evaluaron la tolerancia al herbicida en discos de hoja

utilizando concentraciones de 0.05 mM (50  $\mu$ M), 0.2 mM (200  $\mu$ M), 0.4 mM (400  $\mu$ M), y 0.8 (800  $\mu$ M) mM, y encontraron que el material no transformado se ve afectado desde la concentración más baja

A 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M, los explantes se tornaron blancos desde la segunda semana de siembra y no se registró regeneración, lo que es consistente con los reportes de Roudsari *et al.* (2009), Wang *et al.* (2003) y Yan *et al.* (2011) para *N. tabacum*. Con base en estos resultados, se decidió utilizar 25  $\mu$ M de glifosato como concentración de selección.

- Curva de selección para glufosinato

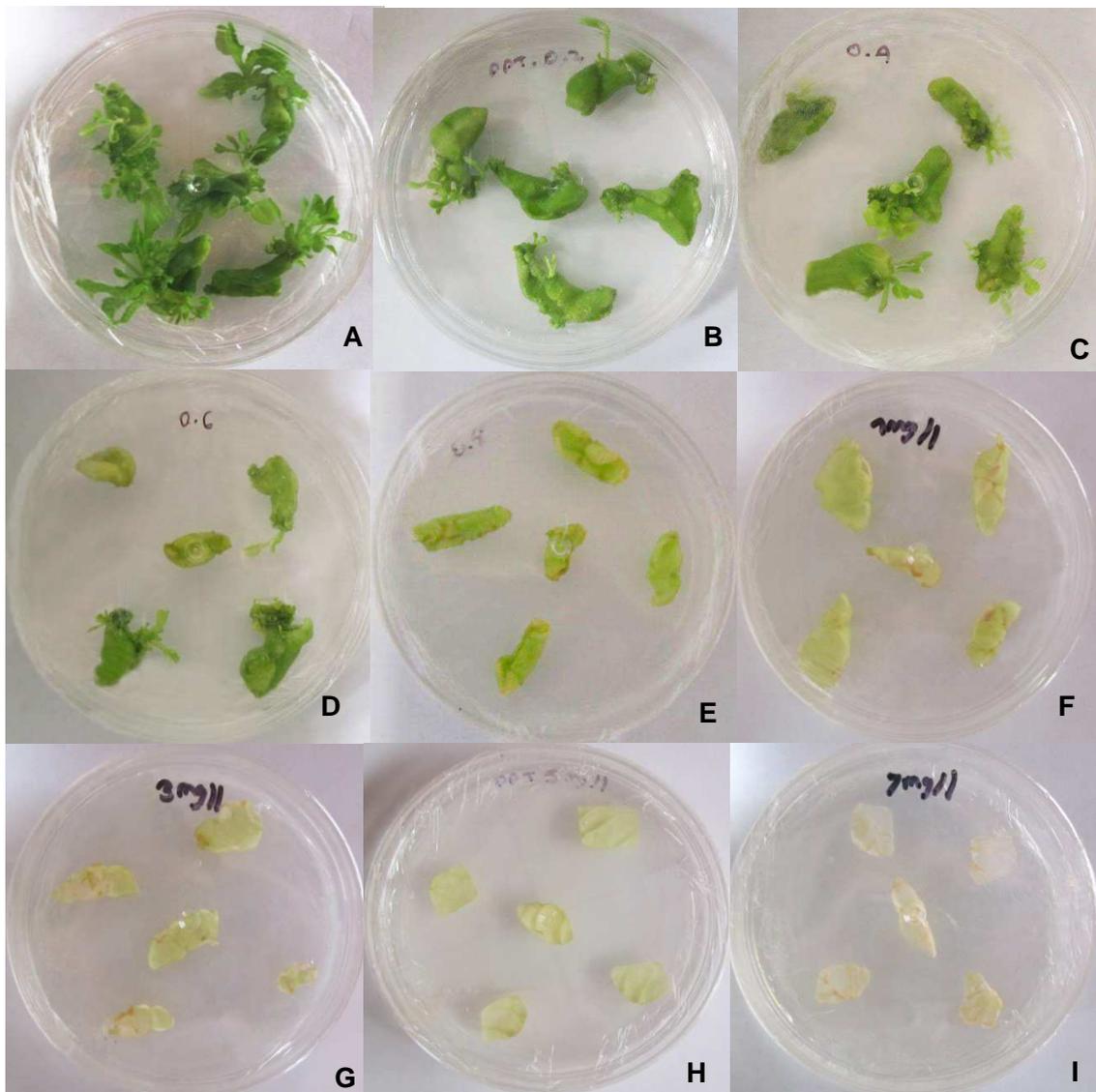
El glufosinato o fosfinotricina (PPT) ha sido utilizado extensamente como marcador de selección en varias especies de plantas. Para evaluar la regeneración de *N. benthamiana* frente a este herbicida y utilizarlo como agente de selección, se sembraron explantes de hoja sobre medio de regeneración con diferentes concentraciones de PPT. Dado que no se encontró información específica sobre el uso de este herbicida como agente de selección para *N. benthamiana*, las concentraciones utilizadas se seleccionaron de acuerdo a las reportadas para la especie cercana *Nicotiana tabacum*.

Lutz *et al.* (2001) encontraron que explantes de hoja de *N. tabacum* son sensibles a la PPT en concentraciones desde 4mg/l, en este caso, la PPT bloqueo totalmente la formación de callos. Kang *et al.* (2005, 2006) reportan que una concentración de 5mg/l de PPT es ideal para seleccionar plantas transgénicas de tabaco. Kutty *et al.* (2011) utilizan 1.5 mg/l del herbicida en el medio de selección, mientras que Almeida *et al.* (2005) efectúan la selección germinando semillas To con 3mg/l y 6 mg/l de PPT.

De acuerdo con estos reportes se escogieron las concentraciones 1, 3, 5 y 7 mg/l como puntos iniciales de la curva de selección. Con todas las concentraciones de PPT

se observó inicialmente el marchitamiento y finalmente muerte del explante (figura 3-19).

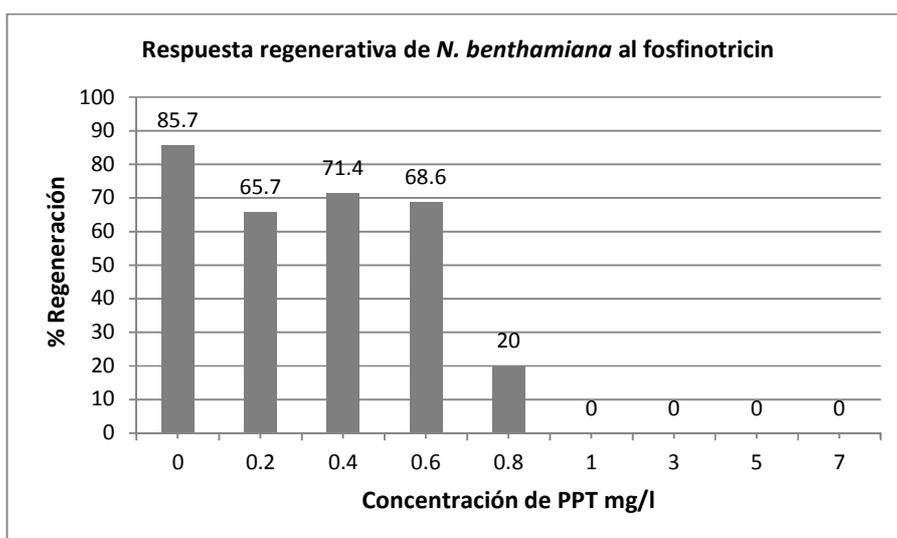
**Figura 3-19:** Efecto de la fosfinotricina sobre la regeneración de explantes de hoja de *Nicotiana benthamiana*. A. Control, B. PPT 0.2 mg/l, C. PPT 0.4 mg/l, D. PPT 0.6 mg/l, E. PPT 0.8 mg/l, F. PPT 1.0 mg/l, G. PPT 3.0 mg/l, H. PPT 5.0 mg/l, I. PPT 7.0 mg/l.



Según Lutz *et al.* (2001) los explantes de *N. tabacum* cultivados sobre medio con concentraciones de PPT superiores a 4mg/l se tornan blancos, para *N. benthamiana* este efecto se observó desde 1 mg/l. En todas las concentraciones probadas no se observó regeneración, mientras que en el tratamiento control la regeneración fue de 85.7% y desde la tercera semana se notaron brotes.

Se hizo un segundo ensayo, utilizando concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/l de PPT, más las previamente probadas. Con todas las concentraciones menores a 1mg/l los explantes mostraron un aspecto muy semejante al tratamiento control. En los tratamientos 0.2, 0.4 y 0.6 mg/l se registró una leve disminución en su capacidad regenerativa, mientras que a 0.8 mg/l la regeneración cayó a 20% (figura3-20). Dado que en las concentraciones superiores no se observa regeneración y hay un gran deterioro del explante, se tomó la concentración de 0.8 mg/l de PPT como punto de selección.

