

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 897**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2009** **E 09785101 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2326722**

54 Título: **Plantas tolerantes a herbicidas**

30 Prioridad:

15.09.2008 GB 0816880

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2014

73 Titular/es:

**SYNGENTA LIMITED (100.0%)
European Regional Centre Priestley Road Surrey
Research Park Guildford
Surrey GU2 7YH , GB**

72 Inventor/es:

**HAWKES, TIMOTHY ROBERT;
DRAYTON, PAUL RICHARD y
DALE, RICHARD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 509 897 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas tolerantes a herbicidas

La presente invención se refiere a métodos para controlar selectivamente malas hierbas en un locus. La invención se refiere además a tecnología de ADN recombinante, y en particular a la producción de plantas transgénicas que muestran resistencia sustancial o tolerancia sustancial a herbicidas cuando se comparan con plantas de tipo no transgénicas. Las plantas que son sustancialmente "tolerantes" a un herbicida cuando se someten a él proporcionan una curva de dosis/respuesta que está desplazada hacia la derecha cuando se compara con aquella proporcionada por plantas semejantes no tolerantes sometidas de forma similar. Tales curvas de dosis/respuesta tienen la "dosis" representada en el eje X, y el "porcentaje de exterminio", "efecto herbicida", etc., representado en el eje Y. Las plantas tolerantes requerirán típicamente al menos el doble de herbicida que las plantas semejantes no tolerantes a fin de producir un efecto herbicida dado. Las plantas que son sustancialmente "resistentes" al herbicida muestran pocas, si las muestran, lesiones necróticas, líticas, cloróticas u otras lesiones cuando se someten al herbicida a concentraciones y tasas que se emplean típicamente por la comunidad agrícola para exterminar malas hierbas en el campo.

Más particularmente, la presente invención se refiere a la producción de plantas que son resistentes a herbicidas que inhiben hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) y/o herbicidas que inhiben la etapa subsiguiente de homogentisato solanesil transferasa (HST) en la ruta hacia plastoquinona.

Los herbicidas que actúan inhibiendo HPPD son bien conocidos en la técnica. La inhibición de HPPD bloquea las biosíntesis de plastoquinona (PQ) a partir de tirosina. PQ es un cofactor esencial en la biosíntesis de pigmentos carotenoides, que son esenciales para la fotoprotección de los centros fotosintéticos. Los herbicidas que inhiben HPPD son blanqueadores móviles del floema que provocan que nuevos meristemas y hojas expuestos a la luz emerjan blancos cuando, en ausencia de carotenoides, la clorofila es fotodestruida y se convierte ella misma en un agente de fotodestrucción vía la fotogeneración de oxígeno singlete. Se han dado a conocer métodos para la producción de plantas transgénicas que muestran resistencia sustancial o tolerancia sustancial a herbicidas que inhiben HPPD, por ejemplo el documento WO 02/46387.

La enzima que cataliza la siguiente etapa de HPPD en la ruta biosintética de plastoquinona es HST. La enzima HST es una prenil transferasa, que tanto descarboxila homogentisato como también le transfiere el grupo solanesilo a partir de difosfato de solanesilo y de este modo forma 2-metil-6-solanesil-1,4-benzoquinol (MSBQ), un intermedio a lo largo de la ruta biosintética a plastoquinona. Las enzimas HST están unidas a la membrana, y los genes que las codifican incluyen una secuencia dirigida a plastidios. Recientemente se han descrito métodos para evaluar HST.

Se ha dado a conocer la sobreexpresión de HST en plantas transgénicas, por ejemplo en los documentos WO03047547 y WO03080647, y se afirma que dichas plantas muestran concentraciones ligeramente mayores de α -tocoferol. Sin embargo, hasta ahora no se ha reconocido que HST es el sitio diana para ciertas clases de compuestos herbicidas – que actúan en todo o en parte inhibiendo HST. Además, ahora se ha encontrado, *entre otros*, que la sobreexpresión de HST en una planta transgénica proporciona tolerancia a herbicidas que inhiben HST y/o que inhiben HPPD.

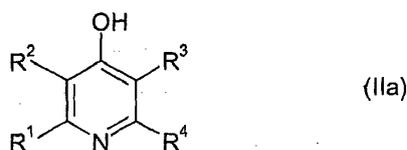
De este modo, según la presente invención, se proporciona un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus que comprende plantas de cultivo y malas hierbas, en el que el método comprende la aplicación al locus de una cantidad controladora de malas hierbas de una composición plaguicida que comprende un herbicida inhibidor de homogentisato solanesiltransferasa (HST) seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe) y (IIf) como se define más abajo, y/o un herbicida que inhibe hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), en el que las plantas de cultivo comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que comprende una región que codifica una HST y que proporciona sobreexpresión de dicha HST en dichas plantas de cultivo. En una realización preferida del método, las plantas de cultivo comprenden además un polinucleótido heterólogo adicional que comprende una región que codifica una hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD).

La invención todavía proporciona además un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus que comprende plantas de cultivo y malas hierbas, en el que el método comprende la aplicación al locus de una cantidad controladora de malas hierbas de una composición plaguicida que comprende un herbicida inhibidor de HST, en el que las plantas de cultivo comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que comprende una región que codifica una enzima HPPD.

En una realización preferida, la composición plaguicida citada en los métodos mencionados anteriormente comprende tanto un herbicida inhibidor de HST como un herbicida inhibidor de HPPD.

Para los fines de la presente invención, un herbicida inhibidor de HST es aquel que él mismo, o como un proclada, genera una molécula que inhibe HST de *Arabidopsis*, muestra una IC50 menor que 150 ppm, preferiblemente menor que 60 ppm, usando el método de ensayo de "extracto total" como se expone aquí. Se debería apreciar que los herbicidas que inhiben HST pueden también actuar como inhibidores de HPPD (posible de identificar usando, por ejemplo, ensayos enzimáticos de HPPD y/o las respuestas diferenciales de estirpes de plantas transgénicas que sobreexpresan HPPD o HST), y por lo tanto, como se muestra más abajo, autosinergizan el efecto de su inhibición

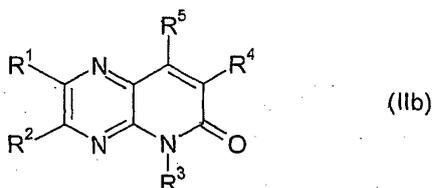
de HST. Preferiblemente, el herbicida inhibidor de HST se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (IIa)



en la que

- 5 R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son independientemente hidrógeno o halógeno; con la condición de que al menos tres de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 sean halógeno; o sales de los mismos;

un compuesto de fórmula (IIb)



en la que

- 10 R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, alquilo de C_1-C_4 , haloalquilo de C_1-C_4 , halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^5 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R^6 , que pueden ser iguales o diferentes;

- 15 R^3 es hidrógeno, alquilo de C_1-C_{10} , alqueno de C_2-C_{10} , alquino de C_2-C_{10} , cicloalquilo de C_3-C_{10} , cicloalquil C_3-C_{10} -alquilo de C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_{10} -alquilo de C_1-C_6 , cianoalquilo de C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} -carbonil-alquilo de C_1-C_6 , *N*-alquil C_1-C_3 -aminocarbonil-alquilo de C_1-C_6 , *N,N*-di-(alquil C_1-C_3)-aminocarbonil-alquilo de C_1-C_6 , aril-alquilo de C_1-C_6 o aril-alquilo de C_1-C_6 en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^7 , que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicliil-alquilo de C_1-C_6 o heterocicliil-alquilo de C_1-C_6 en el que el resto heterocicliilo está sustituido con uno a tres R^7 , que pueden ser iguales o diferentes;

- 20 R^4 es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^8 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R^8 , que pueden ser iguales o diferentes;

- 25 R^5 es hidroxilo, R^9 -oxi-, R^{10} -carbonilo-, tri- R^{11} -sililo-, o R^{12} -sulfonilo-, cada R^6 , R^7 y R^8 es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_4 , alqueno de C_2-C_{10} , alquino de C_2-C_{10} , hidroxilo, alcoxi de C_1-C_{10} , haloalcoxi de C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_{10} -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquilo de C_3-C_7 , cicloalcoxi de C_3-C_7 , cicloalquil C_3-C_7 -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquil C_3-C_7 -alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_6 -carbonilo-, formilo, alcoxi C_1-C_4 -carbonilo-, alquil C_1-C_4 -carbonilo-, alquil C_1-C_{10} -tio-, haloalquil C_1-C_4 -tio-, alquil C_1-C_{10} -sulfino-, haloalquil C_1-C_4 -sulfino-, alquil C_1-C_{10} -sulfonilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfonilo-, amino, alquil C_1-C_{10} -amino-, di-alquil C_1-C_{10} -amino-, alquil C_1-C_{10} -carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C_1-C_4 o heteroaril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes;

- 35 R^9 es alquilo de C_1-C_{10} , alqueno de C_2-C_{10} , alquino de C_2-C_{10} o aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo está sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ;

- 40 R^{10} es alquilo de C_1-C_{10} , cicloalquilo de C_3-C_{10} , cicloalquil C_3-C_{10} -alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_{10} , alqueno de C_2-C_{10} , alquino de C_2-C_{10} , alcoxi C_1-C_4 -alquilo de C_1-C_{10} , alquil C_1-C_4 -tio-alquilo de C_1-C_4 , alcoxi de C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} -oxi, alquino C_2-C_{10} -oxi, alquil C_1-C_{10} -tio-, *N*-alquil C_1-C_4 -amino-, *N,N*-di-(alquil C_1-C_4)-amino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C_1-C_4 o heteroaril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio-

sustituido con uno a tres R¹⁴, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilitio- o heteroarilitio- sustituido con uno a tres R¹⁴, que pueden ser iguales o diferentes;

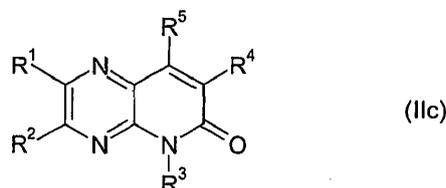
cada R¹¹ es independientemente alquilo de C₁-C₁₀ o fenilo o fenilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆;

5 R¹² es alquilo de C₁-C₁₀ o fenilo o fenilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆;

cada R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; y

10 cada R¹⁴ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alcoxi de C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, haloalcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfinilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfinilo-, alquil C₁-C₁₀-sulfonilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfonilo-, arilo o arilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o sales o N-óxidos del mismo;

15 un compuesto de fórmula (IIc)



en la que

20 R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₄-tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes;

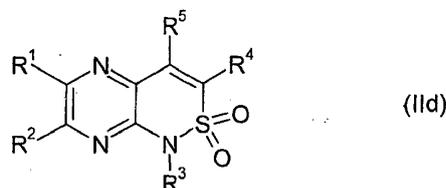
R³ es haloalquilo de C₁-C₄, haloalqueno de C₂-C₄ o haloalquino de C₂-C₄;

R⁴ es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R⁸, que pueden ser iguales o diferentes;

R⁵ es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar al grupo hidroxilo;

25 cada R⁶ y R⁸ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, alquino de C₂-C₁₀, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₁₀, haloalcoxi de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₇, cicloalcoxi de C₃-C₇, cicloalquil C₃-C₇-alquilo de C₁-C₄, cicloalquil C₃-C₇-alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₆-carbonilo-, formilo, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfinilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfinilo-, alquil C₁-C₁₀-sulfonilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfonilo-, amino, alquil C₁-C₁₀-amino-, di-alquil C₁-C₁₀-amino-, alquil C₁-C₁₀-carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C₁-C₄- o aril-alquilo de C₁-C₄- en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C₁-C₄- o heteroaril-alquilo de C₁-C₄- en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, arilitio- o arilitio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilitio- o heteroarilitio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes; y each R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o una sal o N-óxido del mismo;

40 un compuesto de fórmula (II d)



en la que

R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₄-tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes;

R³ es hidrógeno, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, haloalqueno de C₂-C₄, alquino de C₂-C₁₀, haloalquino de C₂-C₄, cicloalquilo de C₃-C₁₀, cicloalquil C₃-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, cianoalquilo de C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀-carbonil-alquilo de C₁-C₆, N-alquil C₁-C₃-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, N,N-di-(alquil C₁-C₃)-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, aril-alquilo de C₁-C₆ o aril-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicliil-alquilo de C₁-C₆ o heterocicliil-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto heterocicliilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes;

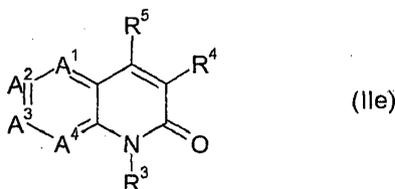
R⁴ es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R⁸, que pueden ser iguales o diferentes;

R⁵ es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar al grupo hidroxilo;

cada R⁶, R⁷ y R⁸ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, alquino de C₂-C₁₀, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₁₀, haloalcoxi de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₇, cicloalcoxi de C₃-C₇, cicloalquil C₃-C₇-alquilo de C₁-C₄, cicloalquil C₃-C₇-alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₆-carbonilo-, formilo, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfinilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfinilo-, alquil C₁-C₁₀-sulfonilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfonilo-, amino, alquil C₁-C₁₀-amino-, di-alquil C₁-C₁₀-amino-, alquil C₁-C₁₀-carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C₁-C₄ o aril-alquilo de C₁-C₄ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C₁-C₄ o heteroaril-alquilo de C₁-C₄ en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi-sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes; y

cada R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o una sal o N-óxido del mismo;

IIe) un compuesto de fórmula (IIe)



en la que

A¹, A², A³ y A⁴ son independientemente C-R¹ o N, con la condición de que al menos uno de A¹, A², A³ y A⁴ sea N, y con la condición de que si A¹ y A⁴ son ambos N, A² y A³ no sean ambos C-R¹; cada R¹ es independientemente hidrógeno, alquilo de C₂-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₄-tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes;

R³ es hidrógeno, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, haloalqueno de C₂-C₄, alquino de C₂-C₁₀, haloalquino de C₂-C₄, cicloalquilo de C₃-C₁₀, cicloalquil C₃-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, cianoalquilo de C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀-carbonil-alquilo de C₁-C₆, N-alquil C₁-C₃-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, N,N-di-(alquil C₁-C₃)-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, aril-alquilo de C₁-C₆ o aril-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicliil-alquilo de C₁-C₆ o heterocicliil-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto heterocicliilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes;

R⁴ es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R⁸, que pueden ser iguales o diferentes;

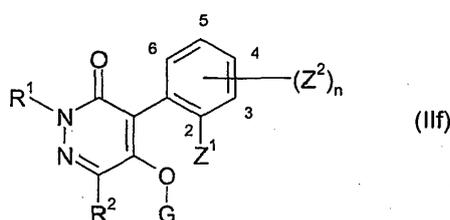
R⁵ es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar a un grupo hidroxilo;

cada R⁶, R⁷ y R⁸ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, alquino de C₂-C₁₀, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₁₀, haloalcoxi de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₄,

5 cicloalquilo de C₃-C₇, cicloalcoxi de C₃-C₇, cicloalquil C₃-C₇-alquilo de C₁-C₄-, cicloalquil C₃-C₇-alcoxi de C₁-C₄-,
 10 alquil C₁-C₆-carbonilo-, formilo, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₄-carboniloxi-, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-
 C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfinilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfinilo-, alquil C₁-C₁₀-sulfonilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfonilo-, amino,
 15 alquil C₁-C₁₀-amino-, di-alquil C₁-C₁₀-amino-, alquil C₁-C₁₀-carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser
 iguales o diferentes, aril-alquilo de C₁-C₄- o aril-alquilo de C₁-C₄- en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C₁-C₄- o heteroaril-alquilo de C₁-C₄- en el que
 el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi-
 sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con
 uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser
 iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o
 diferentes; y

cada R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o una
 sal o N-óxido del mismo; y

15 un compuesto de fórmula (IIf)



en la que

R¹ es alquilo de C₁-C₆ o alquil C₁-C₆-oxi-alquilo de C₁-C₆;

R² es hidrógeno o alquilo de C₁-C₆;

20 G es a hidrógeno, -(C=L)R³, -(SO₂)R⁴, o -(P=L)R⁵R⁶, en los que

L es oxígeno o azufre;

25 R³ es alquilo de C₁-C₆, cicloalquilo de C₃-C₈, alqueno de C₂-C₆, alquino de C₂-C₆, arilo de C₆-C₁₀, aril C₆-C₁₀-
 alquilo de C₁-C₆-, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₈-oxi, alqueno C₂-C₆-oxi, alquino C₂-C₆-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril
 C₆-C₁₀-alquil C₁-C₆-oxi-, amino, alquil C₁-C₆-amino, alqueno C₂-C₆-amino, aril C₆-C₁₀-amino, di(alquil C₁-
 C₆)amino, di(alqueno C₂-C₆)amino, (alquil C₁-C₆)(aril C₆-C₁₀)amino o un anillo heterocíclico que contiene
 nitrógeno de tres a ocho miembros,

30 R⁴ es alquilo de C₁-C₆, arilo de C₆-C₁₀, un grupo alquil C₁-C₆-amino o di(alquil C₁-C₆)amino; y R⁵ y R⁶ pueden ser
 iguales o diferentes y son independientemente alquilo de C₁-C₆, cicloalquilo de C₃-C₈, alqueno de C₂-C₆, arilo de
 C₆-C₁₀, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₈-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril C₆-C₁₀-alquil C₁-C₆-oxi, alquil C₁-C₆-tio, alquil C₁-
 C₆-amino o di(alquil C₁-C₆)amino, con lo que cualquier grupo R³, R⁴, R⁵ y R⁶ puede estar sustituido con halógeno,
 cicloalquilo de C₃-C₈, arilo de C₆-C₁₀, aril C₆-C₁₀-alquilo de C₁-C₆-, cicloalquil C₃-C₈-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril C₆-C₁₀-
 alquil C₁-C₆-oxi-, aril C₆-C₁₀-amino, (alquil C₁-C₆)(aril C₆-C₁₀)amino y un anillo heterocíclico que contiene
 nitrógeno de tres a ocho miembros que puede estar sustituido con al menos un alquilo de C₁-C₆;

Z¹ es alquilo de C₁-C₆;

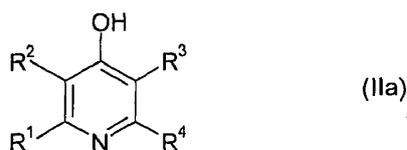
35 Z² es alquilo de C₁-C₆;

n es 0, 1, 2, 3 ó 4;

y cada uno de Z² puede ser igual o diferente cuando n representa un número entero de 2 o más, y la suma del
 número de átomos de carbono en el grupo representado por Z¹ y aquella en el grupo representado por Z² es
 igual a 2 o más.

40 Los inhibidores de HST de fórmula (IIa) son conocidos, por ejemplo haloxidina y piriolclor. Los inhibidores de HST de
 fórmula (IIb) son conocidos desde el documento, por ejemplo, WO 2008/009908. Los inhibidores de HST de fórmula
 (IIc) son conocidos desde el documento, por ejemplo, WO 2008/071918. Los inhibidores de HST de fórmula (IId) son
 conocidos desde el documento, por ejemplo, WO 2009/063180. Los inhibidores de HST de fórmula (IIe) son
 conocidos desde los documentos, por ejemplo, WO2009/090401 y WO2009/090402. Los inhibidores de HST de
 45 fórmula (IIf) son conocidos desde el documento, por ejemplo, WO 2007/119434.

Se prefieren los compuestos de fórmula (IIa)

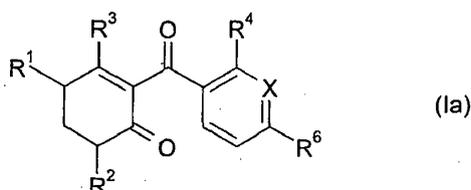


en la que

5 R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son independientemente hidrógeno, bromo, cloro o fluro; con la condición de que al menos tres de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 sean también bromo, cloro o fluro, lo más preferible es el compuesto de fórmula (IIa) en el que R^1 y R^4 son fluro y R^2 y R^3 son cloro (haloxidina), o en el que R^1 , R^2 y R^3 son cloro y R^4 es hidrógeno (piriclor).

10 La expresión "herbicida inhibidor de HPPD" se refiere a herbicidas que actúan directamente o como procidas para inhibir HPPD y que, en su forma activa, muestran un valor K_i menor que 5 nM, preferiblemente 1 nM frente a HPPD de *Arabidopsis* cuando se evalúan los métodos de velocidad de asociación y de disociación descritos en el documento WO 02/46387. En el contexto de la presente invención, los términos hidroxifenil piruvato (o ácido pirúvico) dioxigenasa (HPPD), 4-hidroxifenil piruvato (o ácido pirúvico) dioxigenasa (4-HPPD) y p-hidroxifenil piruvato (o ácido pirúvico) dioxigenasa (p-HPPD) son sinónimos.

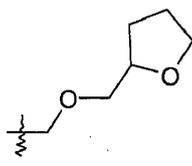
Preferiblemente, el herbicida inhibidor de HPPD se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (Ia)



15 en la que R^1 y R^2 son hidrógeno, o juntos forman un puente de etileno;

R^3 es hidroxilo o feniltio-; R^4 es halógeno, nitro, alquilo de C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 -alquilo de C_1-C_4 -, alcoxi C_1-C_4 -alcoxi C_1-C_4 -alquilo de C_1-C_4 -;

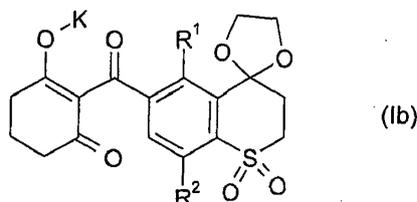
X es metino, nitrógeno, o $C-R^5$, en el que R^5 es hidrógeno, haloalcoxi C_1-C_4 -alquilo de C_1-C_4 -, o un grupo



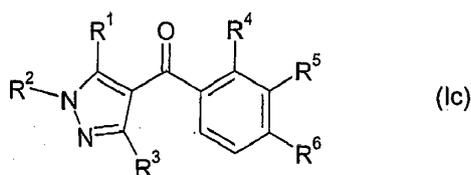
20 y

R^6 es alquil C_1-C_4 -sulfonilo- o haloalquilo de C_1-C_4 ;

un compuesto de fórmula (Ib)



25 R^1 y R^2 son independientemente alquilo de C_1-C_4 ; y los ácidos libres del mismo; un compuesto de fórmula (Ic)

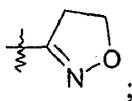


en la que R¹ es hidroxilo, fenilcarbonyl-alcoxi de C₁-C₄- o fenilcarbonyl-alcoxi de C₁-C₄- en el que el resto fenilo está sustituido en la posición para con halógeno o alquilo de C₁-C₄, o fenilsulfonilo- o fenilsulfonilo- en el que el resto fenilo está sustituido en la posición para con halógeno o alquilo de C₁-C₄;

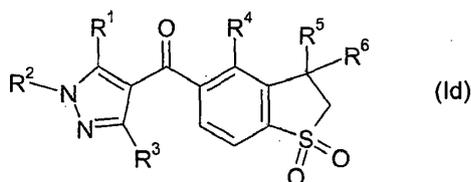
5 R² es alquilo de C₁-C₄;

R³ es hidrógeno o alquilo de C₁-C₄; R⁴ y R⁶ son independientemente halógeno, alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, o alquil C₁-C₄-sulfonilo-; y

R⁵ es hidrógeno, alquilo de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄-alcoxi de C₁-C₄-, o un grupo



10 un compuesto de fórmula (ld)

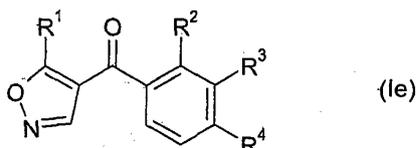


en la que R¹ es hidroxilo;

R² es alquilo de C₁-C₄;

R³ es hidrógeno; y R⁴, R⁵ y R⁶ son independientemente alquilo de C₁-C₄;

15 un compuesto de fórmula (le)

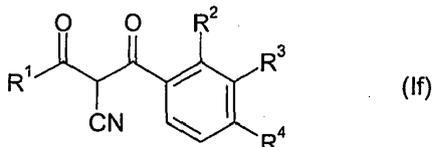


en la que R¹ es ciclopropilo;

R² y R⁴ son independientemente halógeno, haloalquilo de C₁-C₄, o alquil C₁-C₄-sulfonilo-; y

R³ es hidrógeno; y

20 un compuesto de fórmula (lf)



en la que R¹ es ciclopropilo;

R² y R⁴ son independientemente halógeno, haloalquilo de C₁-C₄, o alquil C₁-C₄-sulfonilo-; y

R³ es hidrógeno.

25 Los inhibidores de HPPD ejemplares también se describen en el documento WO2009/016841. En una realización preferida, el inhibidor de HPPD se selecciona del grupo que consiste en benzobencilón, mesotriona, sulcotriona, tefultriona, tembotriona, 4-hidroxil-3-[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.1]oct-3-

en-2-ona (biciclopirona), quetospiradox o el ácido libre del mismo, benzofenap, pirasulfotol, pirazolinato, pirazoxifeno, topamezona, [2-cloro-3-(2-metoxietoxi)-4-(metilsulfonil)fenil](1-etil-5-hidroxi-1*H*-pirazol-4-il)-metanona, (2,3-dihidro-3,3,4-trimetil-1,1-dioxidobenzo[b]tien-5-il)(5-hidroxi-1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-metanona, isoxaclortol, isoxaflutol, α -(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonil)- β -oxo-4-cloro-bencenopropanonitrilo, y α -(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonil)- β -oxo-4-(trifluorometil)-bencenopropanonitrilo.

