

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 471**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2001 E 10178572 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2287292**

54 Título: **Hidroxi fenil piruvato dioxigenasas (HPPD) derivadas de plantas y resistentes frente a herbicidas tricetónicos, y plantas transgénicas que contienen estas dioxigenasas**

30 Prioridad:

07.12.2000 GB 0029899

17.07.2001 GB 0117393

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

22.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAWKES, TIMOTHY ROBERT;
WARNER, SIMON y
ANDREWS, CHRISTOPHER JOHN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

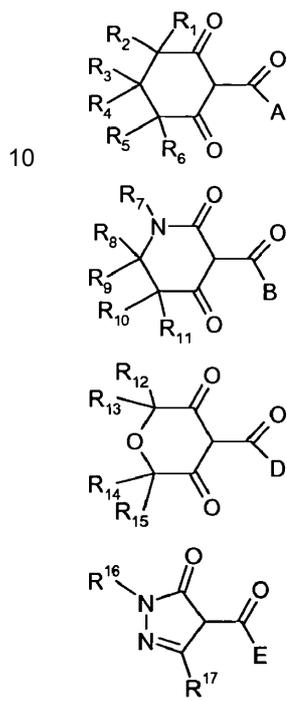
ES 2 538 471 T3

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

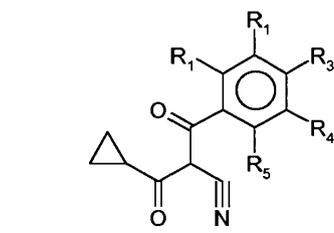
Hidroxi fenil piruvato dioxigenasas (HPPD) derivadas de plantas y resistentes frente a herbicidas tricetónicos, y plantas transgénicas que contienen estas dioxigenasas

- 5 La presente invención se refiere a un método para seleccionar un polinucleótido que codifica una enzima de HPPD resistente a herbicidas tricetónicos que comprende cribar una población de secuencias que codifican una enzima de HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a tricetonas aquellas secuencias que codifican una enzima que, en comparación con una enzima de HPPD de control tiene al menos una resistencia incrementada 2,5 o, preferiblemente, cuatro veces a herbicidas tricetónicos seleccionados entre herbicidas que tienen una de las siguientes fórmulas



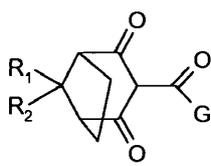
- 15 y sus sales agroquímicamente aceptables, donde los grupos Ar A, B, D y E se escogen independientemente entre fenilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido, donde los sustituyentes opcionales para los grupos A, B, D y E incluyen alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄, donde R₁ o R₂, o ambos, son H y tanto R₃ como R₄ son H y R₅ o R₆, o ambos, son H, donde tanto R₈ como R₉ son H y R₁₀ o R₁₁, o ambos, son H, donde R₁₂ o R₁₃, o ambos, son H y R₁₄ o R₁₅, o ambos, son H y donde R₁-R₁₇ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H y en las que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄;

- 25 en comparación con herbicidas seleccionados del grupo de herbicidas que tiene la fórmula



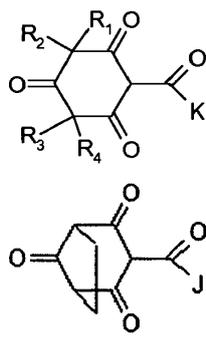
- 30 y sus sales agronómicamente aceptables, donde R₁-R₆ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄,

o es al menos 2,5 o preferiblemente 4 veces más resistente a herbicidas tricetónicos seleccionados del grupo de herbicidas que tiene la fórmula



5 y sus sales agronómicamente aceptables, donde el grupo G se escoge entre fenilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente y donde R₁-R₂ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄,

en comparación con herbicidas que tienen una de las siguientes fórmulas



10 y sus sales agronómicamente aceptables, donde los grupos Ar K y J se escogen independientemente entre fenilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente, donde los sustituyentes opcionales para los grupos K y J incluyen alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄, donde R₁-R₄ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄;

20 donde dicha enzima de HPPD de control se obtiene a partir de una dicotiledónea, particularmente de *Arabidopsis* o del tabaco;

donde la resistencia de las enzimas de HPPD a herbicidas se determina midiendo la velocidad de disociación del complejo enzima/herbicida, y;

donde la enzima de HPPD codificada por el polinucleótido seleccionado tiene un valor de k_{cat}/K_m de hidroxifenilpiruvato en el intervalo de 0,1 a 5 s⁻¹μM⁻¹ a pH 7,0 y 25 °C.

25 La presente solicitud también describe tecnología de ADN recombinante y, en particular, la producción de (i) plantas transgénicas que exhiben una resistencia sustancial o una tolerancia sustancial a herbicidas cuando se comparan con plantas similares no transgénicas; y (ii) plantas transgénicas que contienen niveles relativamente elevados de antioxidantes liposolubles, también cuando se comparan con tales plantas no transgénicas. También se describen las secuencias de nucleótidos (y la expresión de sus productos) cuando se utilizan en la producción de las plantas transgénicas mencionadas o cuando son producidas por estas.