**Figura 3-20:** Respuesta regenerativa de *N. Benthamiana* a PPT.



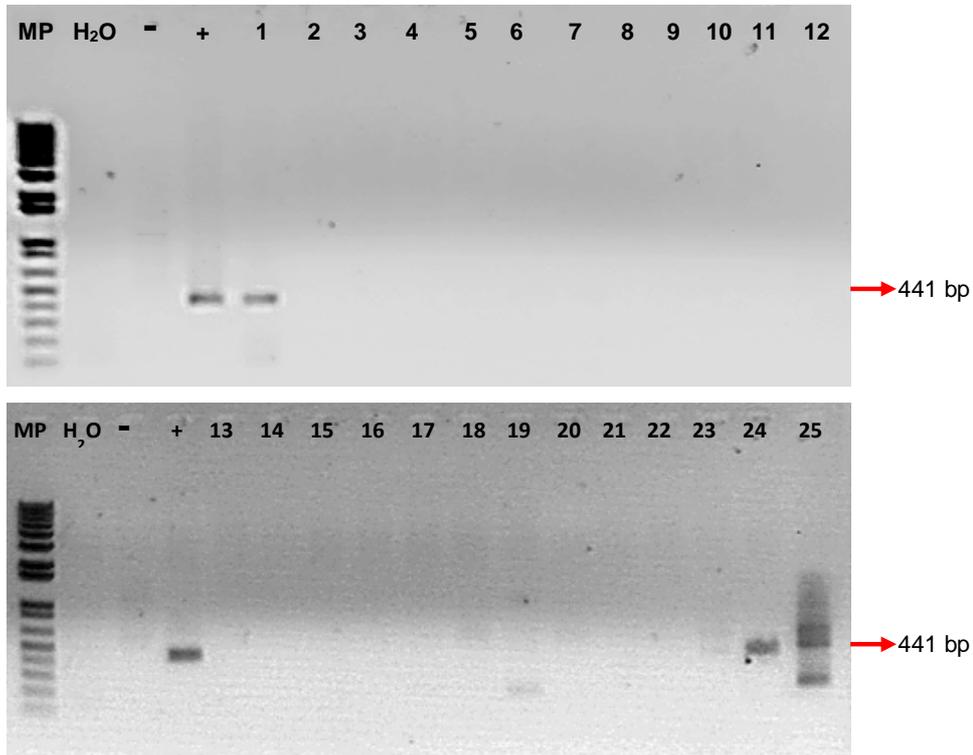
### 3.4.2 Transformación de *Nicotiana benthamiana*

- Transformación de *N. benthamiana* con el gen *cp4 epsps*

Se usaron explantes de hoja de *N. benthamiana* para los ensayos de cocultivo con LBA4404 conteniendo el vector E-IGP mod. A pesar de que se contaba con un protocolo de transformación preliminar, al implementarlo en el laboratorio se observó un alto nivel de contaminación por *A. tumefaciens*. Se hicieron varias modificaciones metodológicas al protocolo original, como aumento en el número y tiempo de lavados para eliminar la bacteria, y disminución de la densidad óptica de la misma. Aunque se lograron obtener plantas, esto solo fue posible mediante cambios muy seguidos del medio de selección, con el fin de evitar el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Se transformaron 60 explantes de hoja de *N. benthamiana* y se obtuvieron 25 regenerantes lo que corresponde a 41.6% de regeneración; los regenerantes se sembraron en medio libre de hormona y glifosato. En los reportes de transformación de tabaco con el gen *cp4 epsps*, utilizan antibiótico como agente de selección (Barry *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2003), o hacen la selección sobre el callo (Ye *et al.*, 2001). En este caso, se utilizó un sistema de regeneración mediante organogénesis directa, y la selección se llevó a cabo durante la etapa de regeneración. De las 25 plantas obtenidas, tres fueron PCR positivas (figura 3-21 carriles 1, 24 y 25), lo que indica un alto porcentaje de escapes, como resultado de una baja presión de selección.

**Figura 3-21:** Caracterización molecular de plantas putativamente transformadas con el gen *cp4 epsps*. MP: marcador de peso molecular 12kb, - : control negativo +: control positivo, 1 a 25: plantas 1 a 25, (primers EPSPS1, amplicón esperado 441 bp).



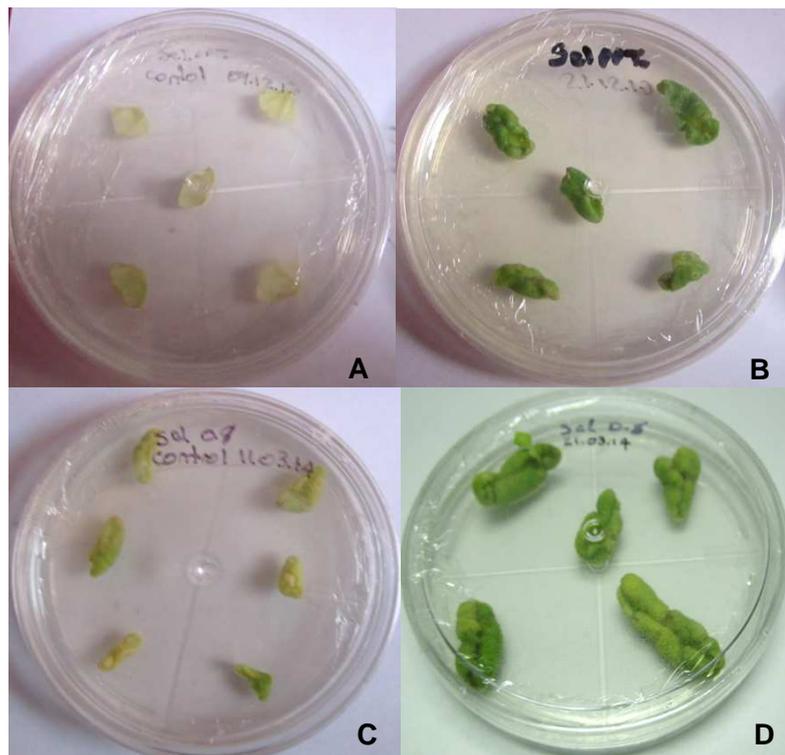
Se ha sugerido que células transformadas localizadas cerca o rodeando células no transformadas proporcionan una protección cruzada a células no transformadas (kutty, 2011), lo que explicaría el alto nivel de escapes. Se sugiere para futuros experimentos, trabajar más la curva de selección de regenerantes de *N. benthamiana* con glifosato.

- Transformación de *N. benthamiana* con el gen *bar*

Se usaron explantes de hoja de *N. benthamiana* para ensayos de cocultivo con LBA4404 que contenía el vector BAR-IGP mod. Se trabajó con dos concentraciones de selección del herbicida, 0.8 mg/l que fue la concentración a la cual los explantes de *N.*

*benthamiana* conservaban su capacidad regenerativa (figura 3-20) y 3 mg/l concentración letal de acuerdo a la curva realizada. El control negativo se vio fuertemente afectado por la concentración más alta de PPT en el medio de selección, los explantes que fueron sometidos a transformación con el vector BAR-IGP mod. mostraron una buena apariencia (figura 3-22 ), indicio de que el constructo diseñado efectivamente podría conferir resistencia al glufosinato. Para el experimento de transformación utilizando selección con 0.8mg/l de PPT, se observó el mismo efecto aunque un poco más atenuado.

**Figura 3-22:** Explantes transformados con el vector BAR-IGP mod. En medio de selección con 3mg/l de PPT A. Control, B. Explantes sometidos a transformación. Y en medio con 0.8 mg/l de PPT C. control, D. Explantes sometidos a transformación.

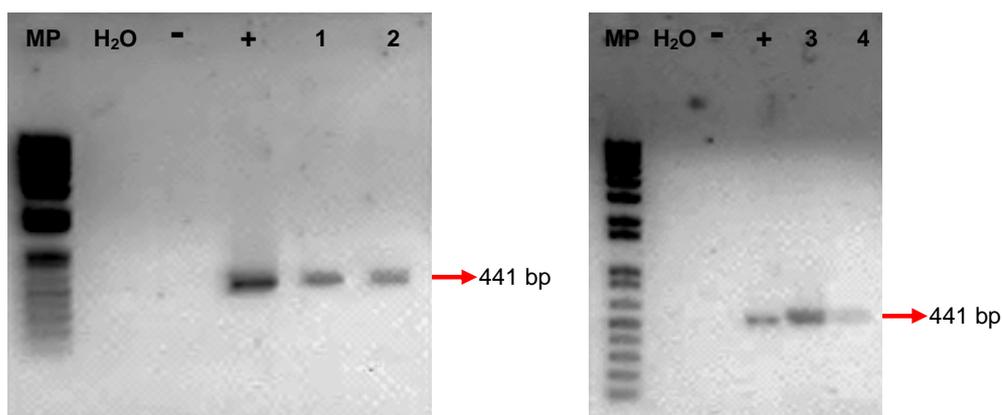


En ambos ensayos solo se obtuvieron dos regenerantes de 50 explantes, lo que corresponde al 4% del total. En ambos sistemas de selección la mayoría de los explantes se perdieron por contaminación, por lo tanto este valor no puede ser

tomado como porcentaje de transformación, ni permite la comparación entre la eficiencia de los dos tipos de selección.

Los cuatro regenerantes fueron transferidos a medio de elongación libre de PPT. Con el objetivo de comprobar si efectivamente los regenerantes obtenidos habían sido exitosamente transformados se estandarizaron las condiciones de PCR directa del material. Las cuatro plantas obtenidas a partir de la transformación con el vector BAR IGP mod. fueron PCR positivas como se muestra en la figura 3-23.