Estos inhibidores de HPPD son conocidos, y tienen los siguientes números de registro de Chemical Abstracts: benzobiciclón (CAS RN 156963-66-5), mesotriona (CAS RN 104206-82-8), sulcotriona (CAS RN 99105-77-8), tefuriltriona (CAS RN 473278-76-1), tembotriona (CAS RN 335104-84-2), 4-hidroxi-3-[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona (CAS RN 352010-68-5), quetospiradox (CAS RN 192708-91-1) o su ácido libre (CAS RN 187270-87-7), benzofenap (CAS RN 82692-44-2), pirasulfotol (CAS RN 365400-11-9), pirazolinato (CAS RN 58011-68-0), pirazoxifeno (CAS RN 71561-11-0), topamezona (CAS RN 210631-68-8), [2-cloro-3-(2-metoxietoxi)-4-(metilsulfonil)fenil](1-etil-5-hidroxi-1*H*-pirazol-4-il)-metanona (CAS RN 128133-27-7), (2,3-dihidro-3,3,4-trimetil-1,1-dioxidobenzo[b]thien-5-il)(5-hidroxi-1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-metanona (CAS RN 345363-97-5), isoxaclortol (CAS RN 141112-06-3), isoxaflutol (CAS RN 141112-29-0), α -(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonil)- β -oxo-4-cloro-bencenopropanonitrilo (CAS RN 143701-66-0), y α -(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonil)- β -oxo-4-(trifluorometil)-bencenopropanonitrilo (CAS RN 143701-75-1).

Las siguientes definiciones se aplican a aquellos términos usados con respecto a la Fórmula I y Fórmula II.

El resto alquilo (ya sea solo o como parte de un grupo más grande, tal como alcoxi, alcoxi-carbonilo, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo) es una cadena lineal o ramificada, y es, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo o *neo*-pentilo. Los grupos alquilo son preferiblemente grupos alquilo de C₁ a C₆, más preferiblemente C₁-C₄, y muy preferiblemente grupos metilo.

Los restos alqueno y alquino (ya sea solos o como parte de un grupo más grande, tal como alquenoilo o alquinoilo) pueden estar en forma de cadenas lineales o ramificadas, y los restos alqueno, cuando sea apropiado, pueden tener la configuración (E) o (Z). Los ejemplos son vinilo, alilo y propargilo. Los grupos alqueno y alquino son preferiblemente grupos alqueno o alquino de C₂ a C₆, más preferiblemente C₂-C₄, y muy preferiblemente grupos alqueno o alquino de C₂-C₃.

Los grupos alcoxialquilo tienen preferiblemente una longitud de cadena de 2 a 8 átomos de carbono u oxígeno. Un ejemplo de un grupo alcoxialquilo es 2-metoxi-etilo.

Halógeno es generalmente flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor o cloro. Lo mismo es cierto de halógeno junto con otros significados, tal como haloalquilo.

Los grupos haloalquilo tienen preferiblemente una longitud de cadena de 1 a 4 átomos de carbono. Haloalquilo es, por ejemplo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 2-fluoroetilo, 2-cloroetilo, pentafluoroetilo, 1,1-difluoro-2,2,2-tricloroetilo, 2,2,3,3-tetrafluoroetilo o 2,2,2-tricloroetilo; preferiblemente triclorometilo, difluoroclorometilo, difluorometilo, trifluorometilo o diclorofluorometilo. Los grupos haloalcoxialquilo tienen preferiblemente una longitud de cadena de 2 a 8 átomos de carbono u oxígeno. Un ejemplo de un grupo alcoxialquilo es 2,2,2-trifluoroetoximetilo. Los grupos alcoxialcoxi tienen preferiblemente una longitud de cadena de 2 a 8 átomos de carbono u oxígeno. Los ejemplos de alcoxialcoxi son: metoximetoxi, 2-metoxi-etoxi, metoxipropoxi, etoximetoxi, etoxietoxi, propoximetoxi y butoxibutoxi. Los grupos alcoxialquilo tienen una longitud de cadena de preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. Alcoxialquilo es, por ejemplo, metoximetilo, metoxietilo, etoximetilo, etoxietilo, *n*-propoximetilo, *n*-propoxietilo, isopropoximetilo o isopropoxietilo.

Los grupos alcoxialcoxialquilo tienen preferiblemente una longitud de cadena de 3 a 8 átomos de carbono u oxígeno. Ejemplos de alcoxi-alcoxi-alquilo son: metoximetoximetilo, metoxietoximetilo, etoximetoximetilo y metoxietoxietilo.

Los grupos cianoalquilo son grupos alquilo que están sustituidos con uno o más grupos ciano, por ejemplo cianometilo o 1,3-dicianopropilo.

Los grupos cicloalquilo pueden estar en forma mono- o bicíclica, y pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos metilo. Los grupos cicloalquilo contienen preferiblemente 3 a 8 átomos de carbono, más preferiblemente 3 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo monocíclicos son ciclopropilo, 1-metilciclopropilo, 2-metilciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "arilo" se refiere a un sistema anular que puede ser mono, bi- o tricíclico. Los ejemplos de tales anillos incluyen fenilo, naftalenilo, antracenoilo, indenilo o fenantrenilo. Un grupo arilo preferido es fenilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema aromático que contiene al menos un heteroátomo y que consiste en un único anillo o en dos o más anillos condensados. Preferiblemente, los anillos individuales contendrán hasta tres heteroátomos, y los sistemas bicíclicos hasta cuatro heteroátomos, que se escogerán preferiblemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos de tales grupos incluyen piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo,

furanilo, tiofenilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, pinolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo y tetrazolilo. Un grupo heteroarilo preferido es piridina. Los ejemplos de grupos bicíclicos son benzotiofenilo, bencimidazolilo, benzotiadiazolilo, quinolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo y pirazolo[1,5-a]pirimidinilo.

5 El término "heterociclilo" se define para incluir heteroarilo y además sus análogos insaturados o parcialmente insaturados, tales como 4,5,6,7-tetrahidro-benzotiofenilo, cromen-4-onilo, 9H-fluorenilo, 3,4-dihidro-2H-benzo-1,4-dioxepinilo, 2,3-dihidro-benzofuranilo, piperidinilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-dioxanilo, 4,5-dihidro-isoxazolilo, tetrahidrofuranilo y morfolinilo.

10 Se debería entender que en los métodos mencionados anteriormente la composición herbicida se puede aplicar al locus antes de la emergencia del cultivo y/o después de la emergencia del cultivo. En una realización preferida, la composición herbicida se aplica después de la emergencia del cultivo – una aplicación denominada "over-the-top". Se pueden llevar a cabo aplicaciones individuales o de hecho múltiples aplicaciones según sea necesario para obtener el control deseado de las malas hierbas.

La expresión "malas hierbas" se refiere a cualquier vegetación indeseada, e incluye, por ejemplo, plantas de cultivo transportadas o "maliciosas" o "espontáneas" en un campo de plantas de cultivo de haba de soja.

15 Típicamente, el polinucleótido heterólogo comprenderá (i) un promotor operable vegetal enlazado operablemente a (ii) la región que codifica la enzima HST y (iii) un terminador de la transcripción. Típicamente, el polinucleótido heterólogo comprenderá además una región que codifica un polipéptido capaz de dirigir la enzima HST a orgánulos subcelulares tales como el cloroplasto o mitocondria – preferiblemente el cloroplasto. El polinucleótido heterólogo puede comprender además, por ejemplo, potenciadores transcripcionales. Además, la región que codifica la enzima HST puede estar "optimizada en codones", dependiendo del hospedante vegetal en el que se desea la expresión de la enzima HST. La persona experta estará bien al tanto de los promotores operables vegetales, terminadores transcripcionales, péptidos de tránsito al cloroplasto, potenciadores, etc., que tienen utilidad en el contexto de la presente invención.

20 La HST puede ser una enzima de "tipo salvaje", o puede ser una que se ha modificado a fin de producir propiedades cinéticas preferentes con respecto a la provisión de plantas tolerantes a herbicidas. En una realización preferida, la HST se caracteriza por que comprende uno o más de los siguientes motivos polipeptídicos:

W-(R/K)-F-L-R-P-H-T-I-R-G-T; y/o

N-G-(Y/F)-I-V-G-I-N-Q-I-(Y/F)-D; y/o

I-A-I-T-K-D-L-P; y/o

30 Y-(R/Q)-(F/W)-(I/V)-W-N-L-F-Y.

Las HST adecuadas derivan de *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa* o *Chlamydomonas reinhardtii*. En una realización incluso más preferida, la HST se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO:1 a SEC ID NO. 10. Se debería observar que las secuencias de aminoácidos proporcionadas en SEC ID NOS:1 a 10 son ejemplos de secuencias de aminoácidos de HST que incluyen una región que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto.

35 Las SEC ID NOS 11-20 corresponden a secuencias de AND que codifican las HSTs representadas como SEC ID NO. 1-10 mientras que las SEC ID NOS 21-24 son ejemplos de secuencias de ADN que codifican secuencias de HST maduras truncadas sin la región del péptido de tránsito.

40 Las secuencias de aminoácidos proporcionadas en SEC ID NOS 25-28 son ejemplos de secuencias de aminoácidos de HPPD, y las SEC ID NOS 29-32 son ejemplos de secuencias de ADN que las codifican. Las HPPD adecuadas para proporcionar tolerancia a herbicidas que inhiben HPPD son bien conocidas por la persona experta - por ejemplo, documento WO 02/46387. SEC ID No 33 proporciona la secuencia de ADN del potenciador transcripcional TMV, y SEC ID No 34 proporciona la secuencia de ADN del potenciador transcripcional TMV fusionado en 5' a la secuencia de ADN que codifica HST de *Arabidopsis*.

45 Se debería entender además que la planta del cultivo usada en dicho método puede comprender adicionalmente un polinucleótido heterólogo adicional que codifica una enzima de tolerancia a herbicida adicional. Los ejemplos de enzimas de tolerancia a herbicidas adicionales incluyen, por ejemplo, enzimas de tolerancia a herbicidas seleccionadas del grupo que consiste en 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), glifosato acetil transferasa (GAT), citocromo P450, fosfotricin acetiltransferasa (PAT), acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPGO), fiteno desaturasa (PD), enzimas que degradan a dicamba (por ejemplo documento WO 02/068607), y enzimas que degradan herbicidas a base de ariloxi como se enseñan en los documentos WO2007/053482 y WO2005/107437.

50 La composición plaguicida usada en los métodos mencionados anteriormente pueden comprender además uno o más plaguicidas adicionales – en particular herbicidas – a los que la planta del cultivo es tolerante de forma natural, o a los que es resistente *vía* expresión de uno o más transgenes adicionales como se menciona aquí. En una

- realización preferida, el uno o más herbicidas adicionales se seleccionan del grupo que consiste en glifosato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); glufosinato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); cloroacetanilidas, por ejemplo alaclor, acetoclor, metolaclor, S-metolaclor; inhibidores del fotosistema II, por ejemplo triazinas tales como ametrina, atrazina, cianazina y terbutilazina, triazinonas tales como hexazinona y metribuzina, ureas tales como clorotolurón, diurón, isoproturón, linurón y terbutiurón; inhibidores de ALS, por ejemplo sulfonilureas tales como amidosulfurón, clorsulfurón, flupirsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, triasulfurón, trifloxisulfurón y tritosulfurón; éteres difenílicos, por ejemplo acioflurofeno y fomesafeno.
- Se describe además un polinucleótido recombinante que comprende una región que codifica una enzima HST enlazada operablemente a un promotor operable vegetal, en el que la región que codifica la enzima HST no incluye la secuencia polinucleotídica representada en SEC ID NO. 11, SEC ID NO. 12, SEC ID NO. 14 o SEC ID NO. 15. En realización preferida, la enzima HST se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8, SEC ID NO. 9 y SEC ID NO. 10.
- Se describe además un polinucleótido recombinante que comprende (i) una región que codifica una enzima HST enlazada operablemente a un promotor operable vegetal y (ii) al menos un polinucleótido heterólogo adicional, que comprende una región que codifica una enzima de tolerancia a herbicida adicional, enlazado operablemente a un promotor operable vegetal. La enzima de tolerancia a herbicida adicional se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), glifosato acetil transferasa (GAT), citocromo P450, fosfinotricin acetiltransferasa (PAT), acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPGO), fiteno desaturasa (PD) y enzimas que degradan a dicamba, como se enseña en el documento WO 02/068607.
- Preferiblemente, el polinucleótido recombinante comprende (i) una región que codifica una HST enlazada operablemente a un promotor operable vegetal, y (ii) una región que codifica una HPPD enlazada operablemente a un promotor operable vegetal. También es posible que el polinucleótido recombinante comprenda al menos dos, tres, o más regiones adicionales, que codifican cada una una enzima de tolerancia a herbicidas, por ejemplo como se define previamente. De este modo, en otra realización preferida, el polinucleótido recombinante comprende (i) una región que codifica una enzima HST, (ii) una región que codifica una enzima HPPD, y (iii) una región que codifica una enzima de tolerancia a glifosato.
- Se describe además un vector que comprende un polinucleótido recombinante como se describe aquí.
- Se describen además plantas transformadas que sobreexpresan una enzima HST que muestran resistencia sustancial o tolerancia sustancial a herbicidas que inhiben HST y/o a herbicidas que inhiben HPPD, cuando se comparan con plantas semejantes no transgénicas. También se debería apreciar que las plantas transformadas muestran típicamente tolerancia potenciada al estrés, incluyendo tolerancia al calor y a la sequía.
- De este modo, se describe adicionalmente una célula vegetal que muestra resistencia sustancial o tolerancia sustancial a herbicidas que inhiben HST y/o a herbicidas que inhiben HPPD, cuando se comparan con una célula vegetal semejante no transgénica – comprendiendo dicha célula vegetal el polinucleótido recombinante como se describe aquí. Se debería apreciar que la región que codifica la HST, y cualquier región que codifica una o más enzimas de tolerancia a herbicidas adicionales, se puede proporcionar en las mismas (“enlazadas”) o de hecho distintas moléculas polinucleotídicas recombinantes transformantes.
- La célula vegetal puede comprender además rasgos transgénicos adicionales, por ejemplo polinucleótidos heterólogos que proporcionan resistencia a insectos, a hongos y/o a nematodos.
- Se describen adicionalmente plantas, células vegetales, tejidos y semillas que comprenden una célula vegetal como se describe aquí, tolerantes a inhibidores de HST fértiles morfológicamente normales.
- Las plantas o células vegetales transformadas incluyen, pero no se limitan a, cultivos, frutas y vegetales del campo, tales como cánola, girasol, tabaco, remolacha, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, remolacha forrajera, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, etc. Las plantas genéticamente modificadas particularmente preferidas son soja spp. caña de azúcar, guisante, habas del campo, álamo, uva, cítrico, alfalfa, centeno, avenas, pasto y hierba de forraje, lino y colza, y plantas productoras de frutos secos en tanto que ya no se hayan mencionado específicamente. En una realización particularmente preferida del método, la mencionada planta es una dicotiledónea, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en cánula, girasol, tabaco, remolacha, haba de soja, algodón, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, y es de forma particularmente preferible haba de soja. En realizaciones preferidas adicionales, la mencionada planta es maíz o arroz. Preferiblemente, la planta es haba de soja, arroz o maíz. La descripción también incluye la progenie de la planta de la frase anterior, y las semillas u otro material de propagación de tales plantas y progenie.
- En un aspecto particularmente preferido, el polinucleótido recombinante se usa para proteger cultivos de haba de soja de la lesión herbicida de herbicidas inhibidores de HPPD de las clases de química de HPPD, seleccionados del grupo que consiste en los compuestos de fórmula Ia o Ig. En una realización adicional, el herbicida inhibidor de

HPPD se selecciona de sulcotriona, mesotriona, tembotriona y compuestos de fórmula la en los que X es nitrógeno y R₄ es CF₃, CF₂H o CFH₂ y/o en cuando R₁ y R₂ forman juntos un puente de etileno.

5 La presente invención todavía proporciona adicionalmente un método para proporcionar una planta transgénica que es tolerante a herbicidas inhibidores de HST y/o inhibidores de HPPD, que comprende la transformación del material vegetal con un polinucleótido o polinucleótidos recombinantes que comprenden una región que codifica una enzima HST, la selección del material vegetal transformado usando un herbicida inhibidor de HST y/o herbicida inhibidor de HPPD, y la regeneración de ese material en una planta fértil morfológicamente normal. En una realización preferida, el material vegetal transformado se selecciona usando un herbicida inhibidor de HST solo, o en combinación con un herbicida inhibidor de HPPD.

10 La presente invención se refiere además al uso de polinucleótido que comprende una región que codifica una enzima HST como un marcador seleccionable en la transformación vegetal, y el uso de un polinucleótido que comprende una región que codifica una enzima HST en la producción de plantas que son tolerantes a herbicidas que actúan en todo o en parte inhibiendo HST.

15 Se describe además el uso de inhibidores de HST como agentes de selección en la transformación vegetal, y al uso de una enzima HST recombinante en el cribado *in vitro* de herbicidas potenciales.

20 Se describe además una composición herbicida, producto una composición herbicida sinérgica, que comprende un herbicida inhibidor de HPPD (como se define aquí) y un herbicida inhibidor de HST (como se define aquí). La relación del herbicida inhibidor de HPPD al herbicida inhibidor de HST en la composición es cualquier relación adecuada – típicamente de 100:1 a 1:100, preferiblemente 1:10 a 1:100, incluso más preferiblemente de 1:1 a 1:20. La persona experta reconocerá que la relación óptima dependerá de las potencias relativas y espectro de los dos herbicidas, que se pueden derivar como una cuestión de optimización experimental normal.

25 La composición herbicida puede comprender además uno o más ingredientes plaguicidas adicionales. Los plaguicidas adicionales pueden incluir, por ejemplo, herbicidas, fungicidas o insecticidas (tal como tiometoxam) - sin embargo, se prefieren herbicidas. De este modo, el herbicida adicional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en glifosato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); glufosinato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); cloroacetanilidas, por ejemplo alaclor, acetoclor, metolaclor, S-metolaclor; inhibidores del fotosistema II (PS-II), por ejemplo triazinas tales como ametrina, atrazina, cianazina y terbutilazina, triazinonas tales como hexazinona y metribuzina, y ureas tales como clorotolurón, diurón, isoproturón, linurón y terbutiurón; inhibidores de ALS, por ejemplo sulfonilureas tales como amidosulfurón, clorsulfurón, flupirsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, triasulfurón, trifloxisulfurón y tritosulfurón; éteres difenílicos, por ejemplo acioflurofeno y fomesafeno. Se prefieren particularmente herbicidas PS-II, ya que tales mezclas muestran una eficacia particularmente buena.

35 De este modo, se describe además un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus que comprende plantas de cultivo y malas hierbas, que comprende aplicar al locus una cantidad controladora de las malas hierbas de una composición herbicida sinérgica como se define previamente. En una realización adicional de la actual invención, los herbicidas inhibidores de HPPD y de HST se pulverizan secuencialmente en lugar de al mismo tiempo como una mezcla. De este modo, por ejemplo, en un programa de control de malas hierbas de la actual invención, el herbicida de HST se puede aplicar ventajosamente sobre un locus del cultivo al que ya se ha aplicado previamente un herbicida de HPPD. Normalmente esto se haría en la misma estación, pero, especialmente en el caso de herbicidas de HPPD más resistentes, también habría una ventaja a la hora de usar el herbicida de HST en la estación siguiente. Además, los herbicidas inhibidores de HST se usan ventajosamente como parte de un programa de control de malas hierbas en el que un herbicida inhibidor de HPPD se aplica más tempranamente en la estación, o incluso en la estación anterior.

45 El herbicida inhibidor de HPPD se puede aplicar al locus a cualquier tasa adecuada - por ejemplo de 1 a 1000 g/ha, más preferiblemente de 2 a 200 g/ha. Igualmente, el herbicida inhibidor de HST se puede aplicar a cualquier tasa adecuada - por ejemplo de 10 a 2000 g/ha, más preferiblemente de 50 a 400 g/ha.

50 En otra realización, el herbicida inhibidor de HPPD se aplica al locus a una tasa que es subletal a las malas hierbas donde se aplica el herbicida inhibidor de HPPD en ausencia de otros herbicidas. La tasa subletal real dependerá de la especie de malas hierbas presente y del inhibidor de HPPD real – pero típicamente será menor que 50 g/ha, más preferiblemente menor que 10 g/ha. De este modo, la presente invención proporciona además el uso de una aplicación subletal de un herbicida inhibidor de HPPD para incrementar la eficacia controladora de malas hierbas de un herbicida inhibidor de HST.

La invención será manifiesta adicionalmente a partir de los siguientes ejemplos no limitantes y listados de secuencias.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO. 1 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE DE HST ARABIDOPSIS

melsisqsprvrfsslaprflaashhhrrpsvhlagkfislprdvrfstlstsrmsk
fvstnyrkisiracsqvgaaesddpvdriarfqnacwrflrphtirgtalgstalv
tralienthlikwslvlkalsgllalicngyivginqiydigidkvnpypiaag
dlsvqsawllviffaiagllvvgfnfgpfitslyclglflgtiysvpplrnkrfpva
afliiatvrgfllnfgvyhatraalglpfqwsapvafitsfvtfalviaitkdldp
vegdrkfqistlatklgvrniaflgsglllvnyvsaislafympqvfrgslmipahv
ilasglifqtwwlekanytkeaisgyyrfiwnlfyaeyllfpfl

SEC ID NO. 2 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE ARROZ

maslaspplpcraaatasrsgrpaprllogppppaspllssasarfprapcnaarws
rrdavrvcsgagaagpaplsktdskdscwrflrphtirgtalgsmlvaralien
pqlinwwlvfkafyglvalicngyivginqiydiridkvnpypiaagdlsvqta
wllvvlfaaagfsivvtnfgpfitslyclglflgtiysvppfrlkrypvaafliiat
vrgfllnfgvyvyaatraalgltfqwsspvafitcfvtlfalviaitkdldpvegdrky
qistlatklgvrniaflgsgllianyvaaiavaflmpqafrrtmvvpvhaalavgii
fqtwwleqakytkdaisqyyrfiwnlfyaeyiffpli

SEC ID NO. 3 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE VARIANTE DE HST DE ARROZ

maslaspplpcraaatasrsgrpaprllogppppaspllssasarfprapcnaarws
rrdavrvcsgagaagpaplsktdskdscwrflrphtirgtalgsialvaralien
pqlinwwlvfkafyglvalicngyivginqiydiridkvnpypiaagdlsvqta
wllvvlfaaagfsivvtnfgpfitslyclglflgtiysvppfrlkrypvaafliiat
vrgfllnfgvyvyaatraalgltfqwsspvafitcfvtlfalviaitkdldpvegdrky
qistlatklgvrniaflgsgllianyvaaiavaflmpqafrrtmvvpvhaalavgii
fqtwwleqakytkdaisqyyrfiwnlfyaeyiffpli

5

SEC ID NO. 4 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE SOJA

melslsptshrvpstipltinsaklsstkatksqqplflgfskhfnshhhsyrcc
snaverperqrpssiractgvgasgsdrplaerlldkdacwrflrphtirgtalgsf
alvaralientnlikwslffkafcglfalicngyivginqiydisidkvnpypipi
aagdlsvqsawflviffaaaglsiagnfgpfifsltytlglflgtiysvpplrnkrf
pvaafliiatvrgfllnfgvyvyaatrasglafewsspvvfittfvtfalviaitkd
ldpvegdrkyqistfatklgvrniaflgsgillvnyivsvlaaiympqafrrwllip
ahtifaisliyqarileqanytkdaisgyfyrfiwnlfyaeyaifpfi

SEC ID NO. 5 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE CHLAMYDOMONAS

mdlcsstgrgacspastsrpcpapvhlrgrrlafspaqpagrrhlpvlssaavpap
lpnggndesfaqklanfnafwkflrphtirgttilgttvtakvlmenpgcidwall
pkallglvallcngyivginqiydvdivvnpkplpvasgelspalawglcslaa
agagivaanfnglitslytfglflgtvysvpplrkqyavpafmiiatvrgfllnfg
vysatraalglpfewspavsfvtfatviaitkdldpvegdaqannistfatrm
gvrnvallaigllmanygaialaltystafnvplmagahilaatlalrtklhaa
sysreavasfyriwnlfyaeyallpfl

10

SEC ID NO. 6 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE NICOTINIA

melacsscslrfssvlthqdaasryrklpptspsckaanfvlkssknlssaglh
igytnfsktvsyrkyrhisiracsqvgtagsepvdklsqfkdafwrflrphtirgt
algsllsvtralienpnliwslamkafsglialicngyivginqiydigidkvnp
ypiaagdlsvqsawflvllfamagllivgfnfgpfitslyclglflgtiysvppf
rmkrfavvaafliiatvrgfllnfgvyvyaatrasglfqsqsspvafitfvtfalvi
aitkdldpvegdrkfqistlatklgvrniaflgsgllanyigavvaaiympqafrs
slmipvhailalclvfqawllekanytkeaisayyqfiwnffyaeylifpfi

SEC ID NO. 7 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE AQUILEGIA

lcfsspsisipphcsttthyrkipinstfkstnflskasnnlttfgfsrnkkysrsi
lsrksrhfsiwassqvgagsddpllkkipdfkdavwrflrphtirgtalgsialvs
ralienthlikwslfkalcgvfalmcngyivginqiydigidkvnkpylpiaagd
lsvqsawslvtffavagvcivafnfgpfitclyclglflgtiysvpplrmkrypva
fliiatvrgfllnfgvyhatraalgltfewsyvafittfvtmfalviaitkdlpdv
egdrkfqistlatklgvrniaallgtglllanyigaivaaiylppqafrrnlmipahti
lalglvfqawaleqakyskeaildfyrfvwnlfyseyflfpfi