35 Las plantas que son sustancialmente "tolerantes" a un herbicida cuando se someten al mismo proporcionan una curva de dosis/respuesta que está desplazada a la derecha cuando se compara con la 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 hay, 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.

40 Dentro del contexto de la presente invención, las expresiones 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-OHPP) son sinónimos.

Se conocen métodos para proporcionar plantas que son tolerantes a herbicidas HPPD, que comprenden la transformación del material vegetal con polinucleótidos que comprenden regiones que codifican enzimas de HPPD.

Sin embargo, lo que hasta ahora no se ha reconocido generalmente es que diferentes enzimas de HPPD proporcionan diferentes niveles de tolerancia a diferentes herbicidas inhibidores de HPPD. Aunque una enzima de HPPD dada puede proporcionar un nivel útil de tolerancia a algunos herbicidas inhibidores de HPPD, puede ser bastante inadecuada para proporcionar niveles comerciales de tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD diferente más deseable, que, por ejemplo, puede controlar un espectro diferente de malas hierbas, puede ser más barato de obtener, o puede ofrecer beneficios medioambientales. La actual invención proporciona un medio para seleccionar enzimas de HPPD adecuadas para proporcionar niveles comercialmente útiles de resistencia a químicas de herbicidas inhibidores de HPPD particulares.

A fin de proporcionar plantas con tolerancia a tasas de aplicación comercialmente útiles de un herbicida de HPPD deseado, sería una ventaja usar polinucleótidos que codifican enzimas de HPPD que tienen susceptibilidad reducida a la inhibición por el herbicida de HPPD deseado o clase de herbicidas de HPPD. Esta característica de susceptibilidad reducida a la inhibición mediante herbicidas de HPPD *in vitro* se expresa también aquí como "resistencia incrementada" o "tolerancia inherente".

Se reivindica que algunas formas mutantes de una HPPD de *Pseudomonas* sp. muestran tal resistencia incrementada en base a mostrar una tasa aparentemente disminuida de unión del inhibidor a la enzima (es decir, en base a medidas que corresponden esencialmente a k_{on} en el equilibrio $E + I \leftrightarrow EI$, véase *más arriba*). Sin embargo, tales formas enzimáticas mutantes tienen actividad catalítica reducida y/o estabilidad reducida, lo que potencialmente las hacen inadecuadas para uso, especialmente en los cultivos de climas templados, particularmente maíz y haba de soja, para los cuales los herbicidas inhibidores de HPPD proporcionan generalmente el espectro más útil de control de malas hierbas. No se ha conocido hasta ahora que diversas enzimas de HPPD de tipo salvaje sin mutar procedentes de diferentes fuentes pueden mostrar igualmente niveles inherentes útiles y diferentes de tolerancia, y que, además, las enzimas de tipo salvaje sin mutar son preferibles para uso en plantas transgénicas debido a que, en general, muestran una estabilidad y actividad (k_{cat}/K_m) considerablemente mejores que los derivados mutantes.

Hasta ahora no se ha apreciado además que el nivel de tolerancia inherente de estas enzimas de HPPD de tipo salvaje, o con mayor razón de enzimas de HPPD mutadas, puede variar notablemente según la clase particular y estructura de inhibidor de HPPD. Tampoco se ha conocido que estas diferencias en la tolerancia tienen su base no en diferencias en el parámetro k_{on} , presentado por métodos de ensayo previamente usados, sino más bien en los parámetros K_d y k_{off} . Tampoco se ha apreciado que estas diferencias en la tolerancia inherente pueden ser notables y útiles incluso entre enzimas de HPPD que tienen secuencias de aminoácidos relativamente similares como, por ejemplo, entre enzimas de HPPD de secuencias similares derivadas de diferentes especies de plantas. A fin de mantener el intervalo más amplio de opciones para modos de actuación de herbicidas útiles para el control de cultivos espontáneos, y para minimizar cualquier impacto potencial de flujo génico a malas hierbas, es deseable que la tolerancia a herbicidas conferida a plantas transgénicas se exprese preferentemente sólo frente a ciertas subclases deseadas de herbicidas inhibidores de HPPD. Esto es otro beneficio de ser capaces de escoger una enzima de HPPD particular muy adecuada para suministrar resistencia a un conjunto particular de tipos de herbicidas de HPPD. Cuando la palabra "específica" se usa conjuntamente con la resistencia de una proteína particular a un herbicida particular – o clase de herbicida –, el término no excluye obviamente cierto grado de sensibilidad – especialmente en el caso de que se apliquen niveles elevados (tasas de aplicación no comerciales) de herbicidas.

Por "herbicida tricetónico" se quiere decir un derivado de una ciclohexano-1,3-diona o un biciclo[3,2,1]octano-2,4-diona.

Por "ácido sincárpico" se quiere decir un derivado de una 4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona.