**Figura 3-23:** Caracterización molecular de plantas putativamente transformadas con el gen *bar*. MP: marcador de peso molecular 12kb, - : control negativo +: control positivo, 1,2,3,4: plantas 1,2,3,4,5. (primers BAR-IGP, amplicón esperado 531 bp).



### 3.4.3 Evaluación funcional del gen *cp4 epsps*

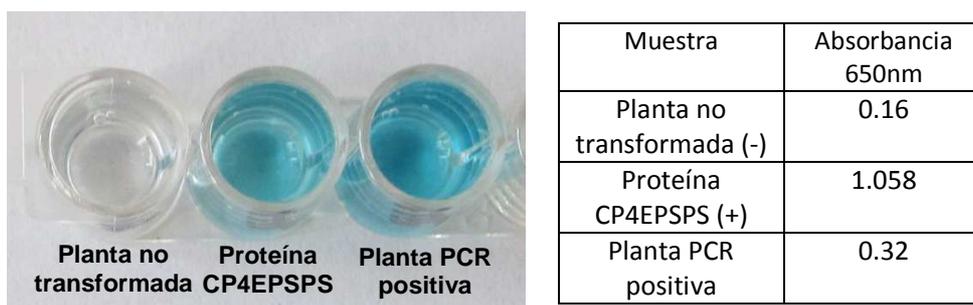
La CP4:EPSPS es la enzima más ampliamente utilizada para conferir tolerancia al herbicida glifosato, y está presente en la mayoría de las líneas transgénicas comerciales con esta característica, puede ser detectada mediante el uso de pruebas comerciales de ELISA. Las modificaciones realizadas sobre la secuencia nucleotídica del gen, no generan ningún cambio en la proteína codificada, entonces es posible

utilizar estas pruebas para validar la funcionalidad de los genes semi-sintéticos diseñados.

Para esta evaluación se tomaron hojas de una planta PCR positiva, utilizando como negativo hojas de una planta no transformada, y como positivo la proteína CP4:EPSPS que viene con el Kit Pathoscreen™ Agdia para la detección de la misma. Como se observa en la figura 3-24 se evidencio la producción de la proteína en la planta transformada (coloración azul), la medición de la absorbancia corroboró estos resultados, según el fabricante valores superiores a 0.3 se consideran positivos. Es necesario tener en cuenta que la prueba utilizada es una prueba cualitativa, por lo cual no es indicativa del nivel de expresión de la proteína.

A pesar de que se evaluó una sola planta, el hecho que el constructo utilizado para la transformación tenga un promotor de origen vegetal, indica que éste sólo podría ser traducido por una planta, por lo cual el resultado de la prueba de ELISA confirma que la planta evaluada efectivamente es transgénica, y permite descartar posibles falsos positivos provenientes del DNA bacteriano.

**Figura 3-24:** Evaluación funcional del gen cp4 epsps mediante la prueba de ELISA.



El resultado obtenido indica que el diseño *in silico* de los constructos génicos produjo genes funcionales. Si bien, la secuencia del gen es ampliamente conocida por conferir

la característica de tolerancia a glifosato, el constructo desarrollado en este trabajo es nuevo y no ha sido utilizado previamente en el desarrollo de plantas transgénicas con tolerancia a glifosato. La secuencia del gen fue optimizada con el uso codónico de la soya, es una secuencia única como lo demostró el blast-n realizado contra la base de datos de nucleótidos del NCBI, en el cual el mayor porcentaje de identidad encontrado fue del 76% (anexo B).

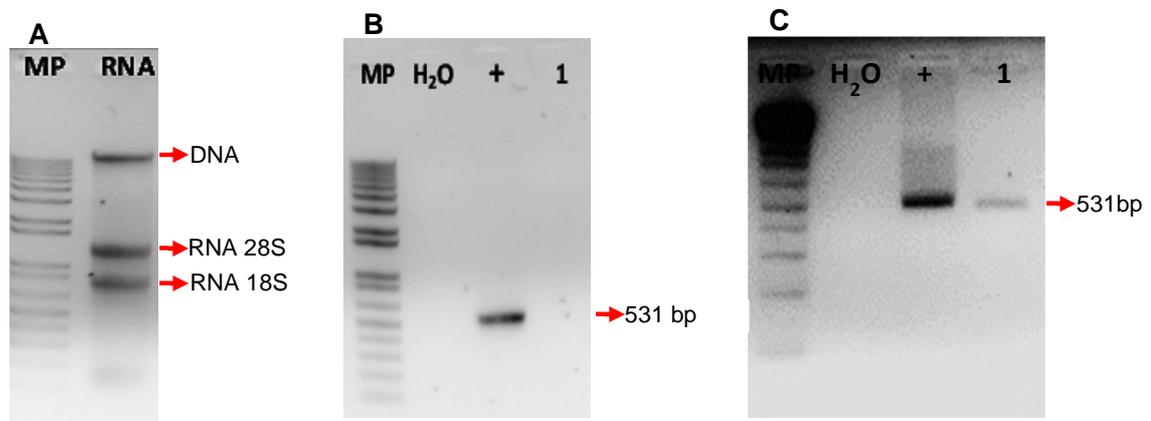
Este gen es dirigido por el promotor Gmubi, que es un promotor constitutivo de soya, y ha mostrado niveles muy altos de expresión en esta planta (Hernandez-Garcia *et al.*, 2009). Aunque los promotores heterólogos son usados a menudo para regular la expresión de transgenes, los factores que regulan los promotores podrían no estar presentes en sistemas heterólogos, hay ejemplos de promotores de ubiquitina que muestran expresión alta en la planta de origen y no en sistemas heterólogos (Hernández-Garcia *et al.*, 2009). Por otro lado, una de las mayores preocupaciones de la opinión pública en cuanto a los cultivos transgénicos es la utilización de secuencias provenientes de bacterias y virus en los constructos, la cual podría mitigarse con el uso de un promotor vegetal.

En cuanto a los constructos E-IGP2 y E-2 cuya funcionalidad solo fue evaluada a nivel bioinformático (figura 3-6), existe una alta probabilidad de que sean igualmente funcionales. El denominado E-IGP2 únicamente difiere con E-IGP mod. en que el gen es dirigido por el promotor 35S, que ha sido ampliamente utilizado en transformación genética de plantas. Todos los demás elementos, incluido péptido de tránsito, secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción y terminador son iguales, mientras que el E-2, es una reconstrucción del constructo utilizado en evento GTS 40-3-2 de soya de Monsanto. Los dos mostraron un resultado idéntico al del constructo E-IGP en el análisis traduccional *in silico*.

### 3.4.4 Evaluación funcional del gen *bar*

La evaluación de la funcionalidad del gen *bar* se realizó mediante RT-PCR. Para ello, se realizó aislamiento de RNA de una planta PCR positiva y se visualizó en gel de agarosa (figura 3-25). Se realizó un proceso de limpieza de la muestra y se descartó la presencia de cualquier remanente de DNA realizando una PCR con primers para el gen *bar* sobre la misma. Como se observa la muestra no amplificó (figura 3-25 B carril 1), indicando que no hay DNA en la misma. Posteriormente se realizó la síntesis del cDNA, y una PCR sobre el cDNA obtenido con los mismos primers. En la figura 3-25 C se observan los resultados de esta amplificación, en el carril 1 se observa un amplicón de 531 bp para la muestra a la misma altura que la banda del control positivo, lo que indica que el constructo genético diseñado se transcribe, siendo esta una evidencia de su funcionalidad.

**Figura 3-25:** Evaluación funcional del gen *bar* mediante RT-PCR. A. extracción de RNA, B. PCR de la muestra antes de la síntesis de DNA, MP: marcador de peso molecular 12kb, H<sub>2</sub>O: control absoluto +: control positivo- DNA de planta PCR positiva, 1: muestra de RNA. C. PCR sobre cDNA, MP: marcador de peso molecular 12kb, H<sub>2</sub>O: control absoluto +: control positivo- DNA de planta PCR positiva, 1: amplificación muestra de cDNA.



Adicionalmente, la expresión fenotípica de tolerancia a la PPT en explantes sometidos a transformación con el vector Bar-IGP mod. (fig 3-22) es una prueba adicional que el casete de expresión está funcionando. En los ensayos de la curva de selección, se observó la muerte de los explantes en el 100 % de los casos cuando se utilizó una concentración de 3 mg/l de PPT en el medio de regeneración (figuras 3-19 y 3-20), igualmente en el control negativo del ensayo de transformación. Una razón para que se hayan podido encontrar explantes saludables y con respuesta regenerativa en el mismo medio es la presencia y funcionalidad del transgen.

Estos resultados son indicativos de que el constructo genético es funcional, sin embargo, es necesario validar la presencia de la proteína PAT, o realizar pruebas fenotípicas sobre la progenie para complementar su validación.