SEC ID NO. 8 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE BRASSICA NAPUS

melsishspclrfssssprflaasshhyrpsvhlagkllsrskdadltslssscmrs
kfvstnyrkisirassqvgagsdpvlrdrlarfqnacwrflrphtirgtalgstalv
tralienthlikwslvkalsgllalialicngyivginqiydigidkvnkpylpiaag
dlsvqsawllviffaiagltvvgfnfgpfitclyclglflgtiysvppfrmkrfpva
afliiatvrgfllnfgvyhatraalglsfqwsapvafitsfvltlfalviaitkdlpd
vegdrkfqistlatklgvrniaflgsglllvnyisaislafympqvfrgslmipahm
ilasclvfqtvwlekanytkeaiagyrfiwnlfyaeyllfpff

SEC ID NO. 9 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE HST DE VITIS VINIFERA

mkvdavqastqvgagsdpplnkfsvfkdacwrflrphtirgtalgstalvaralie
npnlikwslfkafsgllalialicngyivginqiydisidkvnkpylpiaagdsvqs
awflvlffavagvlivgsnfgsfitslyclglvlgtiysvppfrmkrfpvaafliia
tvrgfllnfgvyvyyatraalgplpmsapvvfittfvltlfalviaitkdlpdvegdrk
yqistlatklgvrniaflgsglllvnyigsilaaiympqafrlslmipahailaagl
ifqarvleqanytkeaisdfyrfiwnlfyveyiifpfi

5

SEC ID NO. 10 SECUENCIA DE HST PHYSCOMITRELLA PATENS

mgltaiivdvaqassssvalsqgrgatrllpgglalgdafkglrkreyaqglqcrvr
reggcasearvwkvrccsdsagslggdlpasqqqsevsgirdpaaasaasfaplpq
rialfydafwrflrphtirgtflgtsalvtrallenptlinwallpkalrgllallic
gngfivginqifdsgidkvnkplpiaagdsvpaawalvgglaalgvlatnfgp
littlytfglflgtiysvpplrlkqypvafmiatvrgfllnfgvyvyyatraalgls
yewspsvmfitifvtlfatviaitkdlpdiegdkkfnistfatnlgvrkisflgagl
llvnyigaivaafylypqaftkimvtghavlglsliyqtwlldtakyskeaisnfyr
fiwnlfyseyalfpfi

SEC ID NO. 11 HST (ADN) DE ARABIDOPSIS

atggagctctcgatctcacaatcaccgcggtggtcggttctcgctctctggcgctcgt
ttcttagcagcttctcatcatcatcgtccttctgtgcatttagctgggaagtata
agcctccctcgagatggtcgttccagagcttatcaacttcaagaatgcggtccaaa
tttgtttcaaccaattatagaaaaatctcaatccgggcatggttctcaggttgggtgct
gctgagtctgatgatccagtgctggatagaattgcccgggtccaaaatgcttgcctgg
agatttcttagaccccatacaatccgcggaacagctttaggatccactgccttggtg
acaagagctttgatagagaacactcatttgatcaaatggagtcttgtactaaaggca
ctttcaggtcttcttgccttatttgggtggaatggttatatagtcggcatcaatcag
atctacgacattggaatcgacaaagtgaacaaaccatacttgccaatagcagcagga
gatctatcagtcagctctgcttgggtggttagtgatatttttgcgatagcagggctt
ttagttgtcggatttaacttgggtccattcattacaagcctatactctcttggcctt
ttctgggaaccatctattctgttccaccctcagaatgaaaagattcccagttgca
gcatttcttattattgccacggtagcaggttcccttcttaacttgggtggtgacct
gctacaagagctgctcttggacttccatttccagtgagtgacacctgtggcgttcatc
acatcttttgtgacactgtttgcactggctcattgctattacaaaggaccttccctgat
gttgaaggagatcgaaagttccaaatatcaaccctggcaacaaaacttggagtgaga
aacattgcattcctcgggtctggacttctgctagtaaattatgtttcagccatatca
ctagctttctacatgcctcaggttttagaggtagcttgatgattcctgcacatgtg
atcttggcttcaggcttaattttccagacatgggtactagaaaagcaaacctacacc
aaggaagctatctcaggatattatcgggtttatatggaatctcttctacgcagagat
ctgttattccccttccctag

SEC ID NO. 12 HST (ADN) DE ARROZ

atggcttccctcgctcccctcctctcccctgccgcgccgcccaccgcccagccgc
agcgggctcctgctccgcgctcctcggccctccgcccgcgcccgttcccctctc
ctctcctcggctcggcgcttcccgcgtgcccctgcaacgcccgcacgctggagc
cggcgcgacgcccgtgcccgttctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca

atcaggaactgccttgggatccatgtcattagttgctagagctttgatagagaac
cccactgataaattgggtggttggattcaaagcgttctatgggctcgtggcgta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcga
aaggtaaacaagccatattaccaattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattgggtggtattatttgcagctgcccggattttcaattggtgtgacaaaactt
ggaccttccattacctctctatattgccttgggtctatttcttggcaccatatactct
gttccctcattcagacttaagagatatcctggtgctgcttttcttatcattgcaacg
gtcctggttttcttctcaacttgggtggtgactatgctactagagcagcaactgggt
cttacattccaatggagctcgcctggttcttcttattacatgcttctgactttattt
gcttgggtcattgctataaccaagatctcccagatgttgaaggggatcgggaagat
caaatatcaacttggcgacaaagctcgggtgctcagaaacattgcatttcttggctct
ggttattgatagcaaatatggtgctgctattgctgtagcttttctcatgcctcag
gcttccagggcactgtaatggtgctgctgcatgctgcccttggcgttgggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatataactaaggatgctatttccagctac
taccggttcttggaaatctctctatgctgaatacatcttcttcccgttgata

5 SEC ID NO. 13 HST (ADN) DE VARIANTE DE ARROZ

atggcttccctcgctccccctctctccctgccgcccgcgccaccgccagccgc
agcgggctcctgctccgcgctcctcgccctccgcgcccgccttccccctctc
ctctcctccgcttcggcgcgcttccccgctgccccctgcaacgccgcacgctggagc
cggcgcgacgcctgctggggttctcaagctggcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca
attcgaggaactgccttgggatccatagcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaaactgataaattgggtggttggattcaaagcgttctatgggctcgtggcgta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattgggtggtatttttgcagctgccggattttcaattggttgacaaacttt
ggaccttccattacctctctatattgccttggctctattttcttggcaccatatactct
gttcctccattcagacttaagagatatcctggtgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtgggttttcttctcaacttgggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctcgcctggttgccttccattacatgcttcgtgactttattt
gctttggctcattgctataaccaagatctcccagatggtgaaggggatcggaagat
caaatatcaacttggcgacaaagctcgggtgcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaatatggtgctgctatgctgtagcttttctcatgctcag
gctttcaggcgcactgtaatgggtgcctgtgcatgctgcccttggcgttggataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaatataactaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatag

SEC ID NO. 14 HST (ADN) DE SOJA

tctgctaaattatcttctactaaagctactaaatctcaacaacctttatttttagga
ttttctaaacattttaattctattggattacatcatcattcttatagatggtgtct
aatgctgtacctgaaagacctcaaagaccttcttctattagagcttgtactggagta
ggagcttctggatctgatagaccttagctgaaagattattagatttaaaagatgct
tggtggagatttttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatcttttgc
ttagtagctagagctttaattgaaaataactaatttaattaaatggtctttattttt

aaagctttttgtggattatttgccttaatttggtaaattggatataattgtaggaatt
aatcaaatatgatatttctattgataaagtaataaaccttatttacctattgct
gctggagatttatctgtacaatctgcttgggttttagtaatttttttgcctgctgct
ggattatctattgctggattaaattttggacctttattttttctttatatacttta
ggattatttttaggaactatttattctgtacctcctttaagaatgaaaagatttct
gtagctgcttttttaattattgctactgtaagaggatttttattaaattttggagta
tattatgctactagagcttcttaggattagcttttgaatggcttctcctgtagta
tttattactacttttgaacttttttgccttagtaattgctattactaaagattta
cctgatgtagaaggagatagaaaatatacaatttctacttttgcctactaaattagga
gtaagaaatattgcttttttaggatctggaattttattagtaaattatattgtatct
gtattagctgctatttatatgcctcaagcttttagaagatgggtattaattcctgct
catactattttgctatttcttaatttatcaagctagaattttagaacaagcta
tatactaaagatgctatttctggatttttatagatttttggaaattttttatgct
gaatagctatttttctttatt

5 SEC ID NO. 15 HST (ADN) DE CHLAMYDOMONAS

atggacctttgcagctcaactggaagaggagcatgcctttcgccggcatccacgtcg
cggcogtgcccagcaccagtgcatttgcgcggccgacgcctggctttctctccggt
cagcctgctggacggcgccacttgcgggtgctctcatctgcagcggccccgctccc
ctcccaaatggtggaaacgacgagagcttcgcacaaaaactggctaactttccaaac
gccttctggaagtctctgcgccacacaccatccgggggactatcctgggcaccaca
gctgtgaccgccaaggtccttatggagaacccccggctgcatagactgggactgctg
ccgaaggcgctgctcggcctgggtggcgctgctgtgcggaacggctacattgtgggc
atcaaccaaatctacgacgtcgacattgacgtggccaacaagccattcctccccgtg
gctgctggggcgagctgtcggcgcgctggcgtggggcctgtgtctgtcgtggcggt
gcgggcgcgggcatcgtagccgccaacttcggcaacctcatcaccagcctctacacc
tttggcctcttctgggcaccgtgtacagtgctcctcccctgcgcctgaagcagtac
gcggtgcccgccttcatgatcatcgccacgggtgcgcggttctctgctcaacttcggc
gtgtacagcgccacgcgggcggaactgggactgccttcgagtgagcccgccgctc
agcttcatcacggtgtttgtgacgctgtttgccactgtgatcgccatcaccaaggac
ctgcccggacgtggagggcgaccaggccaacaacatctccaccttcgccacgcatg
ggcgtgcgcaacgtggcactgctggccatcggccttctcatggccaactacctgggt
gccatcgcgctggcactcacctactccaccgcttcaacgtgcccgtcatggcgggc
gcgcacgcatcctggccgcccagctggcgctgcgcacgctcaagctgcaagccgccc
agctacagccgggagggcggtggcgtccttctaccgctggatctggaacctgttctac
gccgagtacgctgctgcccgttctgtag

SEC ID NO. 16 ADN DE HST DE NICOTINIA

atggaattagcttgttcttctgttcttctttaagattttcttctgtattaactcat
caagatactgctgcttctagatatagaaaattacctcctacttctccttcttgtaaa
gctgctaattttgtattaaaatcttctaaaaatttatcttcttctgctggattacat
attggatataactaatttttctaaaactgtatcttatagaaaatatagacataatttct
attagagcttgttctcaagtaggaactgctggatctgaacctgtattagataaatta
tctcaattttaaagatgctttttggagatttttaagacctcatactattagaggaact

gctttaggatctttatctttagtaactagagctttaattgaaaatcctaatttaatt
agatggtcttttagctatgaaagctttttctggattaattgctttaatttgggaaat
ggatataattgtaggaattaatcaaatttatgatattggaattgataaagtaaaataaa
ccttatttacctattgctgctggagatttatctgtacaatctgcttggtttttagta
ttattatttgctatggctggattattaattgtaggaattaattttggaccttttatt
acttctttatattgtttaggattattttttaggaactatttattctgtacctcctttt
agaatgaaaagattgctgtagtagcttttttaattattgctactgtaagaggattt
ttattaaattatggagtatattatgctactactgctgcttttaggattatctttcaa
tggcttctcctgtagcttttattactacttttgtaactttatttggcttttagtaatt
gctattactaaagatttacctgatgtagaaggagatagaaaattcaaatttctact
ttagctactaaattaggagtaagaaatattgcttttttaggatctggattattatta
gctaattatattggagctgtagtagctgctatttatatgcctcaagcttttagatct
tctttaatgattcctgtacatgctatttttagctttatgttttagtatttcaagcttgg
ttattagaaaaagctaattataactaaagaagctatttctgcttattatcaatttatt
tggaaatttttttatgctgaatatttaatttttcttttatt

5 SEC ID NO. 17 ADN DE HST DE AQUILEGIA

atggttatgtttttcttctccttctatttctattcctcctcattgttctactactact
cattatagaaaaattcctattaattctacttttaaatctactaattttttatctaaa
gcttctaataatttaactacttttggattttctagaaataaaaaatattctagatct
attttatctagaaaatctagacatttttctatttgggcttctctcaagtaggagct
gctggatctgatgatcctttattaaaaaaaattcctgatttttaagatgctgtatgg
agatttttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatctattgctttagta
tctagagctttaattgaaaatactcatttaattaaatggcttttattatttaagct
atgtgtggagattttgctttaatgtgtggaaatggatataattgttaggaattaatcaa
atztatgatattggaattgataaagtaataaaccttatttacctattgctgctgga
gatttatctgtacaactctgcttggcttttagtaacttttttggctgtagctggagta
tgtattgtagcttttaattttggaccttttattacttctttatattgtttaggatta
tttttaggaactatttattctgtacctcctttaagaatgaaaagatatcctgtagct
gcttttttaattattgctactgtaagaggattttttattaaattttggagtatatcat
gctactagagctgctttaggattaacttttgaatggcttatcctgtagcttttatt
actacttttgtaactatgtttgcttttagtaattgctattactaaagatttacctgat
gtagaaggagatagaaaatttcaaatttctacttttagctactaaattaggagtaaga
aatattgctttatttaggaactggattattattagctaattatattggagctattgta
gctgctattttatttacctcaagcttttagaagaatttaattgattcctgctcatact
attttagctttaggattagtatttcaagcttgggctttagaacaagctaaatattct
aagaagctattttagatttttatagattttgtatggaatttttttattctgaatat
ttttatttccttttatt

SEC ID NO. 18 ADN DE HST DE BRASSICA NAPUS

ttagctgcttcttctcatcattatagaccttctgtacatttagctggaaaattatta
tctagatctaaagatgctgatttaacttctttatcttcttcttctgtatgagatctaaa
tttgatctactaattatagaaaaatttctattagagcttcttctcaagtaggagct
gctggatctgatcctgtattagatagattagctagatttcaaaaatgcttgttggaga
ttttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatctactgcttttagtaact

agagctttaattgaaaatactcatttaattaaatggcttttagtattaaagcttta
tctggattattagctttaatttgggaaatggatataattgttaggaattaatcaaatt
tatgatattggaattgataaagtaataaaccttatttacctattgctgctggagat
ttatctgtacaactctgcttggttatttagtaatttttttggctattgctggattaact
gtagtaggatttaattttggaccttttattacttgtttatattctttaggattattt
ttaggaactatttattctgtacctccttttagaatgaaaagatttctgtagctgct
tttttaattattgctactgtaagaggattttttattaaattttggagtatatcatgct
actagagctgctttaggattatcttttcaatggctgctcctgtagcttttattact
tcttttgtaactttatttggcttttagtaattgctattactaaagatttacctgatgta
gaaggagatagaaaatttcaaatttctacttttagctactaaattaggagtaagaaat
attgcttttttaggatctggattattattagtaattatatttctgctatttcttta
gcttttttatatgcctcaagtatatttagaggatctttaatgattcctgctcatatgatt
ttagcttcttgttttagtatttcaaacttgggtattagaaaaagctaaataactaaa
gaagctattgctggatattatagatttttttggaaatttttttatgctgaatattta
ttatttccttttttt

5 SEC ID NO. 19 ADN DE HST DE VITIS VINIFERA

atgaaagtagatgctgtacaagcttctactcaagtaggagctgctggatctgatcct
cctttaataaattttctgtatttaaagatgcttgttggagatttttaagacctcat
actattagaggaactgctttaggatctactgcttttagtagctagagctttaattgaa
aatcctaatttaattaaatggtctttattatttaagctttttctggattattagct
ttaatttgtggaaatggatataattgtaggaattaatcaaatttatgatatttctatt
gataaagtaataaaccttatttacctattgctgctggagatttatctgtacaatct
gcttgggttttttagtatttttttggctgtagctggagatttaattgtaggatcta
tttggatcttttattacttctttatattgtttaggattagtaggaactatttat
tctgtacctccttttagaatgaaaagatttctgtagctgcttttttaattattgct
actgtaagaggatttttattaaattttggagatattatgctactagagctgcttta
ggattaccttttatgtggtctgctcctgtagtatttattactacttttgtaacttta
tttggcttttagtaattgctattactaaagatttacctgatgtagaaggagatagaaa
tatcaaatttctacttagctactaaattaggagtaagaaatattgcttttttagga
tctggattattattagtaaatatattggatctatttttagctgctatttatatgcct
caagcttttagattatctttaatgattcctgctcatgctatttttagctgctggatta
attttcaagctagagtattagaacaagctaattataactaaagaagctatttctgat
ttttatagatttatttggaaattttttatgtagaatatatttttctttttatt

SEC ID NO. 20 ADN DE HST DE PHYSCOMITRELLA PATENS

atgggattaactgctattgtagtagatgtagctcaagcttcttcttcttctgtagct
ttatctcaaggaagaggagctactagaagattacctggaggattagctttaggagat
gcttttaaaggattaagaaaaagagaatatgctcaaggattacaatgtagagtaaga
agagaaggaggatgtgcttctgaagctagagtaggaaagtaagatgttcttctgat
tctgctggatctttaggaggagatttacctgcttctcaacctcaacaatctgaagta
tctggaattagagatcctgctgctgcttctgctgcttcttttggctcctttacctcaa
agaattgctttattttatgatgctttttggagatttttaagacctcatactattaga
ggaacttttttaggaacttctgcttttagtaactagagctttattagaaaatcctact
ttaattaatgggctttattacctaaagctttaagaggattattagctttattatgt

ggaaatggatttattgtaggaattaatcaaatttttgattctggaattgataaagta
aataaaccttttttacctattgctgctggagatttatctgtacctgctgcttgggct
ttagtaggaggattagctgctttaggagtaggattagtagctactaattttggacct
ttaattactactttatatacttttggattatttttaggaactatttattctgtacct
cctttaagattaaaacaatcctgtacctgcttttatgattattgctactgtaaga
ggatttttattaaattttggagtagatattatgctactagagctgctttaggattatct
tatgaatggtctccttctgtaatgtttattactatttttgaactttatttgctact
gtaattgctattactaaagatttacctgatattgaaggagataaaaaattaatatt
tctacttttggctactaattaggagtaagaaaaatttcttttttaggagctggatta
ttattagtaaatatattggagctattgtagctgctttttatttacctcaagctttt
aaaactaaaattatggtaactggacatgctgtattaggattatctttaatttatcaa
acttggttattagatactgctaataattctaaagaagctatttctaatttttataga
tttatttggaaattttttattctgaaatgctttatttctttttatt

SEC ID NO. 21 ADN QUE CODIFICA HST DE ARABIDOPSIS MADURA

agaaaaatctcaatccgggcatggtctcaggttgggtgctgctgagctctgatgatcca
gtgctggatagaattgcccgggtccaaaatgcttgctggagatttcttagaccccat
acaatccgcggaacagctttaggatccactgccttgggtgacaagagctttgatagag
aacactcatttgatcaaaggagtcttgactaaaggcactttcaggtcttcttgct
cttattttgtgggaatggttatatagtcggcatcaatcagatctacgacattggaatc
gacaaagtgaacaaaccatacttgccaatagcagcaggagatctatcagtgagctct
gcttgggtggttagtgatattttttgcatagcagggcttttagttgctggatttaac
tttgggtccattcattacaagcctatactctcttggcctttttctggaaccatctat
tctgttccacccctcagaatgaaaagattccagttgcagcatttcttattattgcc
acggtacgaggtttccttcttaactttgggtgtgtaccatgctacaagagctgctctt
ggacttccatttcagtgagtgacactgtggcgttcatcacatcttttgtgacactg
tttgcaactggtcattgctattacaaggaccttctctgatgttgaaggagatcgaag
ttccaaatatcaacctggcaacaaaacttggagtgagaaacattgcattcctcgggt
tctggacttctgctagtaaattatgtttcagccatatacactagcttctacatgcct
caggttttttagaggttagcttgatgattcctgcacatgtgatcttggctcaggctta
attttccagacatgggtactagaaaaagcaaaactacaccaaggaagctatctcagga
tattatcgggttatatggaatctcttctacgcagagatctgttattccccttctc
ta

SEC ID NO. 22 ADN QUE CODIFICA HST DE ARROZ MADURA

cggcgcgacgcccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca
attcgaggaactgccttgggatccatagtcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaaactgataaattgggtggttgggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcggtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattgggtggtattatttgcagctgcgggattttcaattggtgtgacaaacttt
ggacctttcattacctctctatattgccttgggtctattttcttggcaccatatactct
gttccctccattcagacttaagagatatacctggtgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtgggttttctctcaactttgggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctgcctggtgctttcattacatgcttcgtgactttattt
gctttgggtcattgctataaccaagatctccagatggtgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcgggtgcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatggtgctgctatgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaattggtgcctgtgcatgctgcccttgccggttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatataactaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatag

5 SEC ID NO. 23 ADN QUE CODIFICA HST DE VARIANTE DE ARROZ MADURA

cggcgcgacgcccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca
attcgaggaactgccttgggatccatagtcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaaactgataaattgggtggttgggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcggtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattgggtggtattatttgcagctgcgggattttcaattggtgtgacaaacttt
ggacctttcattacctctctatattgccttgggtctattttcttggcaccatatactct
gttccctccattcagacttaagagatatacctggtgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtgggttttctctcaactttgggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctgcctggtgctttcattacatgcttcgtgactttattt
gctttgggtcattgctataaccaagatctccagatggtgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcgggtgcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatggtgctgctatgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaattggtgcctgtgcatgctgcccttgccggttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatataactaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatag

SEC ID NO. 24 ADN que codifica HST de Arabidopsis madura optimizada en codones de células de insectos

gggatccctcgtgcttgctcccaggtcggcgctgctgagtcggacgacccccgtgctg
gaccgtatcgctcgttccagaacgcttgctggcgcttccctgcgctccccacaccatc
cgtggcaccgctctgggtccaccgcccctggtgacccgctgctctgatcgagaacacc
cacctgatcaagtggccctgggtgctgaaggctctgtccggctctgctggctctgatc
tgcggtaacggttacatcgctgggtatcaaccagatctacgacatcggtatcgacaag
gtgaacaagccctacctgcccacgctgctggtgacctgctccgctgcagtcgcttgg
ctgctggctcatcttcttcgctatcgctggctgctggctcgctgggttcaacttcggt
cccttcatcacttccctgtactccctgggctgttccctgggcacatctactccgctg
ccccccctgctatgaagcgttcccgctggctgcttccctgatcatcgctaccgctg
cgtgggttccctgctgaacttcggtgtctaccacgctaccgctgctgctctgggtctg
cccttccagtggtccgctcccgctggcttccatcaccagcttctgtagccctgttcgct
ctggtgatcgctatcaccaaggacctgcccagctggagggtgaccgtaagttccag

atctccaccctggctaccaagctgggtgctgcgtaacatcgcttccctcggttccggc
ctgctgctcgctgaactacgtgtccgctatctccctggcttctacatgccccaggtg
ttccgctgggtccctgatgatccccgctcacgtgatcctggcttccggctgatcttc
cagacctgggtgctcgagaaggctaactacaccaaggaagctatctccggttactac
cgcttcatctggaacctgttctacgctgagtagctgctgttcccttccctgtaa

SEC ID No. 25 Secuencia de a/a de HPPD procedente de la cepa 87-79 de Pseudomonas fluorescens

madqyenpmlmgfefiefasptpglepifeimgftkvathrsknhlyrqgeinl
ilnngpdslyfaeahgsvcgmafrvkdsqqaynralelgaqpihietgpmelnl
paikgiggaplylidrfgegssiydidfvylegvdrnpvgaglkvidhlthnvyrgr
maywanfyeklfnfrearyfdikgeygtltskamsapdgmiriplneesskgagqie
eflmqfngegiqhvafltedlvktwdalkkigmrfmtappdtyemlegrlpnhgep
vdqlqargilldgs siegdkrlllqifsetlmgpvffefiqrkgddgfgegnfkalf
esierdqvrvgvlttd

5

SEC ID NO. 26 Secuencia de a/a de HPPD procedente de Avena sativa

mpptpatatgaaaaavtpehaarsfprvrvnprsdrrfpvlshhvelwcadaasaa
grfsfalgaplaarsdlstgnsahaslllrsgalafllftapyappppqeaataaas
ipsfsadaartfaaahglavrvsvgrvadaaeafrvsvaggarpafapadlghgfgl
aevlygdvvlrfvsvydetdlpflpgfervsspgavdygltrfdhvvgnvpemavp
idymkgflgfhefaeftaedvgtttesglsvvlannseavllplnepvhgtrrrsqi
qstyleyhggpgvqhialasndvrlrtremrartpmggfefmappqakyyegvrriag
dvlseeqikecqlgvlvdrddqgvllqiftkpvgrptfflemiqrigrigcmekdevg
qeyqkgggcggfkggnfselfksiedyekslvkvksvvaqks

SEC ID NO. 27 Secuencia de a/a de HPPD procedente de trigo

mpptpttpaatgaaavtpeharprmvrfnprsdrrfhtlafhhvefwcadaasaagr
fafalgaplaarsdlstgnsvhasqllrsgnlaflftapyangcdaataslpsfsad
aarqfsadhglavrsialrvadaaeafsvdggarpafspvdlgrgfgfaevlyg
dvvlrfvshpdgrdvpflpgfegvsnpdavdygltrfdhvvgnvpelapaaayvagf
tgfhefaefttedvgtaesglnsmlannsegvllplnepvhgtrrrsqiqtflehh
ggsgvqhiavassdvlrtremrarsamggfdflppplpkyegvrriagdvlseag
ikecqlgvlvdrddqgvllqiftkpvgrptfflemiqrigrigcmekdergeeyqkgg
cggfkggnfselfksiedyekslvkvksaavqgs