De acuerdo con la presente solicitud se describe una enzima de HPPD resistente a inhibidores tricetónicos específicos que comprende una secuencia de aminoácidos QIKECQ y una secuencia F, (D/E), F, (M/L), W1, (P/A), P, W2, X, X, Y, Y, donde W1 es A o P y donde (i) si W1 es A entonces W2 es P, A, Q o L o (ii) si W1 es P entonces W2 es P, A, Q o T, donde X es cualquier aminoácido.

También se describe una enzima de HPPD resistente a inhibidores tricetónicos específicos que comprende una secuencia de aminoácidos PPTPT y una secuencia F, (D/E), F, (M/L), W1, (P/A), P, W2, X, X, Y, Y, donde W1 es A o P y donde (i) si W1 es A entonces W2 es P, A, Q o L o, si (ii) W1 es P entonces W2 es P, A, Q o T y X es cualquier aminoácido.

Preferiblemente, la enzima comprende además al menos una de las siguientes secuencias:

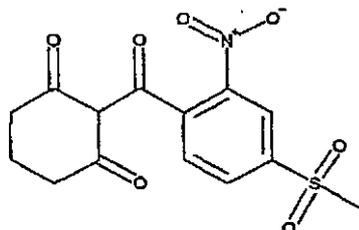
- (i) (L/V), A, S, X, D, V, L
- (ii) (R/Q), A, R, (S/T), (P/A), M, G, G
- (iii) (K/D/E/N), Y, Y, (D/E), G, V, R, R
- (iv) Q, E, L, G, V, L
- (v) (H/Y), (H/N), G, G, (P/S), G, V
- (vi) E, K, D, E, (R/V/K/Q), G, (Q/R/E), E

donde X es cualquier aminoácido.

La enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD puede ser capaz de formar un complejo con un inhibidor de HPPD de Estructura I en el que la constante de disociación (Kd) de dicho complejo, en agua a pH 7,0 y a 25°C, está en el intervalo de 1,0 a 30 nM, y/o la constante de velocidad de disociación del complejo, en agua a pH 7,0 y a 25°C, está en el intervalo de 4×10^{-5} a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

5

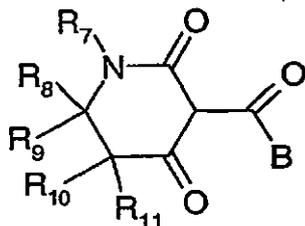
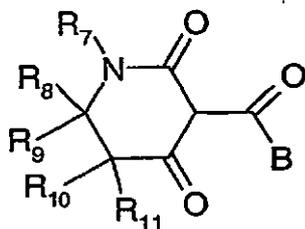
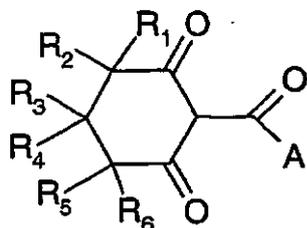
ESTRUCTURA I. 2-(Nitro-4-metanosulfonilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona



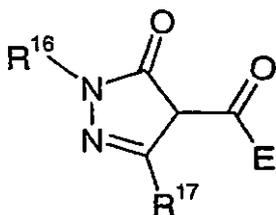
El valor de k_{cat}/K_m de hidroxifenilpiruvato de la enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD puede estar en el intervalo de $0,8$ a $5,0 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ a pH 7,0 y 25°C.

- 10 También se describe una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD, excluyendo aquellas derivadas de maíz, trigo y cebada, caracterizada en que, en comparación con una enzima de HPPD derivada de *Arabidopsis*, la enzima resistente muestra al menos una resistencia incrementada de 2,5 veces y preferiblemente de cuatro veces a herbicidas seleccionados de aquellos de la Fórmula 1 y/o Fórmula 2 en comparación con herbicidas seleccionados de la Fórmula 3 y/o Fórmula 4 como se representan más abajo. Obsérvese que independientemente de qué
- 15 estructuras se dibujen en una forma ceto, estas estructuras también pueden existir en una forma enólica, y que todas estas formas y todas las otras formas tautómeras también están incluidas en las fórmulas.

Fórmula 1



20



en las que los grupos Ar A, B, D y E se escogen independientemente de fenilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. R₁ o R₂, o ambos, son H, o tanto R₃ como R₄ son H, y R₅ o R₆, o ambos, son H. R₈ y R₉ son ambos H, y R₁₀ o R₁₁, o ambos, son H. R₁₂ o R₁₃, o ambos, son H, y R₁₄ o R₁₅, o ambos, son H. Aparte de estas restricciones, R₁-R₁₇ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄.

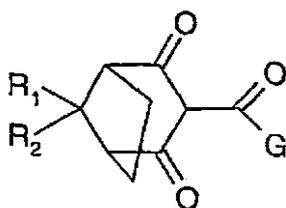
Sustituyentes opcionales para los grupos A, B, D y E incluyen alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄.