En conjunto, los resultados obtenidos son una evidencia preliminar de la funcionalidad de dos de los cinco constructos diseñados. Si bien, no se evaluaron funcionalmente los tres constructos génicos restantes, el análisis traduccional *in silico* mostró la traducción de la proteína esperada, por lo cual es muy probable que sean funcionales *in vivo*. Por esta razón, se espera que los constructos diseñados puedan ser utilizados en experimentos de transformación genética de variedades colombianas de soya. Adicionalmente, los constructos diseñados no están cubiertos por patentes en Colombia, lo cual es un aspecto importante, para el desarrollo de líneas transgénicas con fines de liberación comercial.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

- Los genes y elementos reguladores utilizados en los constructos diseñados no fueron protegidos por patentes en Colombia, por lo cual, podrían ser usados para desarrollos comerciales en el territorio nacional.
- La metodología utilizada para el diseño de genes semi-sintéticos permitió la obtención de constructos funcionales.
- La evaluación funcional del constructo génico para la característica tolerancia a fosfotricina indica que se está generando el transcripto, y en conjunto con la evaluación fenotípica de los explantes transformados, permiten inferir que el constructo es funcional.
- La evaluación funcional del constructo génico para la característica tolerancia a glifosato indica que efectivamente expresa la proteína CP4:EPSPS, por lo cual podría utilizarse en futuros experimentos de transformación genética de soya.
- Se lograron diseñar genes semi-sintéticos que confieren la característica de tolerancia a herbicidas y que cumplen con el concepto de libertad de operación para Colombia.

## 4.2 Recomendaciones

- La selección con 25  $\mu$ M del herbicida glifosato en el sistema de transformación de *N. benthamiana* originó un número alto de escapes, por lo cual se sugiere utilizar una concentración más alta.
- Aunque se realizó la validación funcional de todos los constructos a nivel bioinformático, para la validación funcional de las versiones semi-sintéticas de los genes *cp4 epsps* y *bar* solo se trabajó con una versión de cada uno. Se recomienda efectuar la evaluación de la funcionalidad de los constructos restantes.

## A. Anexo: Secuencias de los constructos génicos diseñados

>E-IGP

CGACGGTAGGTCGACAGGGCCCAATATAACAACGACGTCGTAACAGATAAAGCGAAGCTTGAAGGTGCATGTGACTCCGTC  
AAGATTACGAAACCGCCAACCTACCACGCAAATTGCAATTCCTAGAAAGACTCTCCGAAAATGCATCCAATACCAA  
ATATTACCGGTGCATAGGCACCAAGTGACACCATACATGAACACGCGTCACAATATGACTGGAGAAGGGTCCACACCTTA  
TGCTATAAAACGCCCCACACCCCTCCTCCTTCGAGTTCAATTCGAATATATTCCATTCTCTGTGTATTTCCCTACCTCT  
CCCTCAAGGTTAGTCGATTTCTTCTGTTTTCTTCTCGTTCTTTCCATGAATTGTGTATGTTCTTGTATCAATACGATGTTGAT  
TTGATTGTGTTTTGTTGGTTTCATCGATCTTCAATTTTCATAATCAGATTGAGCTTTTATTATCTTTACAACAACGTCCTTAATT  
TGATGATTCTTAAATCGTAGATTTGCTCTAATTAGAGCTTTTTCATGTCAGATCCCTTTACAACAAGCCTTAATTGTTGATTCAT  
TAATCGTAGATTAGGGCTTTTTTCATTGATTACTTCAGATCCGTTAAACGTAACCATAGATCAGGGCTTTTTTCATGAATTACTT  
CAGATCCGTTAAACAACAGCCTTATTTTTATACTTCTGTGGTTTTCAAGAAATTGTTGAGATCCGTTGACAAAAAGCCTTAT  
TCGTTGATTCTATATCGTTTTTCGAGAGATATTGCTCAGATCTGTTAGCAACTGCCTTGTGTTGATTCTATTGCCGTGGATT  
AGGGTTTTTTTTACGAGATTGCTTCAGATCCGACTTAAGATTACGTAATGGATTTTGATTCTGATTATCTGTGATTGTTGA  
CTCGACAGCTCGAGCGAATGGCACAGATTAACAACATGGCTCAAGGCATCCAGACACTTAATCCAATTCACACTCCATAA  
GCCCCAAGTACCTAAAAGCTCAAGTTTTCTGTTTTGGATCTAAAAAGCTGAAAAATTCAGCAAATTCTATGTTGGTTTTGAA  
AAAGGATTCAATTTTTATGCAAAAGTTTTGTTCTTTAGGATTTGAGCATCAGTGGCTACAGCCTGCATGTCGCACGGAGCGT  
CCTCAAGGCTGCCACTGCGAGAAAATCTAGCGGACTTAGTGGCACTGTGAGAATCCCGGGGGACAAAAGTATTTCTCATA  
GATCTTTTCATGTTTGGTGGATTGGCTAGTGGAGAGACCCGAATCACGGGACTGCTCGAAGGAGAAGATGTGATCAATACCG  
GAAAAGCTATGCAAGCCATGGGGGCGAGGATTAGAAAGGAGGGAGACACTTGGATAATTGATGGAGTTGGAAATGGAGG  
CCTGCTGCACCTGAAGCTCCGTTGGATTTGCGAAATGCAGCCACCGGATGCCGCTCACCATGGGGCTGTAGGCGTGTAC  
GATTTGATAGTACATTTATAGGAGATGCTTCTTTGACAAAAAGGCCATGGGAAGAGTTCTTAACCCATTGAGGGAGATGG  
GTGTTCAAGTGAAGTCAGAGGATGGAGATAGATTGCCTGTCACCTTCGGGGACCTAAGACACCTACACCAATCACTTACCG  
CGTGCCTATGGCTAGTGCAGCAAGTCAAGAGCGCAGTGTGCTCGCTGGATTGAACACACCTGGGATAACGACCGTGATTGA  
ACCTATCATGACAAGGGATCATACTGAGAAAATGCTGCAAGGCTTCGGAGCCAATCTGACAGTTGAGACAGATGTGACGG  
CGTGCAGACAATTAGGTTGGAAGGACGCGGAAAGTTAACTGGCCAAGTAATCGACGTCCCCGGCGACCCTAGCAGTACTGC  
CTTCCCTCTCGTTGCTGCGCTGTTGGTGCCCGGCTCTGATGTCACCATCTTGAACGTGCTCATGAACCCTACACGGACTGGGC  
TAATCCTGACACTACAAGAGATGGGCGCTGACATTGAAGTGATTAATCCAAGACTAGCCGGTGGTGAAGATGTCGCTGACC  
TACGAGTTAGGAGCTCTACTCTAAAGGCGTACTGTCCAGAAGACCGGCTCCATCTATGATTGATGAGTACCCAATACT  
GGCCGTGCTGCTGCCTTTGCTGAAGGAGCTACCGTCATGAACGGGCTCGAAGAGTTGAGGGTGAAGGAGTCCGACAGACT  
TTCCGCGTTGCTAACGGGCTGAAGCTTAACGGTGTAGATTGCGACGAAGGCGAAACCAGCTTGGTCTGTAGAGGACGTCC  
AGATGGTAAGGGGCTTGAAACGCATCCGGGGCTGCGGTTGCTACGCATCTCGATCACCGTATAGCTATGTCCTTCTGGTA  
ATGGGACTTGTCTGAGAATCCGGTTACAGTTGATGACGCTACTATGATAGCAACCAGTTTCCCGAGTTCATGGATTTAAT  
GGCGGGTCTCGGAGCTAAGATTGAACTCTGACACAAAAGCGGCGTAATGAGCTCTCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTT  
TCTTAAGATTGAATCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACA  
TGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTAATACGCGATAGAAAAACAA  
ATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGATCGGCTCGAGCTCGAGGTAAGTGTGC

>E-IGP2

CGACGGTAGGTCGACAAGCTTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCGTAAAGACTGGCGAACA  
GTTACATACAGAGTCTCTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCA  
AAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGG

ATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATA  
AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAA  
AAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCA  
CTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGAATGGCACAGAT  
TAACAACATGGCTCAAGGCATCCAGACACTTAATCCCAATTCCAACCTCCATAAGCCCCAAGTACCTAAAAGCTCAAGTTTTCT  
TGTTTTGGATCTAAAAAGCTGAAAAATTCAACAAATCTATGTTGGTTTTGAAAAAGGATTCAATTTTTATGCAAAAAGTTTTG  
TTCCTTAGGATTCAGCATCAGTGGCTACAGCCTGCATGTGCGACGGAGCGTCTCAAGGCCTGCCACTGCGAGAAAATCT  
AGCGGACTTAGTGGCACTGTGAGAATCCCGGGGGACAAAAGTATTTCTCATAGATCTTTCATGTTTGGTGGATTGGCTAGTG  
GAGAGACCCGAATCACGGGACTGCTCGAAGGAGAAAGATGTGATCAATACCGGAAAAGCTATGCAAGCCATGGGGGCGAG  
GATTAGAAAGGAGGGAGACACTTGGATAATTGATGGAGTTGGAAATGGAGGCCTGCTTGACCTGAAGCTCCGTTGGATT  
CGGAAATGCAGCCACCGGATGCCGCCTCACCATGGGGCTGTAGGCGTGTACGATTTGATAGTACATTTATAGGAGATGCT  
TCTTTGACAAAAGGCCATGGGAAGAGTTCCTAACCCATTGAGGGAGATGGGTGTTCAAGTGAAGTCAGAGGATGGAGAT  
AGATTGCCTGTCACCTTCGGGGACCTAAGACACCTACACCAATCACTTACCGCGTGCCTATGGCTAGTGCGCAAGTCAAGA  
GCGCAGTGTGCTCGCTGGATTGAACACACCTGGGATAACGACCGTATTGAACCTATCATGACAAGGGATCATACTGAGA  
AAATGCTGCAAGGCTTCGGAGCCAATCTGACAGTTGAGACAGATGCTGACGGCGTGCGGACAATTAGGTTGGAAGGACGC  
GGAAAGTTAACTGGCCAAGTAATCGACGTCCCGGGACCTAGCAGTACTGCCTCCCTCTCGTTGCTGCGCTGTTGGTGC  
CCGGCTCTGATGTCACCATCTGAACGTGCTCATGAACCTACACGGACTGGGCTAATCCTGACACTACAAGAGATGGGCGC  
TGACATTGAAGTGATTAATCCAAGACTAGCCGGTGGTGGAGATGTCGCTGACCTACGAGTTAGGAGCTACTCTTAAAGGC  
GTGACTGTCCAGAAGACCGCTCCATCTATGATTGATGAGTACCAATACTGGCCGTCGCTGCTGCCTTGTGAAGGAG  
CTACCGTATGAACGGGCTCGAAGAGTTGAGGGTGAAGGAGTCCGACAGACTTCCGCGGTTGCTAACGGGCTGAAGCTTA  
ACGGTGTAGATTGCGACGAAGGCGAAACCAGCTTGGTCTTAGAGGACGTCCAGATGGTAAGGGGCTTGAAACGCATCC  
GGGGCTGCGGTTGCTACGCATCTCGATCACCGTATAGCTATGCTCTTCTGGTAATGGGACTTGTTCTGAGAATCCGGTTAC  
AGTTGATGACGCTACTATGATAGCAACCAGTTTCCCGAGTTCATGGATTTAATGGCGGGTCTCGGAGCTAAGATTGAACCT  
TCTGACACAAAAGCGGCGTAATGAGCTCTGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT  
GCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATG  
GGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGAAACTAGGATAAATTA  
CGCGCGGGTGCATCTATGTTACTAGATCGGCTGCAGGACTGTGCG

>E-2

CGTCAGAGTCGACAGAGATAGATTTGTAGAGAGAGACTGGTGAATTCAGCGTGTCTCTCCAATGAAATGAACTTCTTAT  
ATAGAGGAAGGTCTTGCGAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATACACATCAATCCACTTGCTT  
TGAAGACGTGGTTGGAACGCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATCTTTGGGACCCTGTCGGCAGAG  
GCATCTTGAACGATAGCCTTCTTTATCGCAATGATGGCATTGTAGGTGCCACCTTCTTTTCTACTGTCCTTTTATGAAAT  
GACAGATAGCTGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTCCCGATATTACCCTTGTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCT  
GAGACTGTATCTTTGATATTTGGAGTAGACGAGAGTGTGCTGCTCCACCATGTTATCACATCAATCCACTTGTCTTGAAGA  
CGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATCTTTGGGACCCTGTCGGCAGAGGCATCTT  
GAACGATAGCCTTCTTTATCGCAATGATGGCATTGTAGGTGCCACCTTCTTTTCTACTGTCCTTTTATGAAAGTACAGAG  
TAGCTGGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTGTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACT  
GTATCTTTGATATCTTGGAGTAGACGAGAGTGTGCTGCTCCACCATATGGCACAATAACAACATGGCTCAAGGGATACA  
AACCTTAATCCCAATTCGAATTTCCATAAACCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGTTTTCTGTTTTGGATCTAAAAACTGAAA  
AATTCAGCAAATCTATGTTGGTTTTGAAAAAGATTCAATTTTTATGCAAAAAGTTTTGTTCTTTAGGATTTGAGCATCAGTG  
GCTACAGCCTGCATGTGCGACGGTGAAGCAGCCGCGCCGAACCGCCGCAATCCTTGCCCTTCCGGAACCGTCCGCA  
TTCCCGGCGACAAGTGCATCTCCACCGTCTTATGTTGCGCGTCTCGCGAGCGGTGAAACGCGCATCACCGGCCCTTCT  
GGAAGCGGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGCGCCAGGATCCGTAAGGAAGGCGACACCTGG  
ATCATCGATGGCGTCCGCAATGGCGGCCTCCTGGCGCCTGAGGCGCCGCTCGATTTCCGCAATGCCGCCACGGGCTGCCGC  
CTGACCATGGGCTCGTCCGGGCTACGATTTGACAGCACCTTTCATCGGCGACGCTCGCTCACAAGCGCCCGATGGGCC  
GCGTGTGAAACCGCTGCGCGAAATGGGCGTGCAGGTGAAATCGGAAGACGGTGACCGTCTTCCCGTTACCTTGCAGCGGGC  
CGAAGACGCGACCGGATCACCTACCGCGTCCGATGGCCTCCGCACAGGTGAAGTCCGCGTGTGCTCGCCGCGCTCA  
ACACGCGCGGATCACGACGGTATCGAGCCGATCATGACGCGGATCATACGGAAGAAGTCTTCAAGGCTTTGGCGCA  
ACCTTACCGTGCAGACGGATGCGGACGGCTGCGCACCATCCGCTGGAAGGCCGCGCAAGCTCACCGCCAAGTATCG  
ACGTGCCGGGCGACCCGCTCGACGGCTTCCCGTGGTTGCGGCCCTGCTTGTCCGGGCTCCGACGTACCATCCTCAAC

GTGCTGATGAACCCACCCGCACCGCCTCATCTGACGCTGCAAGAAATGGGCGCCGACATCGAAGTCATCAACCCGCGCC  
 TTGCCGGCGCGAAGACGTGGCGGACCTGCGCGTTCGCTCCTCCACGCTGAAGGGCGTCACGGTGCCGGAAGACCGCGCG  
 CCTTCGATGATCGACGAATATCCGATTCTCGTGTGCGCCGCCCTTCGCGGAAGGGGCGACCGTGATGAACGGTCTGGAA  
 GAACTCCGCGTCAAGGAAAGCGACCGCCTCTCGGCCGTCGCAATGGCCTCAAGCTCAATGGCGTGGATTGCGATGAGGGC  
 GAGACGTGCTCGTGTGCGCGGCCCTGACGGCAAGGGGCTCGGCAACGCCTCGGGCGCCGCTGCCACCCATCTC  
 GATCACCGCATCGCCATGAGCTTCTCGTATGGGCCTCGTGTGCGAAAACCCTGTCACGGTGGACGATGCCACGATGATCG  
 CCACGAGCTTCCCGAGTTCATGGACCTGATGGCCGGGCTGGGCGCAAGATCGAACTCTCGGATACGAAGGCTGCCTGAT  
 TAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGT  
 AATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATA  
 TAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTATCTATGTTACTAGATCGGGCTGCAGGTACTAGC

>Bar-IGP

GCAGTCGTGTCGACTCAGTCATCAAAATATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAATCAACAAGGTACGAGCCATATCACTTT  
 ATCAAATTTGGTATCGCCAAAACCAAGAAGGAACTCCCATCCTCAAAGGTTTGAAGGAAGAATTCTCAGTCAAAGCCTCA  
 ACAAGGTACGGTACAGAGTCTCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTCAATCAAAGTAAACTA  
 CTGTTCCAGCACATGCATCATGGTCAAGTAAAGTTTCAGAAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAA  
 AGTAATCTTGCAACATCGAGCAGCTGGCTTGTGGGGACCGAGCAAAAAAGGAATGGTGCAGAATTGTTAGGCGCACCTAC  
 CAAAAGCATCTTTGCTTTATTGCAAAGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAGTGGGGAACAAAATAACGTGGAAGAGCT  
 GTCCTGACAGCCACTACTAATGCGTATGACGAACGAGTACGACCCAAAAGAATTCCCTCTATATAAGAAGGCATTCA  
 TTCCATTTGAAGGATCATCAGATACTAACCAATATTTCTCACACAGAAACATTCGAAAAACAAAATCCAGTATCAAATTC  
 TTCTCTTTTTTATATTTGCAAAGACCTCGAGTGCATGAGTCCAGAGAGGCGTCTGCCGATATTAGGCGAGCCACCGAAG  
 CCGATATGCCAGCTGTGTACTATCGTGAACCATTACATCGAAACATCCACCGTAAATTTGAGAACAGAACCAAGAACC  
 GCAAGAGTGGACTGACGATCTCGTTAGGCTTAGAGAAAAGATACCCATGGTTAGTTCGCTGAAGTGCATGGTGAAGTGGCGG  
 GTATAGCGTATGCTGGTCTTGGAAAGGCTAGAAAACGCTTACGATTGGACGGCTGAAAGCACAGTTTATGTATCCCAAGGCA  
 TCAACGTACGGGATTAGGTTCTACATTATACACTACCTACTCAAAGTTTAGAAGCCCAAGGTTTCAAGTCTGTGGTGCCTG  
 TGATTGGATTACCAATGATCCTAGCGTTAGAATGCATGAAGCGCTTGGGATGCACCACGAGGCATGTTGCGTGCCGCGG  
 GATTCAAACATGGTAACTGGCATGATGTGGGATTTGGCACTAGACTTTAGTTTGCCTGTGCCTCTAGGCCCGTATTGCC  
 GTTACAGAGATTTAAATTATGGCATTGGGAAAACGTTTTCTGTACCATTTGTTGTGCTTGAATTTACTGTGTTTTTATTC  
 GGTTCGCTATCGAACTGTGAAATGGAATGGATGGAGAAGAGTTAATGAATGATATGGTCTTTTGTTCATTCTCAAATTA  
 ATATTTGTTTTTCTCTATTTGTTGTGTGTTGAATTTGAAATTAAGAGATATGCAAACATTTGTTTTGAGTAAAAATG  
 TGTCAAATCGTGGCCTCAATGACCGAAGTTAATATGAGGAGTAAAACATCCCAAACCTCGAGCTGCAGTACTAGC