10

SEC ID NO. 28 Secuencia de a/a de HPPD procedente de Shewanella collwelliana

Maseqnp1gllgieftefatpdlfdmhkvfidfgfsklkkhkqkdivvykqndinfl
lnnekqgfsaqfakthgpaismgwrvedanfafaegavargakpaadevkdldpypai
ygigdsliyfiftdfgddniytsdfealdepiitqekgfievdhltnnvhkgtmeyw
snfykdifgftvryfdikgsqtalisyalrspdgsfcipinegkddrnqideylk

eydgpvqhlafrsrdivasldamegssiqtlldiipeyydtifeklpqvtedrdrik
hhqilvdgdedgyllqiftnlfgpifiefiqrknnlfgfegnfkalfesierdqvr
rgvl

SEC ID NO. 29 Secuencia de ADN de HPPD procedente de la cepa 87-79 de *Pseudomonas fluorescens*

atggccgaccaatacgaaaacccaatgggcctgatgggctttgaatttattgaattc
gcatcgccgactccgggaccctggagccgatcttcgagatcatgggcttcacaaa
gtcgcgacccaccgctccaagaatgtgcacctgtaccgccagggcgagatcaacctg
atcctcaacaaccagcccagacgctggcctcgtacttcgccgccgaacacggccct
tcgggtgtgcggcatggcgttcggggtcaaagactcgcagcaggcttacaaccgcgcg
ttggaactgggcgccagccgattcatatcgaaaccggcccgatggaactcaacctg
ccggccatcaagggcatcggcgggtgcgccgctgtacctgatcgaccgcttcggtgaa
ggagctcgatataatgacatcgacttcgtgtacctcgaagggtgcgaccgcaaccg
gtagcgcggcctcaaggatcgcaccactgaccacaacctgatcgggccgc
atggcctactgggccaacttctacgagaaactggtcaacttcggtgaagcagctac
ttcgatatacaagggcgaatacaccggccttactccaaggccatgagtgccccggac
ggcatgatccgcatccgctgaacgaggaatcgtccaaggggcggccgagatcgaa
gagttcctgatgcagttcaacggcgaggccatccagcacgtggcgttctcaccgaa
gacctggtcaagacctgggatgcgttgaagaagatcggcatgcgcttcatgaccgcg
ccgccggacacctactcgaatgctcgaaggccgctgcaaaccacggcgagccg
gtggaccaactgcaggcgcggtatthttgctggacggctcctcgatcgagggcgac
aagcgcctgctgctgcagatcttctcggaaacctgatgggcccgggttcttcgaa
ttcatccagcgaagggcgacgatgggtttggcgagggcaacttcaaggcgtgttc
gagtcgatcgagcgcgaccaggtacgtcgcgggtgactgaccaaccgac

SEC ID NO. 30 Secuencia de ADN de HPPD procedente de *Avena sativa*

atgcgcgccacccccgccaccgccaccggcgcgcgcggccgcccgtgactccagag
cacgcggccccggagctttccccgagtggtccgcgtcaaccgcgcagcgaccgcttc
cccgtgctctccttccaccagctcgagctctggtgcgcgcgacgccgctcagcggcc
ggacgcttctccttcgcgctcggcgcgcgctcgcgcgcgggtccgacctctcaag
ggaaactccgcgcacgectcctcctgctccgctcgggcgcctcgccttctcttc
acggcgcctacgcgcgcgcgcgagggccgccaaggccgacccaccgctcc
atccccctccttctccgcgcgcgcgcgaggttcgcgcgcgccaccggcctcgcg
gtgctcctcctcgggtccgcgtcgtgacgcgcgcgagcccttccgcgtcagcgta
gccggcggcgcgctcgcgcgccttcgccccagccgacctcggccatggcttcggcctc
gccgaggtcgagctctacggcgacgtcgtgctacgcttcgtcagctaccggacgag
acagacctgccattcctgccaggggttcgagcgcggtgagcagccccggcgcgctggac
tacggcctcagcgggttcgaccacgtcgtgggcaactcgggagatggccccggtc
atagactacatgaaaggcttcttgggggtccacgagttcgcgcgagttcaccgcccgag
gacgtgggcacgaccgagagcgggctcaactcgggtggtgctcgcacaactccgag
gccgtgctgctgccgctcaacgagcccggtgcacggcacaagcgcgagccagata
cagacgtacctggagtatcacggcgggcccggcgtgcagcacatcgcgctcgcagc
aacgacgtgctcaggacgctcagggagatgcgggcgcgcacgccccatgggcggcttc

5

gagttcatggcgcaccgcagggcgaataactatgaaggcgtgcggcgcacatcgaggt
gacgtgctctcgggaagagcagatcaaggaatgccaggagctgggggtgctagtcgac
agggatgatcaaggggtgttgcctcaaatcttcaccaagccagtaggggacaggcca
acgtttttcctggagatgatccaaagaatcgggtgcatggagaaggacgaggtcggg
caagagtaccagaaggggtggctcggcggggtttggcaagggcaatttctccgagctg
ttcaagtccattgaggactatgagaaatcccttgaggtcaagcaatctggttagct
cagaaatcctag

SEC ID No. 31 Secuencia de ADN de HPPD procedente de trigo

atgccgccccacccccaccacccccgcagccaccggcgccgcccgggtgacgcccggag
cacgcgccggccgcccgaatggtccgcttcaacccgcgcagcgaccgcttccacacg
ctcgccttccaccacgctcgagttctggtgcgcggaacgcccctccgcccggccgc
ttcgccttccgctcggcgccgctcgcggccaggtccgacctctccacggggaac
tccgtgacgcctcccagctgctccgctcgggcaacctcgccttccctctcagggc
ccctacgccaacggctgacgcccgcaccgectccctgcccctctctccgcccgac
gcccggcgccagttctccgcccgaacacggcctcgcgggtgcgctccatagcgctgcg
gtcgcgggacgctgccgaggccttccgcccagcgtcgacgggggcccgcgcccggcc
ttcagccctgtggacctcggcccggcctcggcttccgcccaggtcgagctctacggc
gacgtcgtgctccgcttctcagccacccggacggcagggacgtgcccttcttggcg
gggttcgagggcgtagcaaccagacgcccgtggactacggcctgacgcccgttcgac
cacgtcgtcggcaacgtcccggagcttgcggccgcccggcctacgtcgcggggttc
acgggggttccacgagttcggcggagttcacgacggaggacgtgggacggcccagagc
gggctcaactcgatggtgctcggcaacaactcggaggggcggtgctgctgccgctcaac
gagccgggtgacggcaccagcggcggagccagatacagacgcttccctggaacaccac
ggcggctcgggcgtagcacatcgcgggtggccagcagcagcgtgctcaggacgctc
agggagatgctgcccgctccgcccagggcggcttcgacttccctgccaccccgcgtg
ccgaagtactacgaaggcgtgcccgcacatcggccgggatgtgctctcggaggcgcag
atcaaggaatgccaggagctgggggtgctcgtcgcacagggacgaccaaggggtgtg
ctacaaatcttaccagccagtaggggacagggccgacgcttgttccctggagatgatc
cagaggatcgggtgcatggagaaggacgagagaggggaagagtaccagaaggggtggc
tgcggcggggttcggcaaggcaacttctccgagctgttcaagtccattgaagattac
gagaagtcccttgaagccaagcaatctgctgcagttcagggatcatag

SEC ID NO. 32 Secuencia de ADN de HPPD procedente de *Shewanella collwelliana*

gactttatgagtcgcacaggtatcgaagcgggctacatgacctacatcaaaaaggc
gtgccgcatggaccacaacctggctcgtactgaagcctcagtgggcaaaactgaaacc
tatgagtatgcagtaaatggtggacacctttgcaccactgcaactgaccagcatgtc
aatgctgcatgagcaagattacaaccttccctggctagaagagtaaaagcgttca
gccagtgctgaacatctaataaatataacaccagaggtgacaccgaagagtgccctt
ggttgcaataagttgaaagaggataattacatggcaagcgaacaaaaccactgggt
ctacttggatcgaattcactgaatttgcctacaccagatctagattttatgcataaa
gtttttatcgactttggtttctcaaaacttaaaaaacacaagcagaaagatattgtt
tactataaaacaaaatgatattaactttttactcaacaatgaaaaacagggcttttca
gccagtttgccaaaacgcatggcccagccattagttctatgggctggcgtgtagaa

gatgccaaactttgcctttgaaggtgctgtagcccggtggggctaaacccgcagcagat
gaggtgaaagatcttccctatcccgctatctatggcattggtgacagccttatctac
tttatcgatacgtttggcgatgacaacaatatctacacttctgattttgaaagcgtta
gatgagcctatcatcaccgaagagaaaggcttcattgaggtcgacctctaccaat
aatgtccataagggcaccatggaatattggtcaaacttctacaaagacatttttggc
tttacagaagtgcgttacttcgacattaagggtcacaacagctcttatctcttac
gccctgctcgcagatggtagtttctgcattccaattaacgaaggcaaaggcgat
gatcgtaaccaaattgatgagtaacttaaaagagtagcagtgcccaggtgtccaacac
ttagcgttccgtagccgcgacatagttgcctcactggatgccatggaaggaagctcc
attcaaaccttggacataattccagagtagtagcagactatctttgaaaagctgcct
caagtcactgaagacagagatcgcatcaagcatcatcaaatcctggtagatggcgat
gaagatggctacttactgcaaattttcaaaaaaatctatttgggtccaatttttatc
gaaatcatccagcgtaaaaacaatctcgggttttggcgaaggtaatttttaaagcccta
tttgaatcgattgagcgtgatcaggtgctcgcggcgtactctaacaatcaccagt
gatccaacctcaaaaaaccagcatcgcgctgggtttttttattgcagcacaacaataa
acctctacactagca

5 SEC ID NO. 33 Secuencia nucleotídica del potenciador traduccional TMV

tatttttacaacaattaccaacaacaacaacaacaacaacattacaattactatt
tacaattacac

SEC ID NO. 34 Fusión de TMV y secuencia codificante de HST de Arabidopsis

tatttttacaacaattaccaacaacaacaacaacaacaacattacaattactatt
 tacaattacacatatggagctctcgatctcacaatcaccgctgttcggttctcgtc
 tctggcgctcgtttcttagcagcttctcatcatcatcgtccttctgtgcatttagc
 tgggaagtttataagcctcccacgagatgttcgcttcacgagcttatcaacttcaag
 aatgcggtccaaatttgtttcaaccaattatagaaaaatctcaatccgggcatgttc
 tcaggttgggtgctgctgagctgatgatccagtgctggatagaattgcccggttcca
 aaatgcttgctggagatttcttagaccccatacaatccgcggaacagctttaggatc
 cactgccttggtgacaagagctttagatagagaacactcatttgatcaaattggagtct
 tgtactaaaggcacttccaggtcttcttctgctcttatttgggggaatggttatatagt
 cggcatcaatcagatctacgacattggaatcgacaaagtgaacaaaccatacttgcc
 aatagcagcaggagatctatcagtgagctgcttgggttggtagtgatatttttgc
 gatagcagggtttagttgtcggatttaacttgggtccattcattacaagcctata
 ctctcttggccttttctgggaaccatctattctggtccaccctcagaatgaaaag
 attcccagttgcagcatttcttattattgcccaggtacgaggttctcttactt
 tgggtgtgtaccatgctacaagagctgctcttggacttccatttccagtgagtgacc
 tgtggcggtcatcacatcttctgtgacactggttgcactggtcattgctattacaaa
 ggaccttctgatggtgaaggagatcgaaagttccaaatatcaacctggcaacaaa
 acttggagtgagaaacattgcatttctcggttctggacttctgctagtaaattatgt
 ttcagccatatcactagcttctacatgcctcaggttttagaggtagcttgatgat
 tctctgcacatgtgatcttggcttccaggttaattttccagacatgggtactagaaa
 agcaactacaccaaggaagctatctcaggatattatcggtttatatggaatctctt
 ctacgcagagtatctgttattccccttctctag

SEC ID NO. 35 Motivo 1 del polipéptido de HST.

W(R/K)FLRPHTIRGT

SEC ID NO. 36 Motivo 2 del polipéptido de HST.

5 NG(Y/F)IVGINQI(Y/F)D

SEC ID NO. 37 Motivo 3 del polipéptido de HST.

IAITKDLP

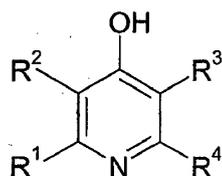
SEC ID NO. 38 Motivo 4 del polipéptido de HST.

Y(R/Q)(F/W)(I/V)WNLFY

10 **EJEMPLOS**

El promedio y la distribución de los niveles de tolerancia o resistencia a herbicidas de un intervalo de sucesos de transformación vegetal primarios se evaluaron de la manera normal en base al daño vegetal, síntomas de blanqueamiento meristemático, etc., a un intervalo de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos se pueden expresar en términos de, por ejemplo, valores de GR50 derivados a partir de las curvas de dosis/respuesta que tienen la "dosis" representada en el eje X y el "porcentaje de exterminio", "efecto herbicida", "números de plantas verdes emergentes", etc., representados en el eje Y, en el que mayores valores de GR50 pueden corresponder, por ejemplo, a mayores niveles de tolerancia a inhibidor inherente (por ejemplo mayor valor de $K_i \times kcat./Km_{HPP}$) y/o nivel de expresión de la HPPD y/o HST expresadas.

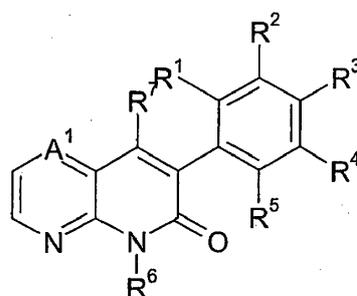
20 Los siguientes experimentos se realizaron usando una variedad de herbicidas inhibidores de HST que se describen en las Tablas A-F.



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1.1	F	Cl	Cl	F

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1.2	Cl	Cl	Cl	Cl
1.3	F	F	Br	F
1.4	F	Br	Br	F

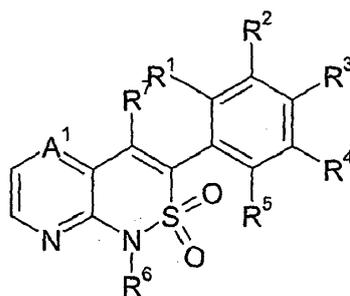
Tabla A. Compuestos 1.1 - 1.4.



Compuesto	A ¹	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
2.1	N	F	H	H	Br	Cl	H	OH
2.2	N	-CH ₃	H	-CH ₃	H	-CH ₃	-CH ₃	OH
2.3	N	F	H	H	F	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.4	N	F	H	H	F	Cl	CH ₃	OH
2.5	N	F	H	H	Br	Cl	CH ₃	OH
2.6	N	H	H	H	H	-OCF ₃	H	OH
2.7	N	F	H	H	F	Cl	H	OH
2.8	N	F	H	H	Br	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.9	N	H	CF ₃	H	H	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.10	N	-CH ₂ CH ₃	H	-CH ₂ CH ₃	H	-CH ₂ CH ₃	H	OH
2.11	N	-CH ₃	H	-CH ₃	H	-CH ₃	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.12	N	H	H	H	H	-OCF ₃	H	OH
2.13	CH	F	H	H	F	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.14	N	Cl	Cl	H	H	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.15	CH	F	H	H	Br	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.16	N	Cl	H	H	H	-CF ₃	-CH ₃	OH
2.17	N	F	H	H	F	Cl	-CH ₂ CF ₃	OH
2.18	N	F	H	H	F	Cl	-C≡CH	OH
2.19	N	H	Cl	H	H	CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.20	N	Cl	H	H	H	CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.21	N	F	H	H	Cl	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.22	CH	Cl	H	H	Br	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
2.23	N	F	H	H	Br	Cl	H	-O(C=O)-Et

Compuesto	A ¹	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
2.24	N	-CH ₃	H	-CH ₃	H	-CH ₃	-CH ₃	-O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.25	N	F	H	H	Cl	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>t</i> Bu
2.26	CH	F	H	H	F	Cl	CH ₃	-O(C=O)- <i>t</i> Bu
2.27	N	F	H	H	Br	Cl	CH ₃	-O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.28	N	Cl	H	H	H	-CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.29	N	F	H	H	F	Cl	H	-O(C=O)- <i>t</i> Bu
2.30	N	F	H	H	Br	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.31	N	Cl	H	H	H	CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.32	N	-CH ₂ CH ₃	H	-CH ₂ CH ₃	H	-CH ₂ CH ₃	H	O(C=O)- <i>i</i> Pr
2.33	N	-CH ₃	H	-CH ₃	H	-CH ₃	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>Et</i>
2.34	N	H	H	H	H	-OCF ₃	H	-O(C=O)- <i>i</i> Pr

Tabla B. Compuestos 2.1 - 2.34.



Compuesto	A ¹	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
3.1	N	CF ₃	H	H	H	Cl	-CH ₂ CH ₃	OH
3.2	N	H	H	Cl	H	Cl	-CH ₃	OH
3.3	N	Cl	H	H	H	CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	OH
3.4	N	Cl	H	H	Cl	Cl	-CH ₂ CF ₂ H	OH
3.5	N	H	H	Br	H	CF ₃	-CH ₂ CF ₂ H	OH
3.6	N	CF ₃	H	H	Cl	H	-CH ₂ CF ₂ H	-O(C=O)- <i>i</i> Pr

Tabla C. Compuestos 3.1 - 3.6.

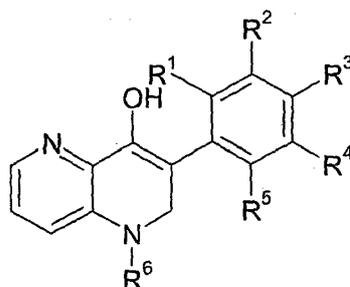


Tabla D. Compuesto 4.1

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶

4.1	F	H	H	F	Cl	CH ₃
-----	---	---	---	---	----	-----------------

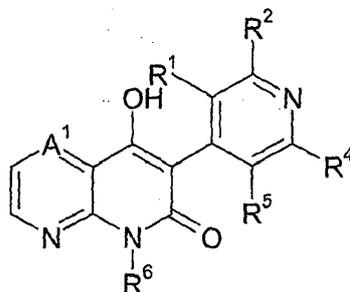


Tabla E. Compuesto 5.1

Compuesto	A ¹	R ¹	R ²	R ⁴	R ⁵	R ⁶
5.1	N	Cl	H	H	Cl	-CH ₂ CF ₂ H

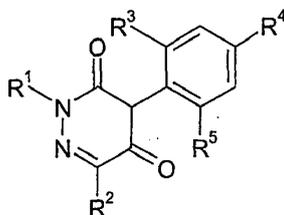


Tabla F. Compuestos 6.1

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
6.1	-CH ₃				

EJEMPLO 1. Clonación y expresión de enzimas HST vegetales en células de insecto y en *E. coli*

Las secuencias codificantes de HST de longitud completa (menos el codón de partida ATG) se amplificaron, con sitios EcoRI flanqueantes, de *Arabidopsis* (SEC ID 11) y arroz (SEC ID12 o SEC ID 13) de librerías de ADNc u obtenidas sintéticamente. Tanto estas secuencias codificantes de longitud completa como también las secuencias codificantes truncadas (que codifican las secuencias maduras partiendo de ARG 64) SEC ID 21 de *Arabidopsis*, SEC ID 22 de arroz y SEC ID 23 de arroz se clonaron en el sitio EcoRI del vector pAcG3X (nº de Catálogo 21415P de BD Biosciences) transformado en y expresado entonces en células de insecto Sf9 (*Spodoptera fugiperda*) (como se describe más abajo) como proteínas de fusión con GST N-terminal que tienen un sitio de escisión del factor Xa. De forma similar, SEC ID 24, la secuencia de ADN optimizada en codones de células de insecto que codifica la HST de *Arabidopsis* truncada madura (ARG 69) se clonó en el sitio EcoRI de pAcG3X y se expresó en células Sf9 como una proteína de fusión con GST N-terminal. El número de acceso SWISSPROT de HST de *Arabidopsis* (proteína) es Q1ACB3, y el número de acceso EMBL de HST de *Arabidopsis* (ADN): DQ231060.

Como alternativa, se clonaron secuencias codificantes de HST madura de *Arabidopsis* y *Chlamydomonas* como enzimas de fusión N-terminales con GST, y se expresaron en *E. coli*.

EJEMPLO 2. Crecimiento de células y preparación de extractos de la enzima HST.

Se hicieron crecer células BL21A1 de *E. coli* que expresan HST de *Arabidopsis* o *Chlamydomonas* madura como una proteína de fusión N-terminal con GST, se cosecharon, se rompieron, y se produjeron fracciones de membrana que expresan HST.

Por ejemplo, se usó 1 ng de ADN recombinante para transformar células BL21 DE3 para obtener un plato de colonias individuales. Una de estas colonias se recogió y se usó para inocular un cultivo nocturno de 100 ml de Caldo Luria (LB) suplementado con 50 ug/ml de kanamicina a concentración final, que se hizo crecer a 37°C con agitación a 220 rpm. A la mañana siguiente, se usaron 10 ml del cultivo nocturno para inocular 1 l de LB estéril

reciente suplementado con 50 ug/ml de kanamicina a concentración final, que se hizo crecer a 37°C con agitación a 220 rpm hasta que la OD alcanzó 0,6 a 600 nm, se indujo con la adición de 0,1 mM de IPTG, y se dejó inducir a 15°C toda la noche. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 4600 rpm durante 10 min. a 4°C, y el pelete se almacenó a -80°C. Por ejemplo, se encuentra que un litro de células produce aproximadamente 5 g de pelete celular húmedo. El pelete celular de *E. coli* se resuspendió entonces en 25 ml de Tris 50 mM, pH 7,5, suplementado con comprimido de inhibidor de proteasas libre de EDTA de Roche (un comprimido en 200 ml de tampón). 10 ml de células se lisaron mediante tratamiento con ultrasonidos en hielo. Las células lisadas resultantes se centrifugaron a 3000g durante 10 min. para peletizar los núcleos/desechos celulares, etc. Se aspiraron 10 ml de sobrenadante y se centrifugaron a 150.000g durante 60 min. a 4°C. El pelete que contiene las membranas se resuspendió en 2 ml del tampón anterior. Estas muestras se almacenaron como alícuotas de 100 ul a -80°C, después de diluirlas con adición de glicerol hasta 50% v/v.

Los vectores de transferencia derivados de pAcG3X de la expresión de HST (descritos anteriormente) se cotransformaron independientemente en células en suspensión de Sf9 con vector de baculovirus parental FlashBac (Oxford Expression Technologies). La amplificación con baculovirus y la expresión de la proteína HST se realizaron según las instrucciones del fabricante.

Cultivos celulares en suspensión de Sf9 se subcultivaron a una densidad de 1,0 EXP 6 células/ml en 140 ml de medio Sf900II (número de catálogo 10902 de Invitrogen) en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Después de 24 horas de cultivo a 27°C agitando a 120 rpm, se midió la densidad celular y se reajustó a 2,0 EXP 6 células/ml en 140 ml. Se añadieron volúmenes de lote de virus amplificado de título conocido para preparar matraces de suspensión para dar una multiplicidad de infección de 10. Los matraces se cerraron herméticamente y se incubaron a 27°C agitando a 125 rpm durante 72 horas, para permitir la expresión adecuada de la proteína sin lisis celular. Las células se cosecharon dividiendo uniformemente los contenidos de los matraces entre tres tubos Falcon de 50 ml y centrifugando a 900 rpm durante 4 minutos. Se descartó el medio, dejando un pelete celular de 3 ml que se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C.

Los peletes procedentes de 25 ml de células Sf9 (tras la inducción de la expresión durante 4 días) se resuspendió en 10 ml de Tris 50 mM, pH 7,5, suplementado con comprimido de inhibidor de proteasas libre de EDTA de Roche (1 comprimido en 200 ml de tampón), y se homogeneizó usando un homogeneizador manual. Las células lisadas resultantes se centrifugaron a 3000g durante 10 min. para peletizar los núcleos/desechos celulares, etc. Se aspiraron 10 ml de sobrenadante y se centrifugaron a 150.000g durante 60 min. a 4°C. El pelete que contiene las membranas se resuspendió en 1 ml del tampón anterior, y las muestras se almacenaron como alícuotas de 100 ul a -80°C, después de ser diluidas primeramente con adición de glicerol hasta 50% v/v.

La transferencia Western para monitorizar la expresión se realiza con incubación con Ab anti-GST conjugado con HRP (GE Healthcare, dilución de trabajo 1:5000), seguido de ECL (GE Healthcare).