Preferiblemente, Ar es un fenilo sustituido y R₁₋₃, R₅ y R₆ son cada uno H y R₄ no es H. Como alternativa, Ar puede ser fenilo sustituido y R₁-R₆ son todos H. El fenilo mencionado puede tener H en todas las posiciones menos la 2 y 4, que estarán entonces sustituidas preferiblemente con NO₂ o Cl en la posición 2 y con SO₂Me o Cl en la posición 4.

En otra alternativa, Ar es 3-piridilo sustituido. Opcionalmente, el N-piridilo puede ser un N-óxido. El piridilo mencionado puede tener H en todas las posiciones menos la 2 y 6, que estarán entonces sustituidas preferiblemente con R' en la posición 2 y con CF₂H, CF₂Cl o CF₃ en la posición 6 y donde R' es Me, isopropilo, *n*-propilo, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂CH₂OMe o CF₃.

Los inhibidores de HPPD herbicidas de Fórmula 1 incluyen sus sales agronómicamente aceptables. En particular, (i) se pueden seleccionar polinucleótidos para codificar enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD y (ii) se pueden producir plantas que son sustancialmente tolerantes a ejemplos representativos de herbicidas de Fórmula 1 tales como 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoi)ciclohexano-1,3-diona y/o 2-(2-cloro-4-metanosulfonilbenzoi)ciclohexano-1,3-diona y/o 2-(nitro-4-metanosulfonilbenzoi)ciclohexano-1,3-diona, conociéndose el segundo y el tercero, respectivamente, como sulcotriona y mesotriona.

Fórmula 2



en la que el grupo G se escoge de fenilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. R₁-R₂ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄.

Preferiblemente tanto R₁ como R₂ son H.

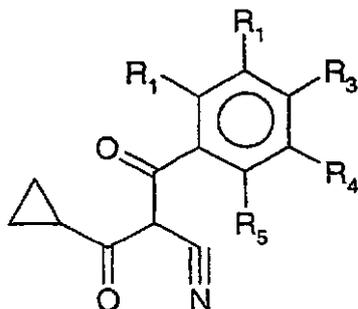
Los sustituyentes opcionales para el grupo G incluyen alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄ o alcóxalcoxi C₁-C₄.

Los inhibidores de HPPD herbicidas de Fórmula 2 incluyen sus sales agronómicamente aceptables. Preferiblemente, Ar es 3-piridilo sustituido y R₁ y R₂ son ambos H. Opcionalmente, el N-piridilo puede ser un N-óxido. El piridilo mencionado puede tener H en todas las posiciones menos la 2 y 6, que estarán entonces sustituidas preferiblemente con R' en la posición 2 y con CF₂H, CF₂Cl o CF₃ en la posición 6 y donde R' es Me, isopropilo, *n*-

propilo, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂CH₂OMe o CF₃. En particular, (i) se pueden seleccionar polinucleótidos para codificar enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD y (ii) se pueden producir plantas que son sustancialmente tolerantes a ejemplos representativos de herbicidas de Fórmula 2 tales como:

- 5 3-[[2-metil-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]octano-2,4-diona y/o
 3-[[2-(etoximetil)-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]octano-2,4-diona y/o
 3-[[2-(metoxietoximetil)-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]octano-2,4-diona

Fórmula 3



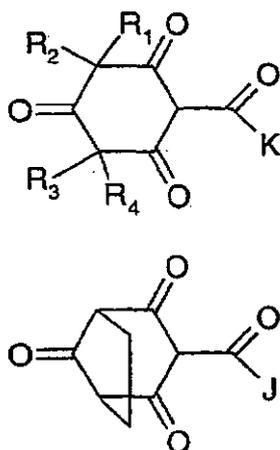
- 10 R₁-R₆ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄.

- 15 Los inhibidores de HPPD herbicidas de Fórmula 3 incluyen sus sales agrónómicamente aceptables. Preferiblemente, R₁ es SO₂Me, R₃ es CF₃ o Cl y R₂, R₄ y R₅ son cada uno H; en el caso de que R₃ sea CF₃, el compuesto es el derivado de dicetonitrilo activo del herbicida isoxaflutol. En particular, (i) se pueden seleccionar polinucleótidos para codificar enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD y (ii) se pueden producir plantas que son sustancialmente tolerantes a ejemplos representativos de herbicidas de Fórmula 3 (o compuestos que dan lugar a estos) tales como

- 20 5-ciclopropil-4-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilbenzoil)isoxazol y/o
 1-[2-(metanosulfonyl)-4-(trifluorometil)fenil]-3-ciclopropil-2-cianopropano-1,3-diona

siendo el primero de estos compuestos el herbicida isoxaflutol, el segundo su derivado activo.

Fórmula 4



- 25 en las que los grupos Ar K y J se seleccionan independientemente de fenilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. R₁-R₄ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄. Los sustituyentes opcionales para los
- 30 grupos K y J incluyen alquilo de C₁-C₄, cicloalquilo de C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR, y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi de C₁-C₄.