>Bar-2

CGCTCGAGTCGACAGCTTATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAAGTACGCGTAAAGACTGGCGAACAGTT  
 CATACAGAGTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGCAACATGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAA  
 AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGAT  
 TCCATTGCCAGCTATCTGCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAA  
 GGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAA  
 GAAGACGTTCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT  
 ATCCTTCGAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACTCGATGAGCCCA  
 GAACGACGCCCCGCCGACATCCGCCGTGCCACCGAGGCGGACATGCCGGCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCGAG  
 ACAAGCACGGTCAACTCCGTACCGAGCCGACAGGAACCGCAGGAGTGGACGAGACCTCGTCCGTCTGCCGGAGCGCTAT  
 CCCTGGCTCGTCCGAGGTTGACGGCGAGGTCGCCGGCATCGCTACGCGGGCCCTGGAAGGCACGCAACGCCTACGA  
 CTGGACGGCCGAGTCTACAGTGTACGTCTCCCCCGCCACAGCGGACGGGACTGGGCTCCACGCTCTACACCCACCTGCTG  
 AAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTTCAAGAGCGTGGTGTGCTGTATCGGGCTGCCAACGACCCGAGCGTGGCATGACGAG  
 GCGCTCGGATATGCCCCCGCGGCATGCTGCGGGCGCGGCTTCAAGCACGGGAACTGGCATGACGTGGGTTTCTGGCAG  
 CTGGACTTCAAGCTGCCGGTACCGCCCGTCCGGTCTGCCCGTCAACGAGATCTGATAATTCGGGGGATCTGGATTTTGT  
 ACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTATTTTACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTTCTATATG  
 CTCAACACATGAGCGAAACCTATAGGAACCTAATTCCTTATCTGGAACTACTCACACATTATTATGGAGAAACTCGAGC  
 TTGTCGATCGACCTGCAGGTACTAGC



## B. Anexo: Complemento análisis traduccional *in silico* de los constructos diseñados.

- ALINEAMIENTO PROTEÍNA CP4 EPSPS PREDICHA VS. ESPERADA

US5633435_3	1	MSHGASSRPATARKSSGLSGTVRIPGDKSISHRSFMFGGLASGETRITGL	50
E-IGP	73	MSHGASSRPATARKSSGLSGTVRIPGDKSISHRSFMFGGLASGETRITGL	122
US5633435_3	51	LEGEDVINTGKAMQAMGARIRKEGDTWIIDGVGNGLLAPEAPLDFGNAA	100
E-IGP	123	LEGEDVINTGKAMQAMGARIRKEGDTWIIDGVGNGLLAPEAPLDFGNAA	172
US5633435_3	101	TGCRLTMGLVGVYDFDSTFIGDASLTKRPMGRVLNPLREMGVQVKSEDGD	150
E-IGP	173	TGCRLTMGLVGVYDFDSTFIGDASLTKRPMGRVLNPLREMGVQVKSEDGD	222
US5633435_3	151	RLPVTLRGPKTPTPITYRVPMSAQVKSAVLLAGLNTPGITTVIEPIMTR	200
E-IGP	223	RLPVTLRGPKTPTPITYRVPMSAQVKSAVLLAGLNTPGITTVIEPIMTR	272
US5633435_3	201	DHTEKMLQGFGANLTVETDADGVRTIRLEGRGKLTGQVIDVPGDPSSTAF	250
E-IGP	273	DHTEKMLQGFGANLTVETDADGVRTIRLEGRGKLTGQVIDVPGDPSSTAF	322
US5633435_3	251	PLVAALLVPGSDVTILNVLNPNTRTGLILTLQEMGADIEVINPRLAGGED	300
E-IGP	323	PLVAALLVPGSDVTILNVLNPNTRTGLILTLQEMGADIEVINPRLAGGED	372
US5633435_3	301	VADLRVRSSTLKGVTVPEDRAPSMIDEYPILAVAAAFAGATVMNGLEEL	350
E-IGP	373	VADLRVRSSTLKGVTVPEDRAPSMIDEYPILAVAAAFAGATVMNGLEEL	422
US5633435_3	351	RVKESDRLSAVANGLKLNVDCEGETSLVVRGRPDGKGLGNASGAAVAT	400
E-IGP	423	RVKESDRLSAVANGLKLNVDCEGETSLVVRGRPDGKGLGNASGAAVAT	472
US5633435_3	401	HLDHRIAMSFLVMGLVSENPVTVDDATMIATSFPEFMDLMAGLGAKIELS	450
E-IGP	473	HLDHRIAMSFLVMGLVSENPVTVDDATMIATSFPEFMDLMAGLGAKIELS	522
US5633435_3	451	DTKAA	455
E-IGP	523	DTKAA	527

▪ **ALINEAMIENTO PEPTIDO DE TRANSITO vs. PRIMEROS 72 AA DE LA PROTEÍNA CP4:EPSPS PREDICHA**

```

US5633435_15      1 MAQINNMAQGIQTLNPNNSNFHKPQVPKSSSFLVFGSKKLNKNSANMLVLK      50
  |||
E-IGP             1 MAQINNMAQGIQTLNPNNSNFHKPQVPKSSSFLVFGSKKLNKNSANMLVLK      50

US5633435_15     51 KDSIFMQKFCFSFRISASVATAC-----                          72
  |||
E-IGP            51 KDSIFMQKFCFSFRISASVATAC-----                          100
    
```

▪ **SALIDA ChloroP**

```

### chlorop v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
    
```

Name	Length	Score	cTP	CS-score	cTP-length
Sequence	527	0.571	Y	6.765	65

▪ **PANTALLAZO BLAST-n GEN cp4:epsps OPTIMIZADO CONTRA BASE DE DATOS DE NUCLEOTIDOS DEL NCBI**

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct CP4 EPSPS glyphosate tolerance protein gene, complete cds</a>	951	951	99%	0.0	76%	<a href="#">JF445290.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct CP4EPSPS protein gene, complete cds</a>	939	939	97%	0.0	76%	<a href="#">HM855949.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON82053, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400387.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON74532, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400386.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON100407, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400385.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON81312, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400384.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON98939, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400382.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON108080, complete sequence</a>	890	890	98%	0.0	75%	<a href="#">JN400381.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON99036, complete sequence</a>	884	884	96%	0.0	75%	<a href="#">JN400388.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Expression vector pMON93914, complete sequence</a>	884	884	96%	0.0	75%	<a href="#">JN400383.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct CP4EPSPS protein (CP4EPSPS) gene, complete cds</a>	796	796	92%	0.0	74%	<a href="#">AY125353.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glycine max transgenic cp4epsps gene for 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase class 2 precursor, comp</a>	791	791	92%	0.0	74%	<a href="#">AB209852.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glycine max CP4EPSPS gene, complete cds</a>	787	787	92%	0.0	74%	<a href="#">AF464188.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct wheat CP4EPSPS protein gene, complete cds</a>	764	764	99%	0.0	73%	<a href="#">HM652430.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">GM reference vector pTLE8, partial sequence</a>	733	733	86%	0.0	74%	<a href="#">JX434028.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sinorhizobium fredii USDA 257, complete genome</a>	710	710	96%	0.0	72%	<a href="#">CP003563.1</a>





## Bibliografía

- Akbarzadeh A, Kordbacheh F, Jafari M, Salmanian A-H. 2010. A Binary Vector for Agrobacterium Mediated Plant Transformation with New Glyphosate Tolerant Gene as a Selectable Marker. *Biharean Biologist* 4(1):19-29.
- Almeida A, Villalobos E, Araújo S, Leyman B, Dijck P, Alfaro-Cardoso L, Fevereiro P, Torné J, Santos D. 2005. Transformation of tobacco with an Arabidopsis thaliana gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica* 146(1-2):165-176.
- Austin GD. 1994. Enhanced expression in plants using non-translated leader sequences. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Austin GD. 1997. Enhanced expression in plants using non-translated leader sequences. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Baley G, Kohn FC, Pitkin JW, Rinehart J, Taylor JH. 2009. Method for disease control in MON89788 soybean. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US).
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR. 1992. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. WO: Monsanto Company.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 1997a. Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 1997b. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US),.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 1997c. Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US),.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 1998. Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US),.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 2001. Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US),.
- Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. 2006. Glyphosate-Tolerant 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthases. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US).
- Bennett AB, Chi-Ham C, Graff G, Boettiger S. 2008. Intellectual Property in Agricultural Biotechnology: Strategies for Open Access. In: Steward C, editor. *Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications.*