También se prepararon directamente a partir de material vegetal reciente preparaciones de la enzima HST para ensayo. Por ejemplo, las preparaciones de la enzima HST son de espinaca. En la primera etapa, se prepararon cloroplastos de espinaca intactos a partir de dos lotes de 500 g de hojas de espinaca bebé reciente (por ejemplo, de la sección de ensaladas del supermercado local). La espinaca preenvasada habitualmente ya está lavada, pero si se compran hojas sueltas se deben aclarar en agua antes de proceder. Se retiran los tallos, las hojas grandes y nervaduras del centro. Cada lote de 500 g de hojas se añade a 1,5 l de "medio de Grinding" en un vaso de precipitado de plástico de 2 l. El medio de Grinding es tampón frío (4°C) 50 mM de Tricina/NaOH a 'H 7,1 que contiene 330 mM de glucosa, 2 mM de isoascorbato de sodio, 5 mM de MgCl₂ y 0,1% de seroalbúmina bovina. El vaso de precipitados, mantenido a 4°C, se colocó en una mezcladora Polytron 6000, se ajustó con una sonda de corte de 1,5", y la mezcla se amasó en impulsos cortos de 5-8 s hasta 8-10K rpm hasta que todas las hojas se maceraron. El homogenado se filtró en un vaso de precipitados de 5 l (embebido en un balde con hielo) a través de cuatro capas de muselina, y dos capas de tela de nailon de malla 50 μ. El filtrado se transfirió a baldes de 250 ml de una centrifuga Beckman GS-6 y se hizo girar a 200 x g (3020 rpm) durante 2 min. a 4°C. El sobrenadante se desaguó y se desechó, para dejar un sedimento de cloroplastos. Los cloroplastos se resuspendieron en unos pocos ml de medio de resuspensión frío mediante remolino suave y uso suave de una brocha de púa empapada en medio de resuspensión. El medio de resuspensión es 50 mM de Hepes/KOH pH 7,8 que contiene 330 mM de sorbitol, 2 mM de EDTA, 5 mM de KH₂PO₄, 2 mM de MgCl₂ y 0,1% de seroalbúmina bovina a 4°C. Los cloroplastos se resuspendieron en 5-10 ml de tampón de resuspensión, se recentrifugaron y se resuspendieron nuevamente a fin de lavarlos. Los cloroplastos se centrifugaron entonces una vez más, y después se rompieron mediante resuspensión en alrededor de 5 ml de 50 mM de Tricina-NaOH pH 7,8 hasta una concentración de proteína de alrededor de 40 mg/ml. La disolución se almacenó congelada a -80°C en alícuotas. Esta resuspensión se descongeló y se usó directamente en ensayos de actividad de HST. Como alternativa, los cloroplastos se preparan, se resuspenden en 50 mM de tampón de Tris/HCl a pH 7,8 que contiene 330 mM de sorbitol (tampón de resuspensión alternativo), y se estratificaron encima de un gradiente de percol (que comprende el mismo tampón que contiene 45% de percol), se hicieron girar, se recogió la fracción de cloroplastos intacta y se lavó 2 ó 3 veces en el tampón de resuspensión alternativo y después se hizo girar nuevamente, se resuspendió en tampón de ruptura (sin sorbitol), se congeló instantáneamente y se almacenó en alícuotas a -80°C.

EJEMPLO 3. Ensayo de enzimas HST.

Las actividades de preniltransferasa (HST) se midieron determinando las velocidades de prenilación de [U-¹⁴C]homogentisato usando difosfato de farnesilo (FDP) como dador de prenilo. El ¹⁴C homogentisato se prepara a partir de ¹⁴C tirosina usando L aminoácido oxidasa y HPPD.

5 Para la prueba de inhibidor, los compuestos se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO añadido hasta 2% v/v no tiene efecto sobre los ensayos. Los ensayos de control contienen DMSO a la misma concentración como en los ensayos que contienen inhibidor.

10 Los ensayos que usan extractos de cloroplastos de espinada (100 µl de volumen final) contienen hasta 2 mg de proteína de cloroplastos, 50 mM de Tricina-NaOH pH 8,5, 50 mM de MgCl₂, 200 mM de difosfato de farnesilo (FDP) y 26 mM de ¹⁴C-homogentisato (167 dpm/pmol). Los ensayos se llevan a cabo durante alrededor de una hora a 28°C. Para estudios de inhibidores, se encuentra que haloxidina a una concentración final de 500 ppm inhibe completamente la reacción. Como alternativa, la detención de la reacción y la extracción con disolventes a tiempo cero también proporciona una referencia de línea base de inhibición del 100%. Los productos de reacciones lipófilas se extraen y se analizan esencialmente como se describe en la bibliografía.

15 La HST de *Chlamydomonas* recombinante expresada en membranas de *E. coli* se evalúa en mezclas de reacción estándar con 200 µM de FDP y 100 µM de ¹⁴C-homogentisato (40 dpm/pmol) en 50 mM de Tricina-NaOH pH 8,5, 20 mM de MgCl₂. Los ensayos se comienzan con la adición de enzima y se llevan a cabo durante ~ 20 min. a 28°C.

20 Las HST recombinantes de *Arabidopsis* y de arroz se expresaron en células de insecto. Los ensayos se realizaron de la misma manera que para HST de *Chlamydomonas*, excepto que la temperatura del ensayo es 27°C. Los ensayos se detienen con 300 µl de mezcla de disolventes (1:2, cloroformo:metanol) y 100 µl de NaCl al 0,5%, se agitaron/mezclaron y se hicieron girar a 13.000 rpm en una centrifugadora eppendorf de mesa durante 5 minutos. Se cargaron 80 µl del extracto de la fase inferior sobre un sistema FLA3000 con placa de TLC (gel de sílice 60, 20 cm x 20 cm), y se hizo correr durante 35 minutos en diclorometano. La radioactividad se cuantificó usando un Fuji Phosphoimager, y la intensidad de las bandas se integró como medida cuantitativa de la cantidad de producto. Se identificaron las bandas que corresponden a 2-metil-6-farnesil-1,4-benzoquinol (MFBQ) oxidado y reducido, y se calculó el total de las dos intensidades de las bandas (oxidada y reducida) a fin de estimar a cantidad total de formación de producto de MFBQ. Las actividades específicas de 8 pmoles de MFBQ min⁻¹ mg⁻¹ proteína (23 pmoles) y 7 pmoles de MFBQ min⁻¹ mg⁻¹ proteína (14 pmoles) se estiman, por ejemplo, para el gen de HST de *Arabidopsis* truncado mediante fusión con GST (SEC ID # 3) expresado en membranas de células de insecto 4 días y 5 días después de la transfección, respectivamente. Se observan resultados similares de la bibliografía anterior en HST de *Arabidopsis* expresada en *E. coli*. La actividad de la HST de arroz truncada fusionada con GST expresada en célula de insecto (SEC ID # 4) es similar. La expresión de las secuencias codificantes de HST no truncadas como fusiones con GST también da actividad de HST. La expresión de la HST de *Arabidopsis* truncada fusionada con GST optimizada en células de insecto (SEC ID # 23) da, por ejemplo, un incremento de aproximadamente 3-10 veces en la actividad específica con respecto a los genes no optimizados.

35 Usando los ensayos anteriores, se da (Tabla 1) el porcentaje de inhibición de la cantidad de MFBQ formada a un intervalo de dosis de inhibidores con respecto a la cantidad de control obtenida sin inhibidor presente. Los mejores inhibidores dan mayor porcentaje de inhibición a dosis más bajas.

40 Se encuentra que para todas las preparaciones de enzima HST ensayadas en las condiciones de reacción prescritas, la formación de MFBQ es de ningún modo la única reacción catalizada por HST a partir de ¹⁴C homogentisato (HGA). De hecho, los productos radiomarcados principales (~ 90%) a partir del ¹⁴C HGA no son MFBQ. Estos otros productos desconocidos también se extraen en cloroformo/metanol pero, en TLC con diclorometano, se encuentra que permanecen en y se cromatografían próximos a la línea base. Cuatro bandas marcadas con ¹⁴C aparentes (presumiblemente que corresponden a dos pares de quinona/quinol) se resuelven parcialmente en una segunda dimensión de TLC usando diclorometano:hexano:acetonitrilo:ácido fórmico 12:3:5:0,5. Ninguna de tales bandas se observa en ausencia de FPP (o de hecho cuando FPP se sustituye por pirofosfato) y, presumiblemente, las bandas corresponden a productos formados debido a farnesilación y descarboxilación que no están fuertemente acopladas, es decir, farnesilación en ausencia de descarboxilación (dando lugar a MFBQ carboxilado) y descarboxilación en ausencia de farnesilación (dando lugar al metil quinol/quinona). Cualquiera que sea su identidad, está bastante claro que estos productos más polares que MFBQ son todos ellos productos de reacción enzimática fiables puesto que, en ausencia de FDP o usando membranas no transgénicas similares (que no expresan HST), no se forman. Además, se encuentra que los inhibidores tales como haloxidina inhiben la formación de estos otros productos de una manera que, a medida que se varía la dosis, es aparentemente colineal con la inhibición de la formación de MFBQ. De este modo, 500 ppm de haloxidina inhiben casi completamente la reacción de la enzima HST, y nunca se forman MFBQ ni cualquiera de los otros productos.

55 De este modo, en una versión mejorada, más sensible y conveniente del ensayo anterior, se prescinde de la etapa de TLC, el tratamiento con 500 ppm de haloxidina (u otro inhibidor a una concentración adecuada) se usa como el "control" de la inhibición del 100%, y una porción del extracto de cloroformo/metanol se toma directamente en un vial de centelleo y se cuenta.

Estos ensayos se realizan habitualmente a 100 µM de ¹⁴C HGA, 25°C durante <20 min. (es decir, durante un período

para el que la velocidad del ensayo de control permanece lineal) y a un intervalo de concentraciones de inhibidores de ensayo usadas de manera que las IC50 se pueden derivar mediante ajuste de la curva a la ecuación de Hill (permitiendo que el valor de la pendiente, n, varíe).

Resultados:

Compuesto	Chlamydomonas. HST %I a 10 ppm	Chlamydomonas.HST %I a 25 ppm	Chlamydomonas. HST %I a 100 ppm	Extracto de cloroplasto de espinaca %I a 25 ppm
Amitrol	0	-	0	-
Clorsulfurón	-	0	-	0
1.1	70	80	95	70
1.2	-	70	-	80
1.3	-	55	-	65
1.4	-	65	-	75
2.1	10	-	40	-
2.2	70	-	95	-
2.3	40	-	85	-
2.4	5	-	45	-
2.5	70	-	90	-
2.6	5	-	20	-
2.7	5	-	20	-
2.8	-	85	-	70
2.9	-	90	-	90
2.10	-	50	-	0
2.11	-	80	-	30
2.12	-	0	-	0
2.13	-	60	-	40
2.14	-	85	-	80
3.1	-	20	-	20
3.2	-	0	-	15
3.3	-	20	-	35
3.4	-	50	-	40
4.1	0	-	0	-
5.1	-	20	-	10

5 TABLA 1. Porcentaje de inhibición observado de la reacción de HST (con respecto a controles) a diversas concentraciones de diversos compuestos usando HST de diversas fuentes (como marcadas). Ensayos basados en TLC y cantidad estimada de MFBQ formada.

Compuesto	IC50 estimada (ppm)	Límite de confianza de 95%
2.3	19*	
2.4	211*	
2.5	48*	
2.8	12	10,5 - 14
2.9	6	4,5 - 8
2.11	31*	
2.13	54*	
2.14	9	8 - 9,5
2.15	12	9,6 - 14
2.16	78	51 - 118
2.17	38	21 - 68
2.18	6	4,3 - 7,5
2.19	6	4,5 - 8
2.20	16	11 - 25
2.21	64	52 - 78
3.5	42	28 - 62
6.1	63	39 - 102

TABLA 2. Valores de IC50 estimados para la inhibición de HST de *Arabidopsis* basado en el ensayo de extracción total (no TLC). * Estos estimados proceden de curvas de dosis de 3 puntos realizadas solamente a 50 µM de HPP.

EJEMPLO 4. Preparación de estirpes de plantas transgénicas estables que expresan una enzima HST heteróloga

Por ejemplo, la SEC ID # 11 de HST de *Arabidopsis* se clonó detrás de una secuencia del promotor CMV 35s doble y una secuencia del potenciador traduccional TMV, y delante del terminador de 3' del gen nos. Este casete de expresión se ligó en pMJB1 (descrito en el documento WO98/20144) y después en pBIN19, y entonces se transformó en las cepas LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* antes de la transformación vegetal.

Por ejemplo, la sec ID # 11 de HST de *Arabidopsis* de longitud completa se fusionó a la secuencia del potenciador traduccional TMV (SEC ID #33) mediante PCR de solapamiento, y, al mismo tiempo, se añadieron un sitio XhoI en 5' y un sitio KpnI en 3' mediante PCR. La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo para eliminar un sitio XhoI interno. La fusión TMV/HPPD se eliminó del pBIN19 mediante digestión con XhoI/KpnI y se sustituyó por la fusión TMV/HST (SEC ID #34). La fusión TMV/HST se clonó ahora detrás de un promotor 35s doble y delante del terminador de 3' del gen nos. Nuevamente, el vector pBIN19 modificado ("pBinAT HST") se transformó entonces en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Igualmente, se construyeron vectores para la transformación vegetal para que comprendan secuencias de ADN de cualquier HST y, por ejemplo, SEC Ids nos. 12-20.

Como alternativa, los vectores comprenden ADN que codifican HST a partir de protozoos fotosintéticos, plantas superiores e inferiores cuyas secuencias derivan de librerías de ADNc usando métodos conocidos por el experto. Por ejemplo, se preparó ARN total a partir de plantones de plantas de 5-20 días usando el método de extracción Tri-Zol (Life Technologies). El ARNm se obtiene, por ejemplo, de *Avena sativa* usando el sistema de purificación de ARNm Oligotex (Qiagen). El extremo 5' de, por ejemplo, el gen de HST de *A. sativa* se identifica usando 5' RACE, llevado a cabo usando el Gene Racer kit (Invitrogen) con cebadores específicos del gen de HST internos (basados en regiones de consenso de HST, por ejemplo SEC No. 35, 36, 37 y 38). El extremo 3' del gen se identifica mediante 3' RACE, realizado usando Themoscript RT (Life Technologies) con cebador oligo dT apropiado y un cebador del gen de HST interno apropiado, seguido de la PCR. Todas las metodologías se llevan a cabo según protocolos proporcionados por los diversos fabricantes señalados. Los productos obtenidos a partir de las reacciones de 5' y 3' RACE se clonaron en 2.1 TOPO (Invitrogen), y los productos clonados se secuenciaron usando cebadores directos

- e inversos M13 universales con un secuenciador de ADN automatizado ABI377. Entonces se diseñaron cebadores para los codones de iniciación y terminación de la traducción del gen de HST, respectivamente. Ambos cebadores se usan conjuntamente con el kit One-step RTPCR (Qiagen o Invitrogen) para obtener secuencias codificantes de longitud completa. Los productos obtenidos se clonaron en pCR 2.1 TOPO, se secuenciaron, y se identificaron como HST mediante comparación con secuencias conocidas en la técnica (y por ejemplo las secuencias de HST aquí).
- Se usó una placa maestra de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector binario pBinAT HST (descrito anteriormente) o un vector binario análogo que comprende una HST diferente para inocular 10 ml de LB que contiene 100 mg/l de rifampicina más 50 mg/l de kanamicina usando una única colonia bacteriana. Esto se incubó toda la noche a 28°C agitando a 200 rpm. Todo este cultivo nocturno se usó para inocular un volumen de 50 ml de LA (más antibióticos). Nuevamente, esto se cultivó toda la noche a 28°C agitando a 200 rpm.
- Las células de *Agrobacterium* se peletizaron centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos, y después se resuspendieron en medio MS con 30 g/l de sacarosa, pH 5,9 hasta una OD (600 nm) = 0,6. Esta suspensión se dispensó en alícuotas de 25 ml en cápsulas de Petri.
- Se usaron cultivos de brotes de tabaco micropropagados clonales para cortar hojas jóvenes (todavía no expandidas completamente). La nervadura media y los márgenes de hojas exteriores se eliminaron y se desecharon, la lámina que queda se cortó en cuadrados de 1 cm. Éstos se transfirieron a la suspensión de *Agrobacterium* durante 20 minutos. Entonces se retiraron los explantes, se golpearon ligeramente sobre papel de filtro estéril para eliminar la suspensión en exceso y después se transfirieron a medio NBM (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, pH 5,9, solidificado con 8 g/l de Plantagar), con la superficie abaxial de cada explante en contacto con el medio. Se transfirieron aproximadamente 7 explantes por placa, que entonces se cerraron herméticamente y se mantuvieron entonces en una incubadora iluminada a 25°C con un fotoperíodo de 16 horas durante 3 días.
- Los explantes se transfirieron entonces a medio NBM que contiene 100 mg/l de kanamicina más antibióticos, para evitar el crecimiento posterior de *Agrobacterium* (200 mg/l de timentina con 250 mg/l de carbenicilina). Entonces se llevó a cabo el subcultivo adicional sobre este mismo medio cada 2 semanas.
- A medida que los brotes comienzan a regenerarse a partir de los explantes de hojas formadores de callos, se retiraron a medio de alargamiento de brotes (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de Plantagar, 100 mg/l de kanamicina, 200 mg/l de timentina, 250 mg/l de carbenicilina, pH 5,9). Las plantas transgénicas estables enraízan fácilmente en 2 semanas. Para proporcionar múltiples plantas por suceso para permitir finalmente más de un ensayo de herbicida por planta transgénica, todos los brotes que enraízan se micropropagan para generar 3 o más clones enraizados.
- Las plantas transgénicas putativas que están enraizando y muestran crecimiento vigoroso de los brotes en el medio que incorpora kanamicina se analizan mediante PCR usando cebadores que amplifican un fragmento de 500 pb en el transgén de *Arabidopsis*. La evaluación de este mismo conjunto de cebadores en tabaco sin transformar mostró concluyentemente que estos cebadores no amplificarían secuencias procedentes del gen de HST de tabaco nativo.
- Para evaluar aproximadamente niveles comparativos de expresión de HST ectópica, se retiraron brotes de tabaco positivos a PCR independientes que tienen hojas jóvenes, se cortaron en cuadrados de 1 cm, y se colocaron en placas sobre medio NBM que incorpora 1 mg/l de haloxidina. Estos explantes de hojas producen callos y finalmente brotes regenerados. Esos explantes que sobreexpresan HST regeneraron callo y brotes verdes. Los explantes no transformados o aquellos procedentes de transformantes con expresión de HST limitada produjeron callo blanqueado y brotes blanqueados raquíuticos que finalmente murieron.
- Se encuentra que los sucesos positivos a PCR corresponden a callo que produjo proliferación de brotes verdes (puntuaciones > = 3) en presencia de haloxidina, y muchos más muestran cierto nivel de tolerancia que es mayor que el material de control sin transformar.
- Plántulas T0 transgénicas enraizadas se transfirieron desde agar y se sembraron en 50% de turba, 50% de tierra John Innes nº 3 o, por ejemplo, tierra MetroMix® 380 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) con un fertilizante de liberación lenta en macetas redondas de 3 pulgadas (7,62 cm) o cuadradas de 4 pulgadas (10,08 cm), y se dejaron regar normalmente para el establecimiento durante 8-12 d en el invernadero. Las condiciones del invernadero son alrededor de 24-27°C día; 18-21°C noche, y aproximadamente un fotoperíodo de 14 h (o más en el verano del Reino Unido). La humedad es ~ 65% y los niveles de luz hasta 2000 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$ a nivel de la mesa de trabajo. Una vez que emerge nuevo tejido y las plantas han alcanzado la etapa de 2-4 hojas, algunos de los clones de cada suceso se pulverizan con sustancias químicas de ensayo disueltas en agua con tensioactivo X-77 al 0,2-0,25%, y se pulverizan desde un soporte de tipo brazo en un pulverizador de carril adecuado que se mueve a 2 mph (3,22 kmph) en una cámara de pulverización DeVries, con la boquilla a alrededor de 2 pulgadas (5,08 cm) desde las partes superiores de las plantas. El volumen de pulverización es adecuadamente 25 galones por acre o, por ejemplo, 200 l/ha.
- Las sustancias químicas de ensayo son, por ejemplo, compuesto 2.3 a 500 g/ha. Al mismo tiempo que las plantas transgénicas se pulverizan, se hace lo mismo también a plantas de tabaco Samsun w/t que se hacen crecer a partir de semillas, así como plantas no transgénicas regeneradas a partir de cultivo tisular y escapes de cultivo tisular no transgénicos. El daño se evalúa frente a plantas de control sin pulverizar de tamaño y desarrollo similares.

SUCESO	Compuesto 3 a 500 g/ha	SUCESO	Compuesto 3 a 500 g/ha
A1	0	E5	1
A12	1,5	E6	2.5
A4	0	E8	0
A6	0	F12	4
A9	0,5	F2	4
B1	2	F3	1
B3	2,5	F4	1
B8	5	F5	2
C11	2,5	F7	0
C12	0	G1	4
C4	2	G4	0
C8	5	G5	1
C9	0	G9	9
D2	10	H8	8
D4	2	W/T_SD	0
D5	0	W/T_SD	0
D6	2,5	W/T_SD	0
D8	3	W/T_TC	0
E1	2	W/T_TC	0
E10	0	W/T_TC	0

5 Tabla 3. Plantas de tabaco transgénicas con HST de *Arabidopsis* evaluadas 11 DAT con el compuesto 2.3 (denominado compuesto 3 en la tabla). En comparación con los controles no tratados, todas las plantas se ven afectadas por el tratamiento a 500 g/ha, y son más pequeñas y el crecimiento está retrasado. Sin embargo, a diferencia de los controles que muestran meristemos blancos y que están esencialmente muertos, muchos de los transgénicos con HST muestran meristemos verdes y se están recuperando, y algunas no muestran esencialmente ningún blanqueamiento. Las plantas se puntúan en una escala de 0 a 10, significando 0 que la planta está sustancialmente blanqueada/quemada y con meristemo muerto/blanco, y significando 10 que toda la planta parece verde y sin daño.

10 Además de los experimentos anteriores, se trataron dos estirpes de plantas transgénicas que expresan HST de *Arabidopsis*, E9 y F6, con haloxidina a 250 g/ha, de manera similar a los métodos descritos anteriormente pero a una etapa de crecimiento ligeramente posterior (4-5 hojas). Tras 8 DAT de evaluación, las plantas wt estaban dañadas un 55 y un 65%, las plantas de la estirpe F6 estaban dañadas un 50 y un 75%, mientras que las plantas de la estirpe 9 sólo estaban dañadas un 20 y un 40%.

15 A 25 DAT, las plantas w/t y F6 permanecieron raquílicas, blanqueadas y pequeñas (daño del 50-70%), mientras que las plantas E9 ahora parecen tan sanas y de un tamaño similar como las plantas de control sin tratar. De este modo, la expresión de HST de *Arabidopsis* confiere resistencia a haloxidina.

20 Las plantas se evalúan a diversos tiempos tras el tratamiento, hasta 28 DAT. Aquellos eventos (por ejemplo C8, G9, E9) que muestran el menor daño por herbicidas de HST se hacen crecer hasta la floración, se meten en bolsas y se dejan autofecundar. Las semillas de sucesos seleccionados se recogen, se siembran nuevamente en macetas y se ensayan de nuevo para determinar la resistencia a herbicidas en un ensayo de pulverización para determinar la resistencia a herbicidas. Los sucesos de una sola copia entre las estirpes de plantas T1 se identifican mediante su relación de segregación 3:1 (por ejemplo, dependiente del constructo, tanto mediante selección con kanamicina como con respecto al fenotipo de resistencia a herbicida) y mediante RT-PCR cuantitativa.

EJEMPLO 5. Producción y ensayo posterior de plantas transgénicas T1 y T2 transformadas para expresar HST de Arabidopsis, HPPD de Avena o HPPD de Pseudomonas

- 5 Estirpes B8 y G9 de plantas de tabaco transgénicas T0 descritas anteriormente en los ejemplos anteriores se autofecundan. Alrededor de 50 de las semillas resultantes procedentes de cada autofecundación de cada estirpe se plantaron en una mezcla de tierra/turba en macetas de 3 pulgadas (7,62 cm), se hicieron crecer en el invernadero durante 7-10 d, y se pulverizaron con 500 g/ha de compuesto 2.3 (todo como se describe en los ejemplos anteriores). Para cada estirpe, tres cuartos de las plantas presentan resistencia visible al herbicida, y de éstas, unas pocas plantas (posibles homocigotos en un suceso de inserción individual) parecen las más resistentes. Unas pocas de estas plantas T1 más altamente tolerantes se autofecundan nuevamente para producir lotes de semillas T2.
- 10 También se plantan en macetas de 3 pulgadas (7,62 cm) 6 semillas de tabaco Samsun w/t y 8 semillas T1 procedentes de los sucesos B8 y G9, se hicieron crecer durante 7 a 12 d, y después, como se describe en los ejemplos anteriores, las plántulas se ensayaron por pulverización para determinar la resistencia a diversas sustancias químicas y se evaluaron a 14 DAT. Las sustancias químicas se formulan en X77 al 0,2% y se pulverizan a un volumen de pulverización de 200 l/ha. Los resultados se representan en la Tabla 4 a continuación. Los resultados demuestran claramente la heredabilidad del fenotipo de resistencia a herbicida. Los resultados también muestran que, aparte de los segregantes no transgénicos obvios, las plantas T1 de tabaco transgénicas que sobreexpresan HST de Arabidopsis presentan resistencia a herbicidas de HST, según se ejemplifica usando los compuestos 2.15 y 2.30, pero muestran que el fenotipo es específico y las plantas no son significativamente tolerantes a los otros dos herbicidas ensayados, norflurazón y atrazina.

20

Estirpe	Rep	Compuesto 2.15 1kg/ha	Compuesto 2.30 150 g/ha	Norflurazón 150 g/ha	Atrazina 500g/ha
B8	1	5	60	35	100
	2	10	0	15	100
	3	15	0	15	100
	4	0	0	15	100
	5	0	0	15	100
	6	0	0	10	100
	7	0	0	15	100
	8	0	60	35	100
G9-2	1	0	0	15	100
	2	0	65	20	100
	3	0	65	15	100
	4	0	0	15	100
	5	0	0	15	100
	6	0	0	20	100
	7	40	0	35	100
	8	0	0	40	100
Control WT	1	30	60	20	100
	2	30	60	15	100
	3	20	70	10	100
	4	50	75	15	100

ES 2 509 897 T3

Estirpe	Rep	Compuesto 2.15 1kg/ha	Compuesto 2.30 150 g/ha	Norflurazón 150 g/ha	Atrazina 500g/ha
	5	50	75	15	100
	6	50	70	15	100

Tabla 4. Evaluación del % de daño por herbicida a plantas de la progenie T1 de las estirpes B8 y G9 de HST de Arabidopsis a 14 DAT con diversos herbicidas.