Los inhibidores de HPPD herbicidas de Fórmula 4 incluyen sus sales agronómicamente aceptables. Preferiblemente, Ar es fenilo sustituido y R₁₋₄ son cada uno metilo. El fenilo mencionado puede tener H en todas las posiciones que no sean la 2 y 4, que entonces estarán sustituidas preferentemente con NO₂, Me, OMe o Cl en la posición 2 y con SO₂Me, CN, OR o Cl en la posición 4 en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄. En una alternativa adicional, Ar es 2-piridilo sustituido y R₁ y R₂ son ambos H. El piridilo mencionado puede tener H en todas las posiciones que no sean la 3 y 5, que entonces estarán sustituidas preferiblemente con R' en la posición 3 y con CF₂H, CF₂Cl o CF₃ en la posición 6 y donde R' es Me, isopropilo, *n*-propilo, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂CH₂OMe o CF₃.

También se describe una enzima HPPD resistente a inhibidores de HPPD que se puede obtener de plantas *Avena*, *Lolium*, *Chenchrus*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiara* o *Sorghum*.

Se describe además una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 o una secuencia que tiene, basándose en el método Clustal de alineación y cuando se compara a lo largo de cualquier fragmento concreto de 150 aminoácidos de la alineación, al menos un 93% de identidad con la secuencia de las SEC ID Nos 8, 10, 12, 14, 16 o 18 o la enzima de la SEC ID No 4 o una secuencia que tiene, basándose en el método Clustal de alineación y cuando se compara a lo largo de cualquier fragmento concreto de 150 aminoácidos de la alineación, al menos un 91% de identidad con la secuencia de la SEC ID No 4.

El experto es sobradamente consciente de a qué hace referencia el método clustal de alineación y se hace referencia a este en WO00/32757.

También se describen plantas resistentes a herbicidas las cuales contienen un polinucleótido heterólogo que comprende una región que codifica una enzima de HPPD resistente a tricetonas.

La presente invención proporciona un método para seleccionar un polinucleótido que codifica una enzima inhibidora de HPPD resistente a inhibidores tricetónicos específicos que comprende cribar una población de secuencias que codifican la enzima HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD aquellas secuencias que codifican una enzima que, en comparación con una enzima de HPPD de control es al menos 2,5 veces o, preferiblemente, cuatro veces más resistente a herbicidas seleccionados de la Fórmula 1 en comparación con herbicidas seleccionados de la Fórmula 3 o es al menos 2,5 veces o, preferiblemente, cuatro veces más resistente a herbicidas seleccionados de la Fórmula 2 en comparación con la Fórmula 4, donde dicha enzima de control se selecciona de modo que muestre sustancialmente la misma selección de polinucleótidos que se obtiene cuando la enzima de control se obtiene a partir de *Arabidopsis*.

La presente solicitud describe además de manera adicional un método para seleccionar un polinucleótido que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD específica del ácido sincárpico que comprende cribar una población de secuencias que codifican enzimas de HPPD y seleccionar como secuencias que codifican enzimas de HPPD resistentes aquellas secuencias que codifican una enzima que en comparación con una enzima de HPPD de control es al menos 2,5 o, preferiblemente, cuatro veces más resistente a inhibidores de HPPD seleccionados entre la Fórmula 1 y 4, en comparación con la Fórmula 1 y donde la enzima de control mencionada se selecciona de modo que muestra sustancialmente la misma selección de polinucleótidos que se obtiene cuando la enzima de control se obtiene a partir de *Arabidopsis*. La HPPD de control se obtiene a partir de una dicotiledónea – particularmente *Arabidopsis* o tabaco, y la resistencia de las enzimas de HPPD a herbicidas se determina midiendo la velocidad de disociación del complejo enzima/herbicida.

La enzima de HPPD codificada por el polinucleótido seleccionado tiene un valor de kcat/Km de hidroxifenilpiruvato en el intervalo de 0,10 a 5 s⁻¹ μM⁻¹ a pH 7,0, 25 °C.

También se describe un método para seleccionar polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que comprende cribar polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima HPPD y seleccionar como polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD aquellos que codifican una enzima capaz de formar un complejo con inhibidores de HPPD herbicidas tricetónicos seleccionados de la Fórmula 1 y/o de la Fórmula 2 donde la disociación de dicho complejo está gobernada por una constante de disociación (Kd), en agua a pH 7,0 y 25 °C, comprendida en el intervalo de 1,0 a 30 nM, y donde la disociación del complejo mencionado tiene una constante de la velocidad de disociación (k_{off}), en agua a pH 7,0 y a 25 °C, comprendida en el intervalo de 4 x 10⁻⁵ a 2 x 10⁻³ s⁻¹ y donde dichos inhibidores de HPPD herbicidas seleccionados tienen al menos un cuarto de la actividad herbicida de la mesotriona contra plantas dicotiledóneas.