- Bogdanova NN, Corbin DR, Malvar TM, Perlak FJ, Roberts JK, Romano CP. 2011. Nucleotide sequences encoding insecticidal proteins. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US),.
- Brookes G, Barfoot P. 2013. The global income and production effects of genetically modified (GM) crops 1996–2011. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 4(1):74-83.
- CAMBIA. Patent tutorials and FAQs. How to read a patent. [Internet]. [Enero 2014]. Available from: <http://www.patentlens.net/daisy/patentlens/202.html>
- CAN. Comunidad Andina. 2000. Régimen común sobre propiedad intelectual. Gaceta Oficial del Acuerdo de Cartagena N° 600 de 19 de septiembre de 2000. p. 62.
- Castle LA, Siehl DL, Gorton R, Patten PA, Chen YH, Bertain S, Cho H-J, Duck N, Wong J, Liu D et al. . 2004. Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304(5674):1151-1154.
- CERA. Center for Environmental Risk Assessment. 2010. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína CP4 EPSPS. Available from: [http://cera-mc.org/uploads/cp4epsps\\_es\\_rev5.pdf](http://cera-mc.org/uploads/cp4epsps_es_rev5.pdf)
- CERA. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database [Internet]. [Enero 2014]. Available from: [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Chiera J, Bouchard R, Dorsey S, Park E, Buenrostro-Nava M, Ling P, Finer J. 2007. Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Reports* 26(9):1501–1509.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18(4):675-689.
- Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchey MA. 2000. Progeny Analysis of Glyphosate Selected Transgenic Soybeans Derived from *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Crop Sci.* 40(3):797-803.
- Comai L, Sanger MP, Daubert SD. 2000. Figwort mosaic virus promoter and uses. US: Calgene, Inc.,.
- Comai LF, Sen LF, Stalker DM. 1983. An Altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *Science* 221(4608):370-371.
- Connett-Porceddu M, Ashton D, Bacon N, Dos Remedios N, Nottenburg C, Okada S, Quinn G, Yang W, Jefferson R. 2005. Analysis of Trends in Search and Retrieval of Intellectual Property-Related Information Cambia- Intellectual Property Resource.
- CORPOICA. 2006. Soya (*Glycinemax* (L.) Merrill) Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquía colombiana Villavicencio, Colombia.
- Cren M, Hirel B. 1999. Glutamine Synthetase in Higher Plants Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. *Plant and Cell Physiology* 40(12):1187-1193.
- Curtis M. 2008. Recombinant DNA, Vector Design, and Construction. In: Steward C, editor. *Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications.* New jersey.: John Wiley & sons, INC., publications.

- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Rao Movva N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal* 6(9):2513–2518.
- Della-Cioppa G, Bauer C, Klein BK, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM. 1986. Translocation of the Precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase into Chloroplasts of Higher Plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(18):6873-6877.
- Dhingra A, Daniell H. 2004. Engineering herbicide resistance pathways in plastids. In: Daniell H, Chase C, editors. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dröge W, Broer I, Pühler A. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187(1):142-151.
- Duke SO. 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environ Health Perspect.* 67:263-271.
- Eschenburg S, Healy M, Priestman M, Lushington G, Schönbrunn E. 2002. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta* 216(1):129-135.
- FENALCE. Importaciones 2013. [Internet]. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas. Available from: <http://fenalce.org/nueva/pg.php?pa=19&d=Estadisticas%20Fenalce>
- Finer J, Dhillon T. 2008. Transgenic Plant Production. In: Steward C, editor. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, INC., Publication.
- Finer JJ, Bouchard R. 2008. Highly active soybean promoters and uses thereof. WO: The Ohio State University, Research Foundation Kenny Rd Columbus O. H.
- Finer JJ, Bouchard RA. 2010. Highly Active Soybean Promoters and Uses Thereof. In: The Ohio State University RFKRCOH, editor. US.
- Finer JJ, Bouchard RA. 2013. Highly active soybean promoter from the sub1-3 polyubiquitin gene and uses thereof. US: The Ohio State University Research Foundation, Columbus, OH (US).
- Fraley RT, Horsch RB, Rogers SG. 1994. Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Fraley RT, Horsch RB, Rogers SG. 1996. Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Fraley RT, Horsch RB, Rogers SG. 1999. Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Fraley RT, Horsch RB, Rogers SG. 2001. Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters. US: Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E. 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(35):13010-13015.

- Gallo M, Flynn A. 2008. Molecular Genetics of Gene Expression. In: Steward C, editor. Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications. New Jersey: John Wiley & sons, INC., publications.
- Gelvin SB. 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(1):16–37.
- Gelvin SB. 2010. Plant proteins involved in Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Annu Rev Phytopathol* 48:45-68.
- Govindarajulu M, Elmore JM, Fester T, Taylor CG. 2008. Evaluation of Constitutive Viral Promoters in Transgenic Soybean Roots and Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(8):1027–1035.
- Groenewald J-H, Botha F. 2001. A high level, stable, constitutive promoter element for plants. South African Sugar Association, Flanders Drive Mount Edgecombe University Of Stellenbosch, Institute F. O. R. Plant Biotechnology Institute for Plant Biotechnology University of Stellenbosch Stellenbosch. WO.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* 22(7):346-353.
- Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S, Ness J, Villalobos A, Welch M. 2012. Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expression and Purification* 83(1):37-46.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hartzler B. 2012. Agronomy 317- Principles of weed science. Herbicide modes of action. [Internet]. Iowa State University. Available from: [http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/AA\\_inhibitors.htm](http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/AA_inhibitors.htm)
- Hernandez-Garcia C, Bouchard R, Rushton P, Jones M, Chen X, Timko M, Finer J. 2010. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology* 10:237.
- Hernandez-Garcia C, Finer JJ. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218:109-119.
- Hernandez-Garcia C, Martinelli A, Bouchard R, Finer J. 2009. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Reports* 28(5):837–849.
- Hernández-Garcia C, Martinelli A, Bouchard R, Finer J. 2009. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Reports*. p. 837–849.
- Herrmann KM. 1995. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell* 7(7):907-919.
- Hincapie V. 2012. Estudio de la libertad de operación de la línea transgénica de papa Cry1Ac desarrollada por Corporación de Investigaciones Biológicas y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. [Tesis de Maestría]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia. p. 202.
- Hincapie VP, Chaparro-Giraldo A. 2013. Metodologías para analizar la libertad de operación de cultivos genéticamente modificados (GM). In: Colombia FdC-UN, editor. Propiedad

- intelectual y regulación en biotecnología vegetal: El caso de los cultivo genéticamente modificados (GM). Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303(5913):179-180.
- Hudson LC, Bost KL, Piller KJ. 2011. Optimizing Recombinant Protein Expression in Soybean In: Aleksandra S, editor. Soybean - Molecular Aspects of Breeding. InTech. p. 19-42.
- Iannacone R, Grieco P, Cellini F. 1997. Specific sequence modifications of a cry3B endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. *Plant Molecular Biology* 34(3):485-496.
- Jayaraj S, Reid R, Santi DV. 2005. GeMS: an advanced software package for designing synthetic genes. *Nucleic Acids Research*. p. 3011–3016.
- Jung S-K, McDonald K. 2011. Visual gene developer: A fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization. *BMC Bioinformatics* 12(1):1-13.
- Kang T-J, Han S-C, Jang M-O, Kang K-H, Jang Y-S, Yang M-S. 2004. Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 117(3):175-187.
- Kang T-J, Han S-C, Yang M-S. 2005. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in tobacco using a herbicide resistance gene as a selection marker. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(2):165-174.
- Kang T-J, Kim B-G, Yang J-Y, Yang M-S. 2006. Expression of a synthetic cholera toxin B subunit in tobacco using ubiquitin promoter and bar gene as a selectable marker. *Molecular Biotechnology* 32(2):93-100.
- Kawabe A, Miyashita NT. 2003. Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. *Genes Genet Syst.* 78(5):343-352.
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science* 236(4806):1299-1302.
- Kishore GM, Shah DM. 1988. Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides. *Annual Review of Biochemistry* 57(1):627-663.
- Kucho K-i, Kakoi K, Yamaura M, Iwashita M, Abe M, Uchiumi T. 2013. Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *Journal of Biosciences* 38(4):713-717.
- Kutty PC, Parveez GKA, Huyop F. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-infection Strategies for Greater Transgenic Recovery in *Nicotiana tabacum* cv. TAPM26. *International journal of agricultural Research* 6(2):119-133.
- Laguía-Becher M, Martín V, Kraemer M, Corigliano M, Yacono M, Goldman A, Clemente M. 2010. Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice. *BMC Biotechnology* 10(1):1-14.