5 Plantas de tabaco que expresan el gen de HPPD de tipo salvaje de la cepa 87-79 de *Pseudomonas fluorescens* bajo el control operable de la región del promotor de CMV 35S potenciado doble, del terminador Nos3' y del potenciador traduccional TMV, se proporcionaron como se detalla en el Ejemplo 4 del documento WO0246387. Un suceso T0 que muestra tolerancia a mesotriona se autofecundó para producir una estirpe T1 de inserción única (que muestra segregación 3:1 de los fenotipos de tolerancia a herbicida y de selección por kanamicina), que nuevamente se autofecundó adicionalmente para proporcionar la estirpe T2 denominada C2.

10 Semillas de plantas de tabaco de tipo salvaje, de plantas de tabaco C2 y de la progenie T1 de una estirpe de tabaco que expresa HST de Arabidopsis adicional, D2, se plantaron en macetas de 3 pulgadas (7,62 cm), se hicieron crecer, se pulverizaron con compuestos 1.1, 2.30 y 3.6 a las tasas mostradas en la tabla 5. Las puntuaciones del porcentaje de daño se evaluaron a 7 DAT. Aparte de los presuntos segregantes no transgénicos, la estirpe D2 que contiene el constructo de expresión de HST de *Arabidopsis* ofreció el nivel más elevado de tolerancia a los dos herbicidas de HST, ofreciendo solamente la estirpe C2 de HPPD de *Pseudomonas* tolerancia marginal en las

15 condiciones de este ensayo.

Compuesto	Tasa g de ia/ha	WT	WT	WT	C2	C2	C2	C2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2
1.1	25	75	75	75	75	75	75	75	30	55	35	65	65	100	65	55
2.30	150	75	80	85	90	70	80	80	40	65	40	50	55	60	60	90
	300	75	70	80	85	85	85	85	90	60	80	60	95	98	70	90
	450	70	70	75	65	70	85	85	70	35	20	35	55	55	60	65
3.6	150	80	80	80	60	60	60	60	70	10	70	10	30	20	65	25
	300	80	80	75	65	65	65	70	40	65	35	7	85	80	85	75
	450	85	85	85	65	65	65	65	25	55	25	65	70	65	80	75

Tabla 5. Ensayo de estirpes de tabaco Samsun de tipo salvaje (WT), C2 y D2 frente a diversos inhibidores de HST. Los resultados representan % de daño a 7 DAT

Estirpe	% de daño	
	5 DAT	10 DAT
367	25	10
332	30	10
404	45	20
426	45	20
351	50	25
wt	55	25
wt	55	60
wt	55	60

	% de daño		
	Estirpe	5 DAT	10 DAT
wt		50	35
Wt		60	60
wt		60	30

5 Tabla 6. Ensayo de estirpes T0 de tabaco que expresa HST de arabidopsis tratado con mesotriona. 5 estirpes de tabaco transformadas con HST de Arabidopsis se vieron menos dañadas 10 DAT con 10 g/ha de mesotriona que las estirpes de tipo salvaje tratadas de forma semejante. La expresión de HST de Arabidopsis confiere un grado de tolerancia al herbicida de HPPD, mesotriona.

EJEMPLO 6. Resistencia de plantas que expresan HPPD de Avena a herbicidas de HST.

10 Semillas de estirpes T1 segregantes de tabaco que expresan el gen de HPPD de tipo salvaje de Avena sativa bajo el control operable de la región del promotor de CMV 35S potenciado doble, del terminador Nos3' y del potenciador traduccional TMV, se proporcionaron como se describe en el documento WO0246387. Alrededor de 30-40 semillas T1 derivadas de la autofecundación de un suceso T0 tolerante a mesotriona se hicieron crecer hasta plántulas de 7-10 días, se pulverizaron y se evaluaron como se describe anteriormente, y los resultados (a 6 DAT) se representan en la Tabla 7 más abajo. En las condiciones del experimento, parece que la HPPD de Avena ofrece un grado de tolerancia a ambos inhibidores de HST 2.30 y 3.6.

Estirpe	Rep.	Mesotriona 100 g/ha	Compuesto 2.30 150 g/ha	Compuesto 3.6 300 g/ha
WT	1	70	70	65
	2	80	70	65
	3	80	70	65
HPPD de Avena	1	5	55	10
	2	10	55	10
	3	20	55	5
	4	0	55	5
	5	0	55	3
	6	0	55	10
	7	0	40	10
	8	5	50	15
	9	10	45	5
	10	5	40	10
	11	2	45	10
	12	5	50	10
	13	0	50	5
	14	0	60	5
15	8	30	15	
16	5	40	15	
17	3	60	5	

Estirpe	Rep.	Mesotriona 100 g/ha	Compuesto 2.30 150 g/ha	Compuesto 3.6 300 g/ha
	18	15	60	10
	19	3	60	5
	20	0	70	5
	21	15	65	5
	22	10	70	10
	23	5	55	8
	24	0	55	5
	25	5	55	5
	26	0	45	10
	27	80	55	15
	28	5	55	10
	29	3	45	5
	30	3	60	10

Tabla 7. Ensayo de las líneas de tabaco Samsun de tipo salvaje (WT) y de tabaco que expresa HPPD de Avena frente a mesotriona, compuesto 2.30 y compuesto 3.6. Los resultados representan el porcentaje de daño a 6 DAT.

EJEMPLO 7. Tabaco, transformación y selección de transformantes que expresan HST en herbicidas de HST

5 Se usó una placa maestra de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector binario pBinAT HST (descrito en el ejemplo 6) para inocular 10 ml de LB que contiene 100 mg/l de rifampicina más 50 mg/l de kanamicina usando una única colonia bacteriana. Esto se incubó toda la noche a 28°C agitando a 200 rpm.

10 Todo este cultivo nocturno se usó para inocular un volumen de 50 ml de LA (más antibióticos). Nuevamente, esto se cultivó toda la noche a 28°C agitando a 200 rpm. Las células de *Agrobacterium* se peletizaron centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos, y después se resuspendieron en medio MS con 30 g/l de sacarosa, pH 5,9 hasta una OD (600 nm) = 0,6. Esta suspensión se dispensó en alícuotas de 25 ml en cápsulas de Petri.

15 Se usaron cultivos de brotes de tabaco micropropagados clonales para cortar hojas jóvenes (todavía no expandidas completamente). La nervadura media y los márgenes de hojas exteriores se eliminaron y se desecharon, la lámina que queda se cortó en cuadrados de 1 cm. Éstos se transfirieron a la suspensión de *Agrobacterium* durante 20 minutos. Entonces se retiraron los explantes, se golpearon ligeramente sobre papel de filtro estéril para eliminar la suspensión en exceso y después se transfirieron a medio NBM (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, pH 5,9, solidificado con 8 g/l de Plantagar), con la superficie abaxial de cada explante en contacto con el medio. Se transfirieron aproximadamente 7 explantes por placa, que entonces se cerraron herméticamente y se mantuvieron entonces en una incubadora iluminada a 25°C con un fotoperíodo de 16 horas durante 3 días.

20 Los explantes se transfirieron entonces a medio NBM que contiene 0,5 mg/l de haloxidina más antibióticos, para evitar el crecimiento posterior de *Agrobacterium* (200 mg/l de timentina con 250 mg/l de carbenicilina). Entonces se llevó a cabo el subcultivo adicional sobre este mismo medio cada 2 semanas.

25 A medida que los brotes comienzan a regenerarse a partir de los explantes de hojas formadores de callos, se retiraron a medio de alargamiento de brotes (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de Plantagar, 1 mg/l de haloxidina (o similar o concentración de cualquier otro herbicida de HST a una concentración discriminante apropiada), 200 mg/l de timentina, 250 mg/l de carbenicilina, pH 5,9). Los brotes que enraízan y continúan proliferando se analizan para determinar la integración estable del transgén de HST mediante PCR. Finalmente, estos brotes enraizados se transfieren a tierra y se desarrollan en condiciones de invernadero. Semillas T1 se producen a partir de las estirpes T0 seleccionadas,

30 De este modo, se encuentra que el uso de un gen de HST en combinación con un herbicida inhibidor de HST proporciona un medio para la selección de tejido vegetal transgénico.

EJEMPLO 8. Preparación y ensayo de estirpes de plantas transgénicas estables que expresan una enzima HPPD heteróloga

Estirpes transgénicas de tabaco, haba de soja y maíz, etc., se pueden manipular mediante ingeniería para expresar diversas HPPD heterólogas derivadas de, por ejemplo, Avena (SEC ID #26), trigo (SEC ID #27), *Pseudomonas fluorescens* (SEC ID # 25) y *Shewanella collivelliana* (SEC ID #28), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 02/46387.

5 Las semillas de sucesos seleccionados se recogen, se siembran nuevamente en macetas, y se ensayan de nuevo para determinar la resistencia a herbicidas en un ensayo de pulverización para determinar la resistencia al herbicida de HPPD (por ejemplo mesotriona). Sucesos de una sola copia entre las estirpes de plantas T1 se identifican mediante su relación de segregación 3:1 (con referencia a kanamicina y o herbicida) y mediante RT-PCR cuantitativa. Las semillas procedentes de las estirpes de tabaco (var Samsun) T1 así seleccionadas se siembran en macetas de 3 pulgadas (7,62 cm) de diámetro que contiene 50% de turba, 50% de tierra John Innes nº 3. Después del crecimiento hasta la etapa de 3 hojas, las plantas se pulverizan, como se describe anteriormente, a fin de realizar el ensayo para determinar la tolerancia a herbicidas con respecto a plantas de tabaco no transgénicas tratadas de forma similar.

15 Las plantas de tabaco de control y plantas T1 transgénicas que expresan el gen de HPPD de *Pseudomonas* o de trigo se pulverizan a tasas de 37, 111, 333 y 1000 g/ha de inhibidores de HST y, por ejemplo, compuesto 2.3.

Las plantas se evalúan y se puntúan para el % de daño a 16 DAT.

Compuesto	TASA g/ha	HPPD de <i>Pseudomonas</i>	HPPD de trigo	Tabaco w/t
Mesotriona	37	3	0	66
	111	3	2	57
	333	43	0	57
	1000	67	13	54
Compuesto 2.3	37	0	0	17
	111	3	0	40
	333	6	3	47
	1000	10	8	57

20 TABLA 8. Comparación del % de daño observado 16 DAT de plantas de tabaco w/t con plantas transgénicas que expresan HPPD de *Pseudomonas* o de trigo

25 Se observa así que la expresión del gen de HPPD proporciona al tabaco un nivel elevado de resistencia al tratamiento con el inhibidor de HST 2.3, así como a mesotriona. Las plantas de tabaco w/t tratadas muestran meristemos blanqueados, mientras que las plantas transgénicas que expresan HPPD tienen meristemos sanos verdes y nuevas hojas, y casi parecen sin daño. En este ensayo, las plantas fueron relativamente grandes en el momento de la pulverización, y de este modo los controles no se controlaron completamente.

EJEMPLO 9. Preparación de estirpes de plantas transgénicas que expresan diferentes enzimas de HST y HPPD heterólogas, y sus combinaciones apiladas. Ensayo en invernadero para determinar la tolerancia a herbicidas

30 La sec ID 11 de HST (más el codón de partida) de Arabidopsis de longitud completa se clonó detrás de una secuencia del promotor de CMV 35s doble y una secuencia del potenciador traduccional TMV, y enfrente del terminador de 3' del gen nos como se describe previamente. Como se describe anteriormente, este constructo de expresión se clonó en un vector binario (pBIN 35S HST de Arabidopsis), que se transformó en tabaco para producir poblaciones de 30-50 sucesos transgénicos que se subdividieron en la etapa de callo para producir 2-4 plantas clonales a partir de cada "suceso" transgénico, que entonces se regeneraron y transfirieron a tierra antes de transferir al invernadero y antes del ensayo.

35 Justamente de la misma manera, la secuencia del gen de HST de *Chlamydomonas* (AM285678) se optimizó en los codones para tabaco, y se clonó detrás de las secuencias del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor doble y del potenciador del virus del tabaco, y enfrente de un terminador del gen nos, se clonó en un vector binario y se transformó en tabaco para producir una población de plantas T0.

Exactamente como se describe en el ejemplo 5 del documento WO 02/46387 la secuencia del gen de HPPD de trigo (Embl DD064495) se clonó detrás de un promotor de la subunidad pequeña Rubisco (SSU) de Arabidopsis y delante de un terminador del gen nos para producir un “casete de expresión de SSU HPPD de trigo nos”, que se clonó en un vector binario y se transformó en tabaco para producir una población de 30-50 sucesos transgénicos.

5 También se construyó un vector “pBin HST de Arabidopsis/HPPD de trigo” a fin de proporcionar una población de plantas que coexpresan las enzimas HST y HPPD. El casete de SSU HPPD de trigo nos (descrito anteriormente) se clonó en el sitio EcoRI del vector pBin 35S HST de Arabidopsis (descrito anteriormente) para generar el constructo de expresión de HST/HPPD y el vector binario. Nuevamente, éste se transformó en tabaco para producir una población de transformantes primarios. Como alternativa, se produjeron plantas transgénicas que expresan tanto HPPD como HST mediante transformación en primer lugar para expresar una HST o HPPD heteróloga, y después el tejido de la progenie se transformó subsiguientemente con un constructo diseñado para expresar la otra enzima. Por ejemplo, como se describe en el documento WO 02/46387, plantas de tabaco se transforman para expresar HPPD de trigo, de Avena o *Pseudomonas* bajo el control de la expresión del promotor de la pequeña subunidad de rubisco de Arabidopsis, del potenciador traduccional TMV y del terminador de 3' del gen nos. Los ejemplos de sucesos T0 muy tolerantes a mesotriona se autofecundan para obtener semillas T1. Aproximadamente 100 de estas semillas T1 procedentes del suceso individual se esterilizan en la superficie usando 1% de Virkon durante 15 minutos, seguido después del lavado en agua estéril, se colocaron en placas sobre medio MS con 20 g/l de sacarosa, 100 mg/l de kanamicina, pH 5,8, solidificado con 8 g/l de plantagar. Las plantas individuales se recogieron de la población mixta de plantas hemicigotas y homocigotas que germinan, se hicieron crecer *in vitro*, y se micropropagaron para proporcionar un cultivo de brotes recombinantes clonales. Las hojas de estos cultivos de brotes se sometieron a transformación usando constructos y métodos de selección descritos previamente. Para evaluar inicialmente si la coexpresión de HPPD y HST da como resultado niveles elevados de resistencia de la planta a mesotriona en comparación con la expresión de HPPD sola, las plantas de hojas derivadas de cultivos de brotes procedentes de transformantes de HPPD solamente y de transformantes de HPPD más HST se colocaron en placas sobre medio NBM que contiene un intervalo de concentraciones de mesotriona entre 0,1 y 5 mg/l. Los explantes de transgénicos que combinan HPPD y HST pueden mostrar callo verde y un blanqueamiento más limitado de los brotes que se regeneran a concentraciones de mesotriona mayores que los explantes de “antecedentes” de HPPD solamente procedentes del material derivado del suceso de HPPD de planta individual clonal.

30 Las plántulas de “control” se regeneran a partir del material antecedente clonal que expresa HPPD (con HST) sin transformar derivado de una única planta de un solo suceso. Plántulas transgénicas de HST T0 que se transformaron adicionalmente con HST se seleccionan frente a este antecedente como se describe en el ejemplo anterior en haloxidina, y también se regeneraron. Las plántulas se micropropagaron en clones posteriores, se enraizaron y se hicieron crecer en macetas en el invernadero como se describe en los ejemplos previos.

	ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS				ESTIRPES DE TABACO T0 CON HPPD DE TRIGO				ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE CHLAMYDOMONAS					
	7 DAT		26 DAT		7 DAT		21 DAT		17 DAT		26 DAT			
	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch		
WI	80	85	95	100	WT	80	85	95	100	WT	80	85	95	100
WT	80	70	90	85	WT	80	70	90	85	WT	80	70	90	85
WT	85	75	75	35	WT	85	75	75	35	WT	85	75	75	35
WT	80	75	90	65	WT	80	75	90	65	WT	80	75	90	65
WT	75	70	80	50	WT	75	70	80	50	WT	75	70	80	50
WT	80	80	95	85	WT	80	80	95	85	WT	80	80	95	85
807	30	30	75	25	1173	50	35	45	0	510	85	75	90	90
811	0	5	5	0	1176	50	40	85	90	511	40	15	60	0
812	0	10	15	0	1181	60	50	80	70	513	20	0	20	0
813	30	15	30	0	1190	90	60	85	70	516	nr	nr	nr	nr
814	50	15	50	0	1193	70	35	85	70	518	15	0	30	0
816	nr	nr	nr	nr	1202	60	30	30	0	519	nr	nr	nr	nr

ES 2 509 897 T3

ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS					ESTIRPES DE TABACO T0 CON HPPD DE TRIGO				ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE CHLAMYDOMONAS					
7 DAT		26 DAT			7 DAT		21 DAT		17 DAT		26 DAT			
ht	blch	ht	blch		ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch		
817	0	5	5	0	1203	70	35	55	50	521	10	0	20	0
819	nr	nr	nr	nr	1207	40	60	50	0	524	nr	nr	nr	nr
823	70	50	30	100	1210	50	35	50	0	527	55	15	70	0
826	0	70	60	85	1219	70	30	55	0	528	25	0	30	0
828	nr	nr	nr	nr	1224	60	70	80	70	529	10	0	20	0
836	0	5	5	0	1228	30	30	40	0	530	30	0	30	0
838	80	10	80	25	1230	70	40	40	0	534	0	0	10	0
841	80	20	75	0	1231	70	40	50	0	535	nr	nr	nr	nr
844	0	0	5	0	1234	50	50	60	0	536	5	0	30	0
845	40	40	90	90	1250	50	35	60	0	539	0	0	20	0
846	70	70	90	90	1255	70	70	75	70	543	15	0	20	0
848	30	100	50	90	1257			70	65	545	55	20	80	25
852	80	80	90	90	1259	20	30	50	0	546	8	0	20	0
853	30	25	90	85	1260	90	10	95	45	551	nr	nr	nr	nr
855	5	0	15	0	1261			45	0	552	20	0	35	0
857	10	20	35	0	1265	20	40	40	0	553	nr	nr	nr	nr
858	10	0	10	0	1267	70	30	70	50	557	nr	nr	nr	nr
859	nr	nr	nr	nr	1273	30	40	55	0	558	nr	nr	90	85
860	70	0	30	0	1275	40	30	50	0	559	40	15	50	0
861	15	30	30	0	1182	90	10	90	90	563	20	0	25	0
865	20	10	5	0						566	50	0	75	0
867	nr	nr	nr	nr						568	55	65	75	85
874	0	5	5	0						572	30	10	35	0
881	40	0	10	0						574	35	10	30	0
										577	90	90	95	90
										578	nr	nr	nr	nr

TABLA 9. Poblaciones T0 de sucesos de tabaco que contienen, como alternativa, los casetes de expresión descritos anteriormente que tienen 1) el gen de 35 S HST de Arabidopsis, 2) el gen de SSU HPPD de trigo, o 3) el gen de 35S HST de Chlamydomonas. Evaluaciones del daño herbicida a diversos tiempos tras la pulverización con 100 g de compuesto 2.30. El parámetro "ht" se refiere al % en la reducción de la altura con respecto a las plantas de control, mientras que el parámetro "blch" se refiere al % de blanqueamiento observado en el meristemo con respecto a plantas de control. Está claro que la transformación con los tres constructos confiere tolerancia al compuesto 2.30. El número más elevado de plantas que muestran el menor daño (siendo alrededor de 50% de los sucesos < 30% raquíuticos) se observó en las poblaciones transformadas con cualquiera de los dos genes de HST.

5

ES 2 509 897 T3

HST DE ARABIDOPSIS					HPPD DE TRIGO					HST DE CHLAMYDOMONAS		
7 DAT		21 DAT			7 DAT		21 DAT			14 DAT		
	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch		ht	blch	
WT	60	70	70	80	WT	60	70	70	80	WT	60	40
WT	65	65	80	70	WT	65	65	80	70	WT	70	70
WT	60	60	85	80	WT	60	60	85	80	WT	60	60
WT	75	75	60	45	WT	75	75	60	45	WT	70	75
WT	75	70	55	30	WT	75	70	55	30	WT	75	70
WT	70	80	65	45	WT	70	80	65	45	WT	65	65
807	60	70	90	90	1173	10	30	40	0	510	30	15
811	20	20	25	0	1176	50	50	65	25	511	30	15
812	0	15	5	0	1181	10	40	40	0	513	20	5
813	0	30	35	0	1190	70	70	80	25	516	15	5
814	80	20	40	0	1193	50	50	45	0	518	30	15
816	nr	nr	20	0	1202	40	40	40	0	519	nr	nr
817	0	15	15	0	1203	70	70	100	100	521	10	0
819	nr	nr	nr	nr	1207	70	50	80	80	524	nr	nr
823	90	20	90	90	1210	70	60	80	80	527	40	35
826	70	70	80	80	1219	40	40	45	0	528	35	15
828	nr	nr	nr	nr	1224	40	45	40	0	529	15	0
836	30	10	35	0	1228	10	60	50	0	530	10	5
838	40	15	40	0	1230	70	50	40	0	534	30	5
841	70	25	35	0	1231	50	50	80	25	535	20	10
844	40	25	35	0	1234	50	60	90	90	536	25	0
845	80	40	85	90	1250	90	50	90	20	539	5	0
846	80	40	70	60	1255	90	30	90	20	543	20	0
848	nr	nr	30	0	1257	70	70	80	75	545	25	20
852	50	50	50	0	1259	70	70	80	10	546	15	0
853	90	20	nr	nr	1260	30	40	65	0	551	30	15
855	0	10	20	0	1261	70	60	90	90	552	40	15
857	40	30	35	0	1265	nr	nr	50	0	553	10	10
858	50	20	40	0	1267	70	70	85	80	557	25	15
859	nr	nr	nr	nr	1273	10	50	40	0	558	15	5

HST DE ARABIDOPSIS					HPPD DE TRIGO					HST DE CHLAMYDOMONAS		
7 DAT		21 DAT			7 DAT		21 DAT			14 DAT		
ht	blch	ht	blch		ht	blch	ht	blch	ht	blch		
860	40	25	40	0	1275	60	60	80	20	559	25	15
861	40	20	40	0	1182	40	50	55	0	563	55	10
865	0	30	25	0						566	50	25
867	70	60	40	0						568	35	15
874	0	25	15	0						572	30	15
881	nr	nr	35	0						574	nr	nr
										577	80	80
										547	30	15
										578	50	

5 TABLA 10. Poblaciones T0 de sucesos de tabaco que contienen, como alternativa, los casetes de expresión descritos anteriormente que tienen 1) el gen de HST de Arabidopsis, 2) el gen de HPPD de trigo, o 3) el gen de HST de Chlamydomonas. Evaluaciones del daño herbicida a diversos tiempos tras la pulverización con 40 g de compuesto 1.1. El parámetro "ht" se refiere al % en la reducción de la altura con respecto a las plantas de control, mientras que el parámetro "blch" se refiere al % de blanqueamiento observado en el meristemo con respecto a plantas de control. Los tres constructos proporcionan tolerancia al compuesto 1.1. El número más elevado de plantas que muestran el menor daño (más del 50% de los sucesos < 35% raquíticos) se observó en las plantas transformadas con cualquiera de los dos genes de HST.

ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS					ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS + HPPD DE TRIGO					ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE CHLAMYDOMONAS				
7 DAT		26 DAT			7 DAT		26 DAT			17 DAT		26 DAT		
ht	blch	ht	blch		ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch		
WT	85	70	85	90	WT	85	70	85	90	WT	85	70	85	90
WT	85	70	85	90	WT	85	70	85	90	WT	85	70	85	90
WT	85	75	100	100	WT	85	75	100	100	WT	85	75	100	100
WT	90	75	90	80	WT	90	75	90	80	WT	90	75	90	80
WT	90	80	80	70	WT	90	80	80	70	WT	90	80	80	70
WT	90	80	70	40	WT	90	80	70	40	WT	90	80	70	40
807	50	80	95	95	694	30	90	90	90	510	60	10	50	0
811	60	60	60	100	695	50	25	25	0	511	45	0	40	0
812	30	30	30	0	704	30	20	30	0	513	35	0	30	0
813	20	25	60	0	705	nr	nr	85	50	516	60	10	70	0
814	60	40	60	0	706	0	20	50	0	518	50	0	75	0
816	20	0	35	0	714	nr	nr	nr	nr	519	nr	nr	nr	nr

	ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS				ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE ARABIDOPSIS + HPPD DE TRIGO				ESTIRPES DE TABACO T0 CON HST DE CHLAMYDOMONAS					
	7 DAT		26 DAT		7 DAT		26 DAT		17 DAT		26 DAT			
	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch	ht	blch		
817	30	25	30	0	716	50	15	55	0	521	40	0	45	0
819	nr	nr	nr	nr	718	15	15	12	0	524				nr
823	60	70	45	100	722	60	15	60	0	527	80	35	85	20
826	50	100	90	95	724	80	30	90	90	528	50	10	65	30
828	nr	nr	nr	nr	727	0	20	12	0	529	70	70	80	70
836	20	10	50	0	728	75	20	30	0	530	50	0	45	0
838	60	50	90	95	730	60	60	95	95	534	50	0	35	0
841	30	25	30	0	739	0	25	35	0	535	nr	nr	60	65
844	50	25	50	0	740	45	30	10	0	536	50	20	55	25
845	85	85	95	95	742	20	15	30	0	539	45	0	35	0
846	80	100	95	95	745	nr	nr	nr	nr	543	80	70	80	80
848	40	40	50	0	747	60	60	90	90	545	90	85	85	70
852	50	100	90	95	749	35	30	30	0	546	40	0	45	0
853	60	80	95	95	751	30	15	10	0	551	75	65	90	80
855	0	20	30	0	752	30	20	15	0	552	45	0	55	0
857	30	25	35	0	757	45	55	80	100	553	60	0	40	0
858	50	20	55	0	758	20	20	10	0	557	35	0	40	0
859	nr	nr	nr	nr	759	nr	nr	80	20	558	70	65	75	70
860	50	25	20	0	762	40	20	30	0	559	70	70	75	0
861	10	5	25	0	768	30	30	30	0	563	45	0	30	0
865	30	25	30	0	769	50	25	35	0	566	50	10	65	0
867	nr	nr	95	95	773	50	20	35	0	568	90	60	90	75
874	30	20	20	0	776	nr	nr	nr	nr	572	80	50	70	65
881	nr	nr	35	0	778	0	20	12	0	574	45	15	60	0
					786	40	25	85	30	577	80	80	90	90
										578	90	85	90	80

TABLA 11. Poblaciones T0 de sucesos de tabaco que contienen, como alternativa, los casetes de expresión descritos anteriormente que tienen 1) el gen de HST de Arabidopsis, 2) el gen de HPPD de trigo apilado con el gen de HST de Arabidopsis, o 3) el gen de HST de Chlamydomonas. Evaluaciones del daño herbicida a diversos tiempos tras la pulverización con 500 g de compuesto 2.30. El parámetro “ht” se refiere al % en la reducción de la altura con respecto a las plantas de control, mientras que el parámetro “blch” se refiere al % de blanqueamiento observado en el meristemo con respecto a plantas de control. Los tres constructos proporcionan tolerancia al compuesto 2.30. El número más elevado de plantas que muestran el menor daño (más del 50% de los sucesos < 30% raquíuticos) se observó en las plantas transformadas con la combinación apilada de los genes de HPPD y HST.