También se describe un método para proporcionar una planta que es tolerante a herbicidas que inhiben HPPD que comprende la transformación de material vegetal con un polinucleótido que comprende una región que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores tal como se ha descrito previamente, o que se puede seleccionar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, y la regeneración de ese material en una planta fértil morfológicamente normal, siempre que la secuencia de HPPD no se obtenga a partir de *Shewanella colwelliana* o *Pseudomonas fluorescens*.

El polinucleótido puede comprender además una región que codifica una proteína capaz de dirigir la HPPD

codificada por la secuencia a orgánulos subcelulares tales como el cloroplasto o mitocondria, y la mencionada proteína dirigida puede tener la secuencia de (i) un péptido de tránsito de cloroplasto o (ii) un péptido de tránsito de cloroplasto-porción N-terminal de una proteína de cloroplasto-péptido de tránsito de cloroplasto.

5 El mencionado polinucleótido puede comprender además una secuencia que codifica una enzima que degrada o que detoxifica de otro modo un herbicida que inhibe HPPD, y/o una proteína capaz de otro modo de unirse específicamente al mencionado herbicida inhibidor de HPPD.

10 El polinucleótido puede comprender además una región que codifica (i) la diana para un herbicida no inhibidor de HPPD y/o (ii) una enzima que degrada o que detoxifica de otro modo un herbicida no inhibidor de HPPD y/o una región que codifica una proteína capaz de conferir, en material vegetal transformado con la región, resistencia a insectos, hongos y/o nematodos.

La dicha diana o enzima se puede seleccionar del grupo que consiste en citocromo p450, una glutatona S transferasa, glifosato oxidasa (GOX), fosfinotricina acetil transferasa (PAT), 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPGO) y fiteno desaturasa (PD), o sus formas mutagenizadas o de otro modo modificadas.

15 También se describe una planta completa fértil morfológicamente normal obtenida mediante cualquiera de los métodos que se describen anteriormente.

También se describe el uso del polinucleótido que se puede seleccionar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la producción de tejidos vegetales y/o plantas completas fértiles morfológicamente normales que son transgénicas para la enzima de HPPD resistente al inhibidor.

20 También se describe un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus que comprende plantas de cultivo y malas hierbas, en el que las plantas se obtienen mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, en el que el método comprende aplicar al locus de una mala hierba una cantidad de control de un inhibidor de HPPD. El inhibidor de HPPD se puede seleccionar del grupo que consiste en herbicidas que tienen las Fórmulas 1 a 4 como se indican anteriormente. También se puede aplicar al locus un plaguicida seleccionado del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida y un herbicida no inhibidor de HPPD.

La presente solicitud describe además el uso del polinucleótido que se puede seleccionar de acuerdo con cualquier método descrito anteriormente en la producción de una diana herbicida para el cribado *in vivo* de alto rendimiento de herbicidas potenciales. En particular, las regiones del polinucleótido que codifican la proteína se pueden expresar heterológicamente en *E. coli* o levaduras.

30 En un aspecto, se describen métodos para la selección de polinucleótidos que comprenden una región que codifica enzimas de HPPD que muestran un nivel de tolerancia inherente a ciertos herbicidas que es útil para la aplicación en plantas tolerantes a herbicidas. Además de mostrar un nivel elevado de tolerancia inherente a un inhibidor de HPPD seleccionado (valores k_{off} , K_i o K_d) una enzima de HPPD codificada por un polinucleótido también puede, preferiblemente, poseer una estabilidad elevada y actividad catalítica elevada cuando la actividad catalítica se expresa mediante el parámetro k_{cat}/K_m .

40 Los métodos para medir la K_m respecto al hidroxifenilpiruvato de enzimas de HPPD son muy conocidos. Sin embargo, hasta el momento, la inestabilidad relativa de HPPD ha impedido mediciones de valores de k_{cat} reales, con una disminución relativamente nula. Por lo tanto, en un aspecto adicional, se describen métodos para la selección de polinucleótidos que comprenden una región que codifica enzimas de HPPD que muestran valores de k_{cat}/K_m comprendidos en un intervalo útil y determinado.

45 Se apreciará que se dispone de muchos métodos muy conocidos por los expertos para obtener polinucleótidos candidatos adecuados para el cribado y la selección que comprenden una región que codifica una HPPD procedente de diversos organismos fuente potenciales que incluyen microbios, plantas, hongos, algas, cultivos mixtos, etc. así como también fuentes medioambientales de ADN tales como el suelo. Estos métodos incluyen, entre otros, la preparación de ADNc o colecciones de ADN genómico, el uso de cebadores oligonucleotídicos degenerados de manera adecuada, el uso de sondas basadas en secuencias conocidas o ensayos de complementación (por ejemplo, para el cultivo con tirosina) así como también el uso de mutagénesis y reordenamiento con el fin de proporcionar secuencias que codifican HPPD recombinadas o reordenadas.