- Lamprea N, Salazar J. 2013. Patentes y Biotecnología vegetal en Colombia. In: Ciencias FdC-UN editor. Propiedad Intelectual y regulación en Biotecnología vegetal: El caso de los cultivos genéticamente modificados (GM). Bogotá.: Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Ciencias.
- Lee L-Y, Gelvin SB. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* 146(2):325–332.
- Leemans J, Botterman J, De Block M, Thompson C, Mouva R. 1996. Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors, DNA fragments and recombinants for use in the production of said cells and plants. US: Plant Genetic Systems, (Belgium); Biogen, Inc., Cambridge, Massachusetts.
- Leemans J, Botterman J, De Block M, Thompson C, Mouva R. 1997a. Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors, DNA fragments and recombinants for use in the production of said cells and plants. US: Plant Genetic Systems, N.V., Ghent (Belgium).
- Leemans J, Botterman J, De Block M, Thompson C, Mouva R. 2006. Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors, DNA fragments and recombinants for use in the production of said cells and plants. US: Bayer BioScience N.V., Ghent (BE), Biogen, Inc., Cambridge, MA (US).
- Leemans J, Botterman J, Thompson C, Mouva R. 1997b. Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors, DNA fragments and recombinants for use in the production of said cells and plants. US: Plant Genetic Systems, N.V., Gent (Belgium).
- Leemans J, Rotterman J, De Block M, Thompson C, Mouva R. 1987. Plant cells resistant to glutamine-synthetase inhibitors, made by genetic engineering. WO: Plant Genetic Systems, N. V. Biogen, N. V.
- Leibovich J, Guterman L, Llinás G, Botello S. 2010. Estudio sobre la competitividad del maíz y la soya en la altillanura colombiana. Informe Final. Bogotá Colombia: CRECE. Centro de estudios regionales cafeteros y empresariales.
- Li X, Li S, Lang Z, Zhang J, Zhu L, Huang D. 2013. Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports* 32(8):1299-1308.
- Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff YO, Borodovsky M. 2005. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. *Nucleic Acids Research* 33(20):6494–6506.
- MAGP, IICA. 2012. Paquete tecnológico del cultivo de la soya. In: Rocha P, Villalobos V, editors. Estudio comparativo entre el cultivo de soya genéticamente modificada y el convencional en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay San José. Costa Rica.: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. AR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.CR.

- Maiti I, Shepherd RJ. 1999. Full length transcript (FLt) promoter from figwort mosaic caulimovirus (FMV) and use to express chimeric genes in plant cells. US: University of Kentucky Research Foundation.
- Maiti IB, Gowda S, Kiernan J, Ghosh SK, Shepherd RJ. 1997. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. *Transgenic Research* 6(2):143-156.
- Malven M, Rinehart J, Taylor N, Dickinson E. 2006. Soybean event MON89788 and methods for detection thereof. WO: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US).
- Malven M, Rinehart J, Taylor N, Dickinson E. 2007. Evento mon89788 de soya y metodo para la deteccion del mismo. Expediente 7136194. Secretaria de Industria y Comercio. SIC.
- Malven M, Rinehart J, Taylor N, Dickinson E. 2009. Soybean event MON89788 and methods for detection thereof. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US).
- Malven M, Rinehart J, Taylor N, Dickinson E. 2011. Soybean event MON89788 and methods for detection thereof. US: Monsanto Technology LLC, St. Louis, MO (US).
- Mannerloef M, Tenning PP, Steen P. 2013. Transgenic sugar beet plant expressing cp4/epsps enzyme activity. US: Syngenta Participations AG, Basel (Switzerland).
- McElroy D, Blowers A, Jennes B, Wu R. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* 231(1):150-160.
- Miki B. 2008. Marker Genes and Promoters. In: Steward C, editor. *Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications*. New Jersey: John Wiley & sons, INC., publications.
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S et al. . 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* 37(1):49-59.
- Murray E, Lotzerl J, Eberle M. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* 17(2):477-498.
- Nagori BP, Mathur V. 2009. Basics of Writing Patent Non-Infringement and Freedom-to-Operate Opinions. *Journal of Intellectual Property Rights* 14(1):7-13.
- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* 28(1):292.
- Odell JT, Nagy F, Chua N-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313(6005):810-812.
- OMPI. FAQs sobre le PCT. [Internet]. Organización mundial de la propiedad intelectual; [Enero 2014]. Available from: <http://www.wipo.int/pct/es/faqs/faqs.html>
- Ortiz I, Escorsa E. 2010. Guía de Buenas Prácticas para la Búsqueda de Información en Patentes. Chile: PIPRA-Fundación para la Innovación Agraria.
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee DJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA et al. . 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35(5):1451-1461.

- Paz M, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports* 25(3):206-213.
- Paz M, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee A, Wang K. 2004a. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136(2):167-179.
- Paz M, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee A, Wang K. 2004b. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136(2):167-179.
- Peremarti A, Twyman R, Gómez-Galera S, Naqvi S, Farré G, Sabalza M, Miralpeix B, Dashevskaya S, Yuan D, Ramessar K et al. . 2010. Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Molecular Biology* 73(4-5):363-378.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(8):3324-3328.
- Plotkin JB, Kudla G. 2011. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12(1):32-42.
- Potenza C, Lorenzo A, Sengupta-Gopalan C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental Applications: promoters used in plant transformation. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 40(1):1-22.
- Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. 2007. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35:126-131.
- Richardson SMN, Paul W. Yarrington, Robert M.Boeke, Jef D.Bader,Joel S. 2010. GeneDesign 3.0 is an updated synthetic biology toolkit. *Nucleic Acids Research*. p. 2603–2606.
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg C. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants [Internet]. CAMBIA- Intellectual Property Resource; [Enero 2014]. Available from: <http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/ext/navaggregator/navaggregator>
- Rogers S. 1995. Promoter for transgenic plants. US: Monsanto Company, St. Louis Mo.
- Roudsari MF, Hatef Salmanian A, Mousavi A, Sohi HH, Jafari M. 2009. Regeneration of glyphosate-tolerant *Nicotiana tabacum* after plastid transformation with a mutated variant of bacterial *aroA* gene *Iranian Journal of Biotechnology* 7(4):247-253.
- Sambrook J, Russel D. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: CSHL Press.
- Sanger M, Daubert S, Goodman RM. 1990. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Molecular Biology* 14(3):433-443.
- Sauer H, Wild A, Ruehle W. 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z Naturforsch* 42c:270-278.
- Schenk P, Sagi L, Remans T, Dietzgen R, Bernard M, Graham M, John M. 1999. A promoter from sugarcane bacilliform bDNAavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology* 39(6):1221-1230.
- Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JNS, Kabsch W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-

- enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4):1376-1380.
- Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser CS, Aykent S et al. . 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:478-481.
- Sharp PM, Li W-H. 1987. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acid Res* 15(3):1281-1295.
- SIC. 2008a. Guía Rápida de la Propiedad Industrial Superintendencia de Industria y Comercio.
- SIC. 2008b. Solicitudes en Otros Países a través del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) Superintendencia de industria y comercio.
- Siehl DL, Castle L, Gorton R, Keenan RJ. 2007. The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *J. Biol. Chem* 282(15):11446-11455.
- Solórzano P. 2005. Generalidades sobre la soya. In: Solórzano P, Muñoz J, Gamboa M, editors. *El cultivo de la soya en Venezuela*. Agroisleña C.A.
- Solórzano P, Muñoz J, Gamboa M. 2005. *El cultivo de la soya en Venezuela*. La Victoria, Edo. Aragua.: Agroisleña, CA.
- Tan S, Evans R, Singh B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30(2):195-204.
- Temple SJ, Vance CP, Stephen Gantt J. 1998. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in plant science* 3(2):51-56.
- Thompson CJ, Movva NR, R T, R C, J.E D, M L, J B. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6(9):2519-2523.
- Trigo E. Fifteen years of genetically modified crops in Argentine agriculture [Internet]. Available from:[http://www.argenbio.org/adf/uploads/15\\_years\\_Executive\\_summary\\_of\\_GM\\_crops\\_in\\_Argentina.pdf](http://www.argenbio.org/adf/uploads/15_years_Executive_summary_of_GM_crops_in_Argentina.pdf)
- Tsaftaris A. 1996. The development of herbicide-tolerant transgenic crops. *Field Crops Research* 45(1-3):115-123.
- Tuller TF, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E. 2010. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(8):3645-3650.
- Tzafrir I, Torbert KA, Lockhart BEL, Somers DA, Olszewski NE. 1998. The sugarcane bacilliform bDNAavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Molecular Biology* 38(3):347-356.
- Verdaguer B, De Kochko A, Beachy R, Fauquet C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants of the *Cassava vein mosaic virus* (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology* 31(6):1129-1139.
- Villalobos A, Ness J, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S. 2006. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics* 7:285.
- Wang H-Y, Li Y-F, Xie L-X, Xu P. 2003. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA*-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. *Journal of Plant Research* 116(6):455-460.

- Wang L, Roossinck M. 2006. Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal codon usage in plants. *Plant Molecular Biology* 61(4-5):699-710.
- Welch M, Govindarajan S, Ness JE, Villalobos A, Gurney A, Minshull J, Gustafsson C. 2009. Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*. *Plos One* 4(9):e7002.
- Welch M, Villalobos A, Claes G, Jeremy M. 2011. Designing Genes for Successful Protein Expression. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.
- Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Punier A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70(1):25-37.
- Wright F. 1990. The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene* 87(1):23-29.
- Yan H-Q, Chang S-H, Tian Z-X, Zhang L, Sun Y-C, Li Y, Wang J, Wang Y-P. 2011. Novel AroA from *Pseudomonas putida* confers tobacco plant with high tolerance to glyphosate. *Plos One* 6(5):1-7.
- Ye G-N, Hajdukiewicz PTJ, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM. 2001. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *The Plant Journal* 25(3):261-270.
- Ye GN, Colburn SM, Xu CW, Hajdukiewicz P, Staub JM. 2003. Persistence of unselected transgenic DNA during a plastid transformation and segregation approach to herbicide resistance. *Plant Physiology* 133(1):402-403.
- Zeng P, VDNAais DA, Zhang Z, Polacco JC. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports* 22(7):478-482.
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56(1):37-46.