5

TRATAMIENTO CON 15 g/ha de mesotriona

TABACO CON HST
DE ARABIDOPSIS

TABACO CON HST
DE
CHLAMYDOMONAS

	21 DAT		21DAT
	ht		ht
WT	90	WT	90
WT	85	WT	85
WT	85	WT	85
WT	75	WT	75
WT	75	WT	75
WT nr		WT nr	
807 nr		510	70
811	80	511	55
812	80	513 nr	
813	90	516	85
814	85	518	65
816	80	519 nr	
817	90	521	65
819 nr		524 nr	
823	80	527	80
826	90	528	85
828 nr		529	65
836	70	530	65
838	80	534	70
841	75	535	55
844	90	536	65
845	85	539	55
846	80	543	80
848	85	545	65
852	90	546	75
853	90	551	60
855 nr		552	65
857	85	553 nr	

TRATAMIENTO CON 15 g/ha de mesotriona

	TABACO CON HST DE ARABIDOPSIS	TABACO CON HST DE CHLAMYDOMONAS	
	21 DAT		21DAT
	ht		ht
	90	557	80
nr		558	70
	85	559	65
	85	563	70
	90	566	80
	90	568	70
	75	572	70
	90	574	70
		577	100
		578	70

TABLA 12. Poblaciones T0 de sucesos de tabaco que contienen, como alternativa, los casetes de expresión descritos anteriormente que tienen 1) el gen de HST de Arabidopsis, o 2) el gen de HST de Chlamydomonas. Evaluaciones de daño herbicida a diversos tiempos tras la pulverización con 15 g/ha de mesotriona. Un número de estirpes vegetales que contienen el gen de HST de Chlamydomonas mostró cierta tolerancia a mesotriona, reverdeciendo 3 estirpes en particular y recubriendo una extensión significativamente mayor que las plantas de control tratadas de forma similar.

EJEMPLO 10. Construcción de vectores de transformación de haba de soja.

Un vector binario (17107) para la transformación dicotiledónea (haba de soja) se construye, por ejemplo, con el promotor UBQ3 de Arabidopsis que conduce la expresión de la secuencia codificante de HST de Chlamydomonas (SEC ID # 15), seguido del terminador de 3' del gen Nos. El gen está optimizado en codones para la expresión de haba de soja basándose en la secuencia de aminoácidos predicha de la región codificante del gen de HST. La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen de HST de Chlamydomonas se proporciona en SEC ID # 5. Opcionalmente, el vector de transformación también contiene dos casetes del gen de PAT (uno con el promotor 35S y uno con el promotor COMPUESTO, y ambos genes de PAT están seguidos por el terminador nos) para la selección a base de glufosinato durante el proceso de transformación.

De forma similar, se construyó un vector binario similar (17108) pero que comprende también un casete de expresión que expresa el gen de HPPD de Avena optimizado en codones de haba de soja. En este caso, no hay ningún gen de PAT, y la selección se lleva a cabo usando un herbicida de HPPD, o como se describe aquí, un herbicida de HST.

Ejemplo 11: Establecimiento y selección de plantas T0 de haba de soja

La transformación de haba de soja se logra usando métodos bien conocidos en la técnica. Se tomaron plantas T0 a partir del cultivo tisular al invernadero, en el que se transplantaron en tierra saturada (Redi-Earth® Plug y Seedling Mix, Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) mezclada con 1% de Marathon® granular (Olympic Horticultural Products, Co., Mainland, PA) a 5-10 g/gal de Redi-Earth® Mix en macetas cuadradas de 2" (5,08 cm). Las plantas se cubrieron con cúpulas de humedad y se colocaron en una cámara Conviron (Pembina, ND) con las siguientes condiciones medioambientales: 24°C día; 18°C noche; fotoperíodo 23 h; humedad relativa 80%.

Después de que las plantas se establecieron en la tierra y aparecieron nuevos crecimientos (~ 1-2 semanas), las plantas se muestrearon y se ensayaron para determinar la presencia del transgén deseado mediante análisis Taqman™ usando sondas apropiadas para los genes de HST y/o HPPD, o promotores (por ejemplo prCMP y prUBQ3). Todas las plantas positivas y varias plantas negativas se transplantaron en macetas cuadradas de 4"

(10,16 cm) que contienen tierra MetroMix® 380 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA). Se incorporó en la tierra, a la tasa recomendada, fertilizante de liberación lenta Sierra 17-6-12. Las plantas negativas sirvieron como controles para el experimento de pulverización. Las plantas se recolocaron entonces en un invernadero estándar para que se aclimataran (~ 1 semana). Las condiciones medioambientales son: 27°C día; 21°C noche; fotoperíodo 12 h (con luz ambiental); humedad ambiental. Tras aclimatarse (~ 1 semana), las plantas están listas para ser pulverizadas con los herbicidas deseados.

Ejemplo 12. Mezclas de herbicidas de HPPD/HST. Efecto de la adición de pequeñas cantidades de inhibidor de HPPD sobre la actividad herbicida de herbicidas de HST

Se germinaron plántulas de tabaco (var Samsun) asépticamente en agar constituido en medio de sales de Murashige y Skoog de fuerza 1/3 junto con diversas dosis de herbicida. Se evaluó 7 DAT el daño de blanqueamiento a las plántulas emergentes. Las plántulas se mantuvieron cubiertas bajo perspex transparente y se hicieron crecer a 18°C (noche) y 24°C (día) en un régimen de 16 h al día (~ 500-900 umoles/m²), 8 h de oscuridad. Las plántulas afectadas por el herbicida están blanqueadas y crecen menos. Las respuestas sinérgicas/antagonistas se calculan usando la fórmula de Colby (Colby, S. R. (Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide Combinations", Weeds, 15, p. 20-22, 1967).

% de lesión				
[Haloxidina] / ppm	Haloxidina solamente	Más mesotriona (0,004 ppm) (OBSERVADA)	Más mesotriona (0,004 ppm) (ESPERADA)	(O-E)
37,5	100	100	100	0
18,8	100	100	100	0
9,4	90	100	94	6
4,7	70	100	80	20
2,4	50	90	67,5	22,5
1,2	35	70	58	12
0,6	20	50	48	2
0,3	10	50	41,5	8,5
0,75% v/v DMSO	0	35	35	0

TABLA 13. Efectos de herbicidas de HST + HPPD sobre plantones de tabaco en agar. El % de blanqueamiento observado 7 DAT de semillas de tabaco germinantes en agar se evalúa con diversas dosis de haloxidina y 0,75% v/v de DMSO en presencia o ausencia de 0,004 ppm de mesotriona. A esta dosis, la mesotriona por sí misma da consistentemente un daño de blanqueamiento del 35%, y por lo tanto los valores esperados para el daño en mezcla con las diversas dosis de haloxidina se calculan en consecuencia como se describe por Colby (1967).

En un procedimiento de ensayo de herbicidas alternativo, plántulas de tabaco (var Samsun) germinadas asépticamente en agar obtenidas en medio de sales de Murashige y Skoog de fuerza 1/3 se transfieren después de 4 d para que floten encima de 2,9 ml de medio de cultivo líquido estéril (medio de Murashige y Skoog de media fuerza que contiene 30 mM de sacarosa) en pocillos de placas de 12 pocillos. Los compuestos de ensayo se añaden a diversas dosis y se evalúa el daño de blanqueamiento después de 14-20 DAT. Las plántulas se mantienen cubiertas bajo perspex transparente y se hacen crecer a 18°C (noche) y 24°C (día) bajo un régimen de 16 h día (~ 500-900 umoles/m²), 8 h de oscuridad. Las plántulas continúan creciendo y producen nuevo tejido a lo largo del período de 14-20 DAT, pero están blanqueadas y crecen menos en presencia de concentraciones de herbicida controladoras.

% de lesión			
Compuesto 2.13 / ppm	compuesto 2.13 solamente	Más mesotriona (0,001 ppm)	Más mesotriona (0,0005 ppm)
23	100	100	100
7,67	50	100	100
2,56	0	90	90

% de lesión			
Compuesto 2.13 / ppm	compuesto 2.13 solamente	Más mesotriona (0,001 ppm)	Más mesotriona (0,0005 ppm)
0,85	0	90	40
0,28	0	80	0
0,09	0	80	0
0,03	0	60	0
0,01	0	40	0
0,75% v/v DMSO	0	20	0

5 TABLA 14. Efectos de herbicidas HST + HPPD sobre plántulas de tabaco que crecen en líquido. El % de blanqueamiento observado 20 DAT de plántulas de tabaco en medio de cultivo líquido se evalúa frente a la presencia de diversas concentraciones del herbicida de HST, compuesto 2.13 con 0,75% v/v de DMSO en presencia o ausencia de 0,001 ó 0,0005 ppm de mesotriona. A estas dosis, la mesotriona por sí misma produjo daño de blanqueamiento mínimo, del 20%, o nulo.

A partir de los datos proporcionados, es manifiesto que la adición de una dosis baja de mesotriona sinergiza el efecto herbicida del inhibidor de HST, haloxidina, en plántulas de tabaco que se hacen crecer en agar.

Haloxidina ppm	Haloxidina solamente	+ mesotriona 0,001 ppm
47	100	100
16	100	100
5,2	100	100
1,7	100	100
0,58	90	100
0,19	50	100
0,75% DMSO	0	5

Tabla 15a

Compuesto 2.15 ppm	Compuesto 2.15 solamente	+ mesotriona 0,001 ppm
47	100	100
16	100	100
5,2	40	70
1,7	5	80
0,58	0	5
0,19	5	0
0,75% DMSO	0	5

Tabla 15b

10 TABLAS 15a y 15b. Lesión por herbicida de HST + HPPD sobre plántulas de tabaco que crecen en medio de cultivo líquido. El % de blanqueamiento observado 14 DAT de los plántulas de tabaco en medio de cultivo líquido se evalúa frente a la presencia de diversas concentraciones de los herbicidas de HST, haloxidina (Tabla 15a) y el compuesto 2.15 (Tabla 15b), con 0,75% v/v de DMSO en presencia o ausencia de 0,001 ppm de mesotriona. A esta dosis, la mesotriona produjo daño mínimo (0-5% v).

15 En cultivo líquido, el efecto sinérgico de mesotriona sobre la actividad del inhibidor de HST 2.13 es incluso más manifiesto que aquel en haloxidina. Incluso la adición de una dosis de mesotriona, que no produce ella misma

ningún daño visible en absoluto, da como resultado niveles de lesión de blanqueamiento de 40, 90 y 100% a dosis de compuesto 2.13 a las que el nivel esperado de control (según Colby) es sólo 0, 0 y 50%. De forma similar, a la mayor dosis de mesotriona, se observa un blanqueamiento de 80 ó 90% a lo largo de un intervalo de tasas de compuesto 2.13, en las que se espera sólo 20%. De forma similar, en condiciones similares, y en experimentos repetidos, hay claros efectos sinérgicos de cantidades bajas de mesotriona sobre la lesión observada bajo respuestas de dosis de haloxidina y compuesto 2.15.

EJEMPLO 13. CONTROL DE MALAS HIERBAS EN INVERNADERO POR MEZCLAS DE HERBICIDAS DE HST Y HPPD

Se plantaron semillas de malas hierbas en bandejas que contienen tierra adecuada (por ejemplo 50% de turba, 50% de tierra John Innes nº 3) y se hicieron crecer en las condiciones del invernadero a 24-27°C día; 18-21°C noche y aproximadamente un fotoperíodo de 14 h (o más en el verano del Reino Unido).

La humedad es ~ 65% y los niveles de luz hasta 2000 $\mu\text{moles/m}^2$ en la mesa de trabajo. Las bandejas se pulverizan con sustancias químicas de ensayo disueltas en agua con 0,2-0,25% de tensioactivo X-77, y se pulverizaron desde un soporte de tipo brazo en un pulverizador de carril adecuado que se mueve a alrededor de 2 mph (3,22 kmph) en un pulverizador de carril adecuado (por ejemplo una cámara de pulverización DeVries, con la boquilla a alrededor de 2 pulgadas (5,08 cm) desde las partes superiores de las plantas. El volumen de pulverización es adecuadamente 500-1000 l/ha. Las pulverizaciones se llevaron a cabo tanto preemergencia como sobre pequeñas plantas a alrededor de 7-12 d post-emergencia.

Las plantas se evalúan 14 DAT, y el daño herbicida se puntúa en una escala de 0 a 100%. El inhibidor de HST compuesto 2.30 (denominado compuesto A en la tabla 16 y 17), haloxidina (compuesto 1.1) y compuesto 2.13 (denominado compuesto AE en las tablas 16 y 17) se pulverizan a tasas entre 0 y 500 g/ha. La mesotriona se aplica a una tasa muy baja de 1 g/ha, a la cual no provoca esencialmente ningún daño (< 10%).

APLICACIÓN POST-EMERGENCIA

I.a.	Tasa g/ha	SETFA				ECHCG				ALOMY			
		sin mesatrion a	1 g ia ha ⁻¹ mesotrion a	colby	sin mesatrion a	1 g ia ha ⁻¹ mesotrion a	colby	sin mesatrion a	1 g ia ha ⁻¹ mesotrion a	colby			
Mesotriona	1	0			8			0					
Compuesto A	500	70	75	5	67	75	6	23	35	12			
	250	65	75	10	65	68	0	15	22	7			
	125	57	62	5	57	53	-7	13	20	7			
	63	33	42	8	42	42	-5	5	10	5			
	31	32	42	10	18	38	13	3	3	0			
	16	23	18	-5	12	17	-2	2	2	0			
Compuesto AE	500	0	0	0	0	20	12	7	5	-2			
	250	0	0	0	0	22	13	2	3	2			
	125	0	0	0	0	15	7	0	0	0			
	63	0	0	0	0	8	0	0	3	3			
	31	0	0	0	0	5	-3	0	2	2			
	16	0	0	0	0	5	-3	0	0	0			
	500	100	100	0	98	100	2	95	95	0			
Haloxidina	250	100	100	0	83	97	12	90	92	2			
	125	93	97	3	70	78	6	78	83	5			

APLICACIÓN POST-EMERGENCIA

I.a.	Tasa g/ha	SETFA			ECHCG			ALOMY		
		sin mesatrion	1 g la ha ⁻¹ mesotrion	colby	sin mesatrion	1 g la ha ⁻¹ mesotrion	colby	sin mesatrion	1 g la ha ⁻¹ mesotrion	colby
Mesotriona	1	0			8			0		
	63	80	92	12	57	75	15	53	68	15
	31	68	82	13	52	67	11	27	33	7
	16	42	27	-15	33	57	18	13	23	10

TABLA 16. Control post-emergencia de malas hierbas mediante mezclas de herbicidas de HST/HPPD. Los números dados a conocer corresponden al % de daño observado.

EJEMPLO 14. Estudios adicionales que muestran sinergia entre herbicidas de HPPD y de HST

5 En un ensayo adicional, cuyos resultados se representan en las tablas 18 y 19, se plantan semillas de malas hierbas en bandejas que contienen 50% de turba/50% de tierra de John Innes nº 3, y se hacen crecer en el invernadero a 24-27 C día; 18-21 C noche y aproximadamente un fotoperíodo de 15 h. La humedad es ~ 65%, y los niveles de luz en la mesa de trabajo son hasta 2 mmoles/m². Nuevamente, todas las sustancias químicas de pulverización se disuelven en 0,2% de tensioactivo X77 y se pulverizan desde un soporte de tipo brazo en un pulverizador de carril que se mueve a 2 mph (3,22 kmph) con la boquilla ajustada a alrededor de 2 pulgadas (5,08 cm) desde las partes superiores de las plantas. El volumen de pulverización es adecuadamente 500 l/ha. Las pulverizaciones se llevaron a cabo tanto preemergencia como post-emergencia sobre pequeñas plantas a alrededor de 7-12 d post-emergencia. 10 Las plantas se evalúan a 14 DAT, puntuándose el daño herbicida en una escala de 0 a 100%. El herbicida inhibidor de HPPD es el compuesto A22 (4-hidroxi-3[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-bíciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona), que se pulverizó a 2 g/ha tanto solo como en mezcla con diversos herbicidas de HST. En las Tablas 18 y 19 se representan los resultados y tasas de pulverización. Nuevamente, la fórmula de Colby se ha usado para calcular puntuaciones de sinergia observadas tras el tratamiento con la mezcla basada en los resultados obtenidos con los componentes individuales solos. Se observa sinergia positiva entre el herbicida de HPPD y una amplia variedad de herbicidas inhibidores de HST aplicados tanto pre como post-emergencia a lo largo de una variedad de malas hierbas. 15

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO POST_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)
Compuesto A22 solo	2	20		5		50		2		10		30	
	2	15		5		55		2		2		30	
Compuesto 2.15 solo	250	15		0		0		5		2		2	
	62,5	10		0		0		0		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.15 + 2 g/ha compuesto A22	250	60	30,125	10	5	50	-2,5	30	23,1	10	4,08	60	28,6
	62,5	50	24,25	10	5	50	-2,5	20	18	0	-4	50	20
	15,625	30	12,5	0	-5	40	-12,5	10	8	0	-4	40	10
Compuesto 3.5 solo	250	10		5		70		65		40		30	
	62,5	10		0		15		30		10			
	15,625	2		0		5		2		2		155	
Compuesto 3.5 + 2 g/ha compuesto A22	250	30	4,25	10	0,25	75	-10,75	50	-15,7	55	12,5	60	9
	62,5	25	0,75	2	-3	75	15,375	40	8,6	30	16,4	50	9,5
	15,625	25	5,85	0	-5	70	15,125	2	-1,96	5	-0,92	50	16,5
Compuesto 2.21 solo	250	40		20		70		80		60		40	
	62,5	20		10		30		30		20		10	
	15,625	5		0		10		5		2		0	

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO POST_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)
Compuesto 2.21 + 2 g/ha compuesto A22	250	50	-0,5	60	36	80	-5,75	80	-0,4	60	-1,6	65	7
	62,5	50	16	50	35,5	70	3,25	75	43,6	50	26,8	65	28
	15,625	30	8,375	20	15	75	17,75	30	23,1	50	44,09	50	20
Compuesto 2.14 solo	250	50		20		90		60		70		65	
	62,5	30		20		60		60		60		50	
	15,625	15		10		40		30		25		30	
Compuesto 2.14 + 2 g/ha compuesto A22	250	60	1,25	60	36	80	-15,25	80	19,2	75	3,8	80	4,5
	62,5	50	7,75	40	16	80	-1	60	-0,8	70	8,4	70	5
	15,625	50	20,125	30	15,5	75	3,5	50	18,6	55	27	60	9
Compuesto 2.19 solo	250	50		70		85		80		80		75	
	62,5	30		50		70		70		60		45	
	15,625	15		30		40		20		30		30	
Compuesto 2.19 + 2 g/ha compuesto A22	250	70	11,25	80	8,5	90	-2,875	80	-0,4	80	-0,8	85	2,5
	62,5	65	22,75	75	22,5	80	-5,75	70	-0,6	80	18,4	80	18,5
	15,625	50	20,125	60	26,5	80	8,5	60	38,4	80	47,2	80	29
Compuesto 2.18 solo	250	70		50		70		80		85		70	
	62,5	60		30		65		60		60		40	
	15,625	15		1		10		5		10		2	
Compuesto 2.18 + 2 g/ha compuesto A22	250	70	-5,25	75	22,5	85	-0,75	80	-0,4	85	-0,6	85	6
	62,5	50	-17	60	26,5	80	-3,375	70	9,2	80	18,4	80	22
	15,625	50	20,125	40	34,05	70	12,75	50	43,1	65	51,4	60	28,6
Compuesto 2.9 solo	250	20				70		70		65		70	
	62,5	20		10		50		55		50		40	
	15,625	10		2		30		15		20		20	
Compuesto 2.9 + 2 g/ha compuesto	250	70	36	50	30,75	85	-0,75	75	4,4	80	13,6	85	6
	62,5	70	36	40	25,5	80	3,75	70	14,1	80	28	75	17

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO POST_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)
A22	15,625	50	24,25	40	33,1	75	8,25	50	33,3	60	36,8	70	26
Compuesto 2.3 solo	250	55		45		65		70		60		40	
	62,5	40		35		55		50		40		30	
	15,625	10		2		2		20		5		5	
Compuesto 2.3 + 2 g/ha compuesto A22	250	50	-12,875	60	12,25	85	1,625	70	-0,6	60	-1,6	65	7
	62,5	50	-0,5	55	16,75	75	-3,625	60	9	60	17,6	60	9
	15,625	40	14,25	50	43,1	75	21,55	50	28,4	60	51,2	60	26,5
Compuesto 2.8 solo	250	50		60		80		85		60		65	
	62,5	45		20		50		55		65		40	
	15,625	30		5		40		20		5		10	
Compuesto 2.8 + 2 g/ha compuesto A22	250	70	11,25	65	3	90	-0,5	90	4,7	65	3,4	70	-5,5
	62,5	60	5,375	60	36	75	-1,25	80	24,1	60	-6,4	70	12
	15,625	50	7,75	50	40,25	70	-1,5	60	38,4	50	41,2	55	18
Compuesto 2.17 solo	250	50		50		55		50		40		40	
	62,5	15		5		10		15		10		5	
	15,625	5		0		0		1		0		0	
Compuesto 2.17 + 2 g/ha compuesto A22	250	55	-3,75	60	7,5	70	-8,625	40	-11	55	12,6	50	-8
	62,5	50	20,125	50	40,25	70	12,75	40	23,3	50	36,4	50	16,5
	15,625	40	18,375	40	35	60	7,5	35	32,02	35	31	30	0
Compuesto 2.16 solo	250	50		40		70		70		65		50	
	62,5	40		2		40		30		30		15	
	15,625	5		0		5		10		1		2	
Compuesto 2.16 + 2 g/ha compuesto A22	250	75	16,25	70	27	75	-10,75	70	-0,6	75	9,3	70	5
	62,5	70	19,5	40	33,1	60	-11,5	40	8,6	50	18,6	60	19,5
	15,625	40	18,375	40	35	60	5,125	20	8,2	40	37,02	50	18,6
Compuesto	250	50		70		70		75		80		70	

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO POST_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)
2.28 solo	62,5	40		50		35		50		50		40	
	15,625	15		10		1		5		2		2	
Compuesto 2.28 + 2 g/ha compuesto A22	250	75	16,25	80	8,5	85	-0,75	80	4,5	75	-5,4	80	1
	62,5	75	24,5	70	17,5	80	10,875	70	19	75	24	80	22
	15,625	70	40,125	60	45,5	75	22,025	50	43,1	65	61,04	60	28,6
Compuesto 2.25 solo	250	40		10		55		60		40		30	
	62,5	30		2		10		30		5		2	
	15,625	10		0		2		15		1		1	
Compuesto 2.25 + 2 g/ha compuesto A22	250	60	9,5	60	45,5	75	-3,625	80	19,2	60	18,8	70	19
	62,5	40	-2,25	30	23,1	70	12,75	50	18,6	30	23,1	50	18,6
	15,625	30	4,25	15	10	60	6,55	30	13,3	25	22,02	40	9,3
Compuesto 2.20 solo	250	55		80		85		95		80		90	
	62,5	50		60		45		50		65		60	
	15,625	10		20		15		30		25		20	
Compuesto 2.20 + 2 g/ha compuesto A22	250	80	17,125	85	4	90	-2,875	90	-5,1	85	4,6	85	-8
	62,5	70	11,25	80	18	85	11,125	70	19	80	14,3	80	8
	15,625	65	39,25	60	36	80	20,375	70	38,6	80	53,5	80	36
Compuesto 6.1 solo	250	20		30		80		75		70		50	
	62,5	15		10		50		40		20		5	
	15,625	5		0		2		10		0		0	
Compuesto 6.1 + 2 g/ha compuesto A22	250	60	26	70	36,5	97	6,5	80	4,5	70	-0,6	75	10
	62,5	50	20,125	50	35,5	75	-1,25	30	-11,2	60	38,4	75	41,5
	15,625	45	23,375	40	35	65	11,55	20	8,2	30	28	50	20