50 En ciertos aspectos de la selección, los polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican HPPD de control y candidatos se expresan en levaduras, en una cepa hospedante bacteriana, en un alga o en una planta superior tal como el tabaco o *Arabidopsis* y los niveles relativos de tolerancia inherente de las secuencias que codifican HPPD se criban de acuerdo con un fenotipo indicador visible de la planta o la cepa transformadas en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores de HPPD seleccionados. Las dosis respuesta y los desplazamientos relativos en las dosis respuesta asociados con estos fenotipos indicadores (formación de color marrón, inhibición del crecimiento, efecto herbicida, etc.) se expresan convenientemente en función de, por ejemplo, los valores de GR50 (concentración para una reducción del crecimiento de un 50%) o MIC (concentración inhibidora mínima) donde incrementos en los valores corresponden a incrementos en la tolerancia inherente de la HPPD expresada.

Se apreciará que muchas combinaciones de organismo hospedante, fenotipo indicador y HPPD de control lograrían un alcance de selección similar. Por ejemplo, en un sistema de ensayo relativamente rápido basado en la transformación de una bacteria tal como *E. coli*, cada secuencia que codifica HPPD se puede expresar, por ejemplo, como una secuencia de ADN donde la expresión está controlada por un promotor controlable, tal como el promotor lacZ y teniendo en cuenta de manera adecuada, por ejemplo, mediante el uso de ADN sintético, problemas tales como el uso del codón con el fin de obtener un nivel de expresión de diferentes secuencias de HPPD tan comparable como sea posible. Tales cepas que expresan polinucleótidos que comprenden secuencias de HPPD candidatas alternativas se pueden sembrar con diferentes concentraciones de los herbicidas seleccionados en, opcionalmente, un medio suplementado con tirosina y estimar los niveles relativos de tolerancia inherente de las enzimas de HPPD expresadas en función del grado y la MIC de la inhibición de la formación del pigmento marrón, ocrónico.

En variaciones del método las células se pueden permeabilizar o, particularmente en el caso de levaduras, ser células que tienen bombas deficientes para minimizar los efectos de la captación y expulsión diferenciales de los inhibidores de HPPD dentro y fuera de la célula. En una variación preferida del método se cultivan las células bacterianas casi hasta la fase estacionaria en un medio líquido, se exponen a los herbicidas seleccionados durante un periodo corto de una hora o menos, se resuspenden en un volumen similar de medio nuevo y se monitoriza la velocidad de desarrollo del pigmento. En un método más preferido, se transfieren secuencias que expresan HPPD candidatas a un vector que se puede propagar en dos especies hospedantes diferentes y, similar a lo anterior, se expresan cada una con un nivel comparable, pero esta vez en una especie de *Pseudomonas* adecuada tal como *Pseudomonas fluorescens* 87-89 capaz de ser transformada y de crecer teniendo tirosina como única fuente de carbono. Preferiblemente, el gen de HPPD endógeno de la línea hospedante *Pseudomonas* se inactiva, por ejemplo, mediante inserción recombinante de un gen marcador antibiótico. Cada línea de *Pseudomonas* transformada para expresar una enzima de HPPD resistente alternativa se cultiva con diferentes concentraciones de inhibidores de HPPD seleccionados y se estima la resistencia inherente de la secuencia de HPPD expresada respecto a cada inhibidor de HPPD basándose en la concentración necesaria para evitar el crecimiento en un medio que contiene tirosina como única fuente de carbono.

El experto en la técnica reconocerá que existen muchas variantes potenciales de estos métodos para seleccionar polinucleótidos que lograrían esencialmente la misma selección. En general, este tipo de métodos de selección con microorganismos son adecuados para lograr un rendimiento relativamente elevado de polinucleótidos candidatos y son particularmente adecuados para un cribado previo inicial. Sin embargo, debido a los problemas potenciales con la exactitud de discriminación que surgen de la captación y metabolismo diferencial de herbicidas seleccionados y, además, debido a que las potencias inherentes muy elevadas de muchos inhibidores de HPPD herbicidas pueden limitar la resolución teórica de los métodos que se basan en los valores de MIC, es preferible también utilizar aspectos adicionales del método de selección.

En aspectos adicionales particularmente preferidos de los métodos para cribar y seleccionar polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica preferentemente enzimas de HPPD resistentes a inhibidores, se transforma material vegetal con los polinucleótidos candidatos, se regenera para obtener plantas fértiles morfológicamente normales que a continuación se miden para determinar la tolerancia diferencial respecto a los herbicidas inhibidores de HPPD seleccionados. En la técnica existe constancia de muchos métodos adecuados para la transformación que utilizan marcadores de selección adecuados tales como la kanamicina, vectores binarios tales como los procedentes de *Agrobacterium* y la regeneración de la planta como, por ejemplo, a partir de discos foliares del tabaco. Opcionalmente, se transforma también una población de control de plantas con un polinucleótido que expresa la HPPD de control. Como alternativa, se puede utilizar una planta dicotiledónea no transformada tal como *Arabidopsis* o el tabaco como control ya que, en cualquier caso, esta expresa su propia HPPD endógena. El promedio y la distribución de los niveles de tolerancia al herbicida de un intervalo de eventos de transformación de plantas primarios o su progenie respecto a inhibidores de HPPD herbicidas seleccionados entre Fórmula 1, Fórmula 2, Fórmula 3 y/o Fórmula 4 se evalúan de la manera normal basándose en el daño de la planta, síntomas de blanqueamiento merismático, etc. con un intervalo de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos se pueden expresar, por ejemplo, en función de los valores de GR50 obtenidos 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., representado en el eje y, donde los valores de GR50 incrementados corresponden a niveles incrementados de tolerancia inherente de la HPPD expresada. Los herbicidas se pueden aplicar de manera adecuada pre-emergencia y post-emergencia.