TABLA 18. Control de malas hierbas post-emergencia de un intervalo de malas hierbas. % de puntuaciones de control tras las pulverizaciones con una variedad de inhibidores de HST solos o en mezcla con A22 (ensayos de una sola réplica solamente)

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO PRE_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E) Obs	Obs	Colby (O-E)
Compuesto A22 solo	2	2		2		0		0		5		5	
	2	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.15 solo	250	0		0		0		0		0		0	
	62,5	0		0		0		0		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.15 + 2 g/ha compuesto A22	250	2	1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	30	27,5
	62,5	2	1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	20	17,5
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	0	-2,5
Compuesto 3.5 solo	250	2		0		0		0		0		0	
	62,5	0		0		0		0		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 3.5 + 2 g/ha compuesto A22	250	5	2,02	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	2	-0,5
	62,5	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	2	-0,5
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	0	-2,5
Compuesto 2.21 solo	250	1		0		0		5		2		5	
	62,5	0		0		0		2		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.21 + 2 g/ha compuesto A22	250	10	8,01	85	84	15	15	10	5	10	5,55	30	22,625
	62,5	0	-1	0	-1	0	0	0	-2	1	-1,5	0	-2,5
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	0	-2,5
Compuesto 2.14 solo	250	5		5		2		20		20		50	
	625	0		0		0		2		2		5	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.14 + 2 g/ha	250	50	44,05	30	24,05	50	48	30	10	40	18	97	45,75
	62,5	0	-1	0	-1	0	0	10	8	20	15,55	50	52,625

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO PRE_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E) Obs	Obs	Colby (O-E)
compuesto A22	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	20	17,5
Compuesto 2.19 solo	250	10		20		60		40		60		90	
	62,5	2		0		0		10		5		50	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.19 +2 g/ha compuesto A22	250	65	54,1	80	59,2	65	5	70	30	70	9	80	-10,25
	62,5	65	62,02	30	29	NC	NC	20	10	5	-2,375	60	8,75
	15,625	30	29	2	1	2	2	0	0	2	-0,5	10	7,5
Compuesto 2.18 solo	250	30		0		50		40		25		20	
	62,5	30		0		0		10		20		20	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.18 + 2g/ha compuesto A22	250	60	29,3	30	29	65	15	60	20	60	33,125	80	58
	62,5	20	-10,7	10	9	0	0	5	-5	2	-20	2	-20
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	1	-1,5	0	-2,5
Compuesto 2.9 solo	250	40		65		60		50		30		60	
	62,5	0		0		0		2		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.9 + 2 g/ha compuesto A22	250	40	-0,6	50	-15,35	35	-25	50	0	60	28,25	90	29
	62,5	2	1	1	0	0	0	2	0	20	17,5	75	72,5
	15,625	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	60	57,5
Compuesto 2.3 solo	250	20		40		50		40		30		50	
	62,5	0		0		0		2		5		10	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.3 2 g/ha compuesto A22	250	5	-15,8	10	-30,6	20	-30	20	-20	40	8,25	80	28,75
	62,5	0	-1	5	4	0	0	10	8	30	22,625	70	57,75
	15,625	NC	NC	0	-1	0	0	0	0	20	17,5	30	27,5

ES 2 509 897 T3

Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO PRE_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E) Obs	Obs	Colby (O-E)
Compuesto 2.8 solo	250	2		30		60		15		10		50	
	62,5	0		0		0		1		0		2	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.8 + 2 g/ha compuesto A22	250	2	-0,98	2	-28,7	5	-55	20	5	30	17,75	60	8,75
	62,5	2	1	1	0	0	0	20	19	30	27,5	55	50,55
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	10	7,5	40	37,5
Compuesto 2.17 solo	250	0		0		0		2		10		10	
	62,5	0		0		0		0		0		0	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.17 + 2 g/ha compuesto A22	250	2	1	1	0	0	0	10	8	40	27,75	60	47,75
	62,5	0	-1	0	-1	0	0	0	0	2	-0,5	2	-0,5
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	1	-1,5	1	-1,5
Compuesto 2.16 solo	250	0		0		40		50		45		60	
	62,5	0		0		0		5		10		15	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.16 + 2 g/ha compuesto A22	250	2	1	10	9	40	0	35	-15	30	-16,375	50	-11
	62,5	5	4	15	14	0	0	2	-3	10	-2,25	20	2,875
	15,625	0	-1	0	-1	1	1	0	0	5	2,5	25	22,5
Compuesto 2.28 solo	250	10		30		60		50		60		80	
	62,5	0		0		0		2		25		50	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.28 + 2 g/ha compuesto A22	250	20	9,1	30	-0,7	55	-5	60	10	70	9	97	16,5
	62,5	1	0	15	14	5	5	10	8	15	-11,875	20	-31,25
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	2	2	10	7,5	20	17,5
Compuesto 2.25 solo	250	2		5		10		20		15		30	
	62,5	1		0		0		2		1		0	

ES 2 509 897 T3

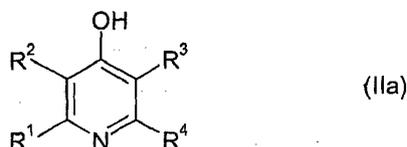
Compuesto	Tasa (g/ha)	PUNTUACIONES 14DAT TRATAMIENTO PRE_EMERGENCIA											
		SIDSP		DIGSA		PANMI		BRAPL		SETFA		ECHCG	
		Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E)	Obs	Colby (O-E) Obs	Obs	Colby (O-E)
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 2.25 + 2 g/ha compuesto A22	250	10	7,02	0	-5,95	10	0	40	20	15	-2,125	30	-1,75
	62,5	0	-1,99	0	-1	0	0	5	3	15	11,525	40	37,5
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	0	-2,5
Compuesto 2.20 solo	250	5		20		30		60		65		90	
	62,5	0		0		2		10		20		15	
	15,625	0		0		0		0		0		1	
Compuesto 220 + 2 g/ha compuesto A22	250	5	-0,95	10	-10,8	50	20	60	0	45	-20,875	85	-5,25
	62,5	5	4	2	1	0	-2	20	10	50	28	85	67,875
	15,625	0	-1	10	9	0	0	2	2	10	7,5	20	16,525
Compuesto 6.1 solo	250	0		2		40		10		20		60	
	62,5	0		0		0		0		2		1	
	15,625	0		0		0		0		0		0	
Compuesto 6.1 + 2 g/ha compuesto A22	250	80	79	80	77,02	80	40	97	87	98	76	85	24
	62,5	10	9	40	39	20	20	10	10	15	10,55	30	26,525
	15,625	0	-1	0	-1	0	0	20	20	30	27,5	50	47,5

TABLA 19. Control de malas hierbas pre-emergencia de un intervalo de malas hierbas. % de puntuaciones de control tras las pulverizaciones con una variedad de inhibidores de HST solos o en mezcla con A22

Los datos proporcionados en las tablas anteriores indican que, en muchos casos, la adición de niveles incluso bajos (subletales) de mesotriona mejora el control de malas hierbas por los herbicidas inhibidores de HST tanto pre como post-emergencia.

REIVINDICACIONES

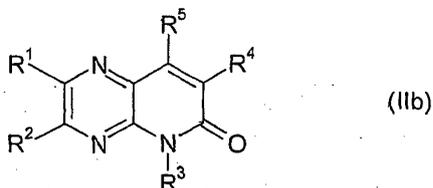
1. Un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus que comprende plantas de cultivos y malas hierbas, en el que el método comprende la aplicación al locus de una cantidad controladora de malas hierbas de una composición plaguicida que comprende un herbicida inhibidor de homogentisato solanesil transferasa (HST) seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (IIa)



en la que

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son independientemente hidrógeno o halógeno; con la condición de que al menos tres de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 sean halógeno; o sales de los mismos;

un compuesto de fórmula (IIb)



en la que

R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, alquilo de C_1-C_4 , haloalquilo de C_1-C_4 , halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^6 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R^6 , que pueden ser iguales o diferentes;

R^3 es hidrógeno, alquilo de C_1-C_{10} , alquenoilo de C_2-C_{10} , alquinilo de C_2-C_{10} , cicloalquilo de C_3-C_{10} , cicloalquil C_3-C_{10} -alquilo de C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_{10} -alquilo de C_1-C_6 , cianoalquilo de C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} -carbonil-alquilo de C_1-C_6 , *N*-alquil C_1-C_3 -aminocarbonil-alquilo de C_1-C_6 , *N,N*-di-(alquil C_1-C_3)-aminocarbonil-alquilo de C_1-C_6 , aril-alquilo de C_1-C_6 o aril-alquilo de C_1-C_6 en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^7 , que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicil-alquilo de C_1-C_6 o heterocicil-alquilo de C_1-C_6 en el que el resto heterocicilo está sustituido con uno a tres R^7 , que pueden ser iguales o diferentes;

R^4 es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^8 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R^8 , que pueden ser iguales o diferentes;

R^5 es hidroxilo, R^9 -oxi-, R^{10} -carbonilo-, tri- R^{11} -sililo- o R^{12} -sulfonilo-, cada R^6 , R^7 y R^8 es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_4 , alquenoilo de C_2-C_{10} , alquinilo de C_2-C_{10} , hidroxilo, alcoxi de C_1-C_{10} , haloalcoxi de C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_{10} -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquilo de C_3-C_7 , cicloalcoxi de C_3-C_7 , cicloalquil C_3-C_7 -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquil C_3-C_7 -alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_6 -carbonilo-, formilo, alcoxi C_1-C_4 -carbonilo-, alquil C_1-C_4 -carbonilo-, alquil C_1-C_{10} -tio-, haloalquil C_1-C_4 -tio-, alquil C_1-C_{10} -sulfonilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfonilo-, alquil C_1-C_{10} -sulfonilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfonilo-, amino, alquil C_1-C_{10} -amino-, di-alquil C_1-C_{10} -amino-, alquil C_1-C_{10} -carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C_1-C_4 o heteroaril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes;

R^9 es alquilo de C_1-C_{10} , alquenoilo de C_2-C_{10} , alquinilo de C_2-C_{10} o aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo está sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ;

R^{10} es alquilo de C_1-C_{10} , cicloalquilo de C_3-C_{10} , cicloalquil C_3-C_{10} -alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_{10} , alquenoilo de C_2-C_{10} , alquinilo de C_2-C_{10} , alcoxi C_1-C_4 -alquilo de C_1-C_{10} , alquil C_1-C_4 -tio-alquilo de C_1-C_4 , alcoxi de C_1-C_{10} , alquenoil C_2-C_{10} -oxi, alquil C_2-C_{10} -oxi, alquil C_1-C_{10} -tio-, *N*-alquil C_1-C_4 -amino-, *N,N*-di-(alquil C_1-C_4)-amino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C_1-C_4 o aril-alquilo de C_1-C_4 en el que el resto arilo

está sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C_1-C_4 - o heteroaril-alquilo de C_1-C_4 - en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R^{14} , que pueden ser iguales o diferentes;

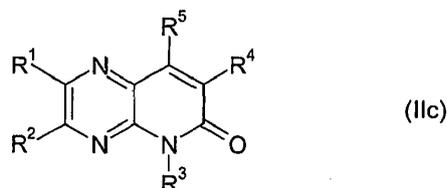
cada R^{11} es independientemente alquilo de C_1-C_{10} o fenilo o fenilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ;

R^{12} es alquilo de C_1-C_{10} o fenilo o fenilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ;

cada R^{13} es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ; y

cada R^{14} es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_4 , alcoxi de C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_4 -carbonilo-, haloalcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_{10} -tio-, haloalquil C_1-C_4 -tio-, alquil C_1-C_{10} -sulfinilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfinilo-, alquil C_1-C_{10} -sulfonilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfonilo-, arilo o arilo sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 , o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 , o sales o *N*-óxidos del mismo;

un compuesto de fórmula (IIc)



en la que

R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, alquilo de C_1-C_4 , haloalquilo de C_1-C_4 , halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_4 -tio-, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^6 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R^6 , que pueden ser iguales o diferentes;

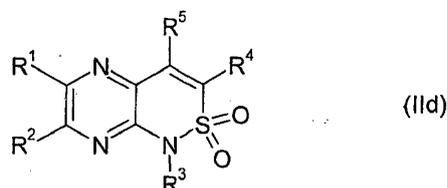
R^3 es haloalquilo de C_1-C_4 , haloalqueno de C_2-C_4 o haloalquino de C_2-C_4 ;

R^4 es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R^8 , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R^8 , que pueden ser iguales o diferentes;

R^5 es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar al grupo hidroxilo;

cada R^6 y R^8 es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_{10} , haloalquilo de C_1-C_4 , alqueno de C_2-C_{10} , alquino de C_2-C_{10} , hidroxilo, alcoxi de C_1-C_{10} , haloalcoxi de C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_{10} -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquilo de C_3-C_7 , cicloalcoxi de C_3-C_7 , cicloalquil C_3-C_7 -alquilo de C_1-C_4 , cicloalquil C_3-C_7 -alcoxi de C_1-C_4 , alquil C_1-C_6 -carbonilo-, formilo, alcoxi C_1-C_4 -carbonilo-, alquil C_1-C_4 -carboniloxi-, alquil C_1-C_{10} -tio-, haloalquil C_1-C_4 -tio-, alquil C_1-C_{10} -sulfinilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfinilo-, alquil C_1-C_{10} -sulfonilo-, haloalquil C_1-C_4 -sulfonilo-, amino, alquil C_1-C_{10} -amino-, di-alquil C_1-C_{10} -amino-, alquil C_1-C_{10} -carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C_1-C_4 - o aril-alquilo de C_1-C_4 - en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C_1-C_4 - o heteroaril-alquilo de C_1-C_4 - en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R^{13} , que pueden ser iguales o diferentes; y each R^{13} es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C_1-C_6 , haloalquilo de C_1-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 ; o una sal o *N*-óxido del mismo;

un compuesto de fórmula (II d)



en la que

R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₄-tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes;

5 R³ es hidrógeno, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, haloalqueno de C₂-C₄, alquino de C₂-C₁₀, haloalquino de C₂-C₄, cicloalquilo de C₃-C₁₀, cicloalquil C₃-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, cianoalquilo de C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀-carbonil-alquilo de C₁-C₆, *N*-alquil C₁-C₃-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, *N,N*-di-(alquil C₁-C₃)-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, aril-alquilo de C₁-C₆ o aril-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicli-alquilo de C₁-C₆ o heterocicli-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto heterocicli está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes;

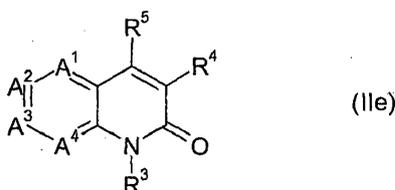
R⁴ es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R⁸, que pueden ser iguales o diferentes;

R⁵ es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar al grupo hidroxilo;

15 cada R⁶, R⁷ y R⁸ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, alquino de C₂-C₁₀, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₁₀, haloalcoxi de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₇, cicloalcoxi de C₃-C₇, cicloalquil C₃-C₇-alquilo de C₁-C₄, cicloalquil C₃-C₇-alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₆-carbonilo-, formilo, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfino-, haloalquil C₁-C₄-sulfino-, alquil C₁-C₁₀-sulfino-, haloalquil C₁-C₄-sulfono-, amino, alquil C₁-C₁₀-amino-, di-alquil C₁-C₁₀-amino-, alquil C₁-C₁₀-carbonil-amino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C₁-C₄ o aril-alquilo de C₁-C₄ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C₁-C₄ o heteroaril-alquilo de C₁-C₄ en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes; y

25 cada R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o una sal o *N*-óxido del mismo;

30 lle) un compuesto de fórmula (Ile)



en la que

35 A¹, A², A³ y A⁴ son independientemente C-R¹ o N, con la condición de que al menos uno de A¹, A², A³ y A⁴ sea N, y con la condición de que si A¹ y A⁴ son ambos N, A² y A³ no sean ambos C-R¹; cada R¹ es independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₄, alquil C₁-C₄-tio, arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cinco R⁶, que pueden ser iguales o diferentes;

40 R³ es hidrógeno, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, haloalqueno de C₂-C₄, alquino de C₂-C₁₀, haloalquino de C₂-C₄, cicloalquilo de C₃-C₁₀, cicloalquil C₃-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₆, cianoalquilo de C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀-carbonil-alquilo de C₁-C₆, *N*-alquil C₁-C₃-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, *N,N*-di-(alquil C₁-C₃)-aminocarbonil-alquilo de C₁-C₆, aril-alquilo de C₁-C₆ o aril-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes, o heterocicli-alquilo de C₁-C₆ o heterocicli-alquilo de C₁-C₆ en el que el resto heterocicli está sustituido con uno a tres R⁷, que pueden ser iguales o diferentes;

45 R⁴ es arilo o arilo sustituido con uno a cinco R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a cuatro R⁸, que pueden ser iguales o diferentes;

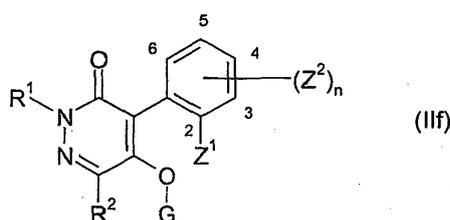
R⁵ es hidroxilo o un grupo que se puede metabolizar a un grupo hidroxilo;

cada R⁶, R⁷ y R⁸ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₁₀, haloalquilo de C₁-C₄, alqueno de C₂-C₁₀, alquino de C₂-C₁₀, hidroxilo, alcoxi de C₁-C₁₀, haloalcoxi de C₁-C₄, alcoxi C₁-C₁₀-alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de

5 C₃-C₇, cicloalcoxi de C₃-C₇, cicloalquil C₃-C₇-alquilo de C₁-C₄-, cicloalquil C₃-C₇-alcoxi de C₁-C₄-, alquil C₁-C₆-carbonilo-, formilo, alcoxi C₁-C₄-carbonilo-, alquil C₁-C₄-carboniloxi-, alquil C₁-C₁₀-tio-, haloalquil C₁-C₄-tio-, alquil C₁-C₁₀-sulfino-, haloalquil C₁-C₄-sulfino-, alquil C₁-C₁₀-sulfonilo-, haloalquil C₁-C₄-sulfonilo-, amino, alquil C₁-C₁₀-amino-, di-alquil C₁-C₁₀-amino-, alquil C₁-C₁₀-carbonilamino-, arilo o arilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroarilo o heteroarilo sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, aril-alquilo de C₁-C₄- o aril-alquilo de C₁-C₄- en el que el resto arilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroaril-alquilo de C₁-C₄- o heteroaril-alquilo de C₁-C₄- en el que el resto heteroarilo está sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariloxi- o ariloxi- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, heteroariloxi- o heteroariloxi- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, ariltio- o ariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes, o heteroariltio- o heteroariltio- sustituido con uno a tres R¹³, que pueden ser iguales o diferentes; y

10 cada R¹³ es independientemente halo, ciano, nitro, alquilo de C₁-C₆, haloalquilo de C₁-C₆ o alcoxi de C₁-C₆; o una sal o N-óxido del mismo; y

un compuesto de fórmula (If)



15 en la que

R¹ es alquilo de C₁-C₆ o alquil C₁-C₆-oxi-alquilo de C₁-C₆;

R² es hidrógeno o alquilo de C₁-C₆;

G es a hidrógeno, -(C=L)R³, -(SO₂)R⁴, o -(P=L)R⁵R⁶, en los que

20 L es oxígeno o azufre;

R³ es alquilo de C₁-C₆, cicloalquilo de C₃-C₈, alqueno de C₂-C₆, alquino de C₂-C₆, arilo de C₆-C₁₀, aril C₆-C₁₀-alquilo de C₁-C₆-, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₈-oxi, alqueno C₂-C₆-oxi, alquino C₂-C₆-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril C₆-C₁₀-alquil C₁-C₆-oxi-, amino, alquil C₁-C₆-amino, alqueno C₂-C₆-amino, aril C₆-C₁₀-amino, di(alquil C₁-C₆)amino, di(alqueno C₂-C₆)amino, (alquil C₁-C₆)(aril C₆-C₁₀)amino o un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno de tres a ocho miembros,

25 R⁴ es alquilo de C₁-C₆, arilo de C₆-C₁₀, un grupo alquil C₁-C₆-amino o di(alquil C₁-C₆)amino; y R⁵ y R⁶ pueden ser iguales o diferentes y son independientemente alquilo de C₁-C₆, cicloalquilo de C₃-C₈, alqueno de C₂-C₆, arilo de C₆-C₁₀, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₈-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril C₆-C₁₀-alquil C₁-C₆-oxi, alquil C₁-C₆-tio, alquil C₁-C₆-amino o di(alquil C₁-C₆)amino, con lo que cualquier grupo R³, R⁴, R⁵ y R⁶ puede estar sustituido con halógeno, cicloalquilo de C₃-C₈, arilo de C₆-C₁₀, aril C₆-C₁₀-alquilo de C₁-C₆-, cicloalquil C₃-C₈-oxi, aril C₆-C₁₀-oxi, aril C₆-C₁₀-alquil C₁-C₆-oxi-, aril C₆-C₁₀-amino, (alquil C₁-C₆)(aril C₆-C₁₀)amino y un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno de tres a ocho miembros que puede estar sustituido con al menos un alquilo de C₁-C₆;

Z¹ es alquilo de C₁-C₆;

Z² es alquilo de C₁-C₆;

n es 0, 1, 2, 3 ó 4;

35 y cada uno de Z² puede ser igual o diferente cuando n representa un número entero de 2 o más, y la suma del número de átomos de carbono en el grupo representado por Z¹ y aquella en el grupo representado por Z² es igual a 2 o más,

40 y/o un herbicida inhibidor de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), en el que las plantas de cultivo comprenden al menos un polinucleótido heterólogo que comprende una región que codifica una HST y que proporciona sobreexpresión de dicha HST en dichas plantas de cultivo.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que las plantas de cultivo contienen un polinucleótido heterólogo adicional que comprende una región que codifica una hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD).

3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición plaguicida comprende un herbicida inhibidor de de homogentisato solanesil transferasa y un herbicida inhibidor de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD).

45

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el herbicida inhibidor de de hidroxifenil piruvato dioxigenasa se selecciona del grupo que consiste en mesotriona, sulcotriona, isoxaflutol, tembotriona, topamezona, benzofenap, pirazolato, pirazoxifeno, pirasulfotol, ketospiradox o el ácido libre del mismo,
- 5 4-hidroxi-3-[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona, [2-cloro-3-(2-metoxietoxi)-4-(metilsulfonyl)fenil](1-etil-5-hidroxi-1H-pirazol-4-il)-metanona, α -(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonyl)- β -oxo-4-(trifluorometil)-bencenopropanonitrilo, y (2,3-dihidro-3,3,4-trimetil-1,1-dioxidobenzo[b]tien-5-il)(5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)-metanona.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima homogentisato solanesiltransferasa deriva de *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa* o *Chlamydomonas reinhardtii*.
- 10 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima homogentisato solanesiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en
- (a) las enzimas HST representadas como SEC ID NO. 1 a 10; y
- (b) una HST que comprende uno o más de los siguientes motivos polipeptídicos:
- W-(R/K)-F-L-R-P-H-T-I-R-G-T; y/o
- 15 N-G-(Y/F)-I-V-G-I-N-Q-I-(Y/F)-D; y/o
- I-A-I-T-K-D-L-P; y/o
- Y-(R/Q)-(F/W)-(I/V)-W-N-L-F-Y.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la planta de cultivo comprende un polinucleótido recombinante adicional que codifica una enzima de tolerancia a herbicidas adicional.
- 20 8. Un método según la reivindicación 7, en el que la enzima de tolerancia a herbicidas adicional se selecciona del grupo que consiste en 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), glifosato acetil transferasa (GAT), citocromo P450, fosfinotricin acetiltransferasa (PAT), acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPGO), fiteno desaturasa (PD), enzimas que degradan dicamba y enzimas que degradan herbicidas a base de ariloxi.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición plaguicida comprende uno o más herbicidas adicionales.
- 25 10. Un método según la reivindicación 9, en el que el uno o más herbicidas adicionales se selecciona del grupo que consiste en glifosato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); glufosinato (incluyendo sus sales agroquímicamente aceptables); cloroacetanilidas, por ejemplo alaclor, acetoclor, metolacolor, S-metolacolor; inhibidores del fotosistema II, por ejemplo triazinas tales como ametrina, atrazina, cianazina y terbutilazina, triazinonas tales como hexazinona y metribuzina, y ureas tales como clorotolurón, diurón, isoproturón, linurón y terbutiurón; inhibidores de ALS, por ejemplo sulfonilureas tales como amidosulfurón, clorsulfurón, flupirsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, triasulfurón, trifloxisulfurón y tritosulfurón; éteres difenílicos, por ejemplo acioflurofeno y fomesafeno.
- 30 11. Un método según la reivindicación 10, en el que el uno o más herbicidas adicionales es glifosato y/o un herbicida inhibidor de de PS-II.
- 35 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la aplicación al locus de un insecticida y/o un fungicida.
13. Un método para proporcionar una planta transgénica que es tolerante a herbicidas inhibidores de homogentisato solanesil transferasa (HST) y/o hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), que comprende la transformación de material vegetal con un polinucleótido recombinante que comprende una región que codifica una HST y, opcionalmente, una región que codifica una HPPD, la selección del material vegetal transformado usando un inhibidor de HST seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe) y (IIf) como se define en la reivindicación 1 y/o un inhibidor de HPPD, y la regeneración de ese material en una planta fértil morfológicamente normal.
- 40 14. Un método según la reivindicación 13, en el que el polinucleótido recombinante comprende además una región que codifica la diana para un herbicida no inhibidor de homogentisato solanesil transferasa, y/o una región que codifica una proteína capaz de conferir al material vegetal transformado con la región resistencia a insectos, hongos y/o nematodos.
- 45