Se pueden seleccionar aquellos polinucleótidos donde la relación de la tolerancia inherente de la HPPD, determinada en función de sus efectos en las plantas, a un inhibidor seleccionado entre la Fórmula 1 o 2 respecto a la de un inhibidor de HPPD seleccionado entre la Fórmula 3 o la Fórmula 4 (R12/R34) es, al menos aproximadamente 2,5 y preferiblemente cuatro veces mayor que, o al menos 2,5 y preferentemente cuatro veces menor que la misma relación determinada respecto al mismo par de compuestos seleccionados para la HPPD de control. Se apreciará que muchas combinaciones de plantas superiores o inferiores, fenotipo indicador, método de transformación, método de evaluación y HPPD de control lograrían un alcance de selección similar. La expresión transitoria de los genes de HPPD de ensayo en tejidos verdes transformables de manera transitoria, verdes adecuados tales como protoplastos de células mesófilas u hojas de tabaco también se utiliza opcionalmente con el fin de proporcionar un medio más rápido de selección. Los métodos adecuados para este tipo de transformación

transitoria de tejidos son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, infiltración foliar, infiltración a vacío e infección con *Agrobacterium* o bombardeo de los tejidos diana con partículas recubiertas con ADN.

En estos métodos de ensayo transitorios, el tejido tratado, por ejemplo, se transfiere de manera adecuada a medio que contiene un intervalo de concentraciones de los herbicidas seleccionados después de aproximadamente 0,1-7 días tras la transformación y se evalúan para determinar signos visibles de blanqueamiento después de unos 1-5 días adicionales. Con el fin de proporcionar un control interno que permita determinar diferencias en la expresión transitoria, los constructos utilizados para la transformación también pueden comprender un gen tal como GUS que expresa un producto fácilmente cuantificable. Aunque es un método preferido, una limitación de los métodos que se basan en la transformación estable de plantas para la selección de polinucleótidos incluye el número relativamente elevado de eventos (preferentemente superior a 25) requeridos, una escala temporal de varios meses requerida para conseguir datos y el cultivo selectivo adicional, el análisis de la segregación y en ensayo de generaciones adicionales que se requiere idealmente para resolver las variabilidades biológicas y para realizar comparaciones entre los genes de HPPD alternativos expresados a partir de diferentes constructos.

En aspectos particularmente preferidos adicionales de los métodos de selección se seleccionan polinucleótidos que comprenden una región candidata que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD en función de las mediciones *in vitro* de los niveles de resistencia inherentes comparativos del candidato expresado y de las enzimas de HPPD de control.

La combinación particular de métodos *in vitro* y criterio utilizados en la presente es nueva. Se ha observado en la presente que los principios activos de los herbicidas de HPPD que son, o que tienen el potencial de ser, comercialmente útiles también tienden a ser unos inhibidores de las enzimas de HPPD tan potentes que no se pueden obtener los valores de K_i y otros parámetros cinéticos útiles para comparar la resistencia inherente de las enzimas de HPPD a partir de una cinética enzimática de estado estacionario o métodos de ensayo enzimáticos basados en la IC50, como se ha descrito generalmente en la bibliografía de HPPD.

En general, los valores de IC50 aparente se pueden determinar mediante parámetros experimentales arbitrarios tales como la concentración de enzima utilizada en el ensayo y el tiempo que se permite para cada reacción. Tampoco, ni tan siquiera con el uso de métodos más apropiados, se sabía hasta la fecha que los procesos descritos hasta la fecha para purificar parcial o totalmente HPPD causaban un daño tal a la enzima que alteraba los valores de los parámetros cinéticos y hasta un grado tal que impedía la comparación útil entre las tolerancias inherentes de las enzimas de HPPD. En particular, el efecto de una proporción elevada de las moléculas de enzima dañadas y de la actividad catalítica disminuida (expresada en función de los sitios activos) como resultado de la purificación parcial consiste en reducir la fuerza aparente medida de las interacciones de unión a HPPD con inhibidores.

A modo de ilustración no limitante de los métodos *in vitro* preferidos en la presente, las secuencias de HPPD se pueden expresar convenientemente en una levadura o en *E. coli* utilizando, por ejemplo, la expresión con un promotor de la polimerasa T7 u otros métodos adecuados que son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar extractos adecuados para los experimentos *in vitro* mediante ruptura celular, eliminación de desechos celulares y proteínas insolubles por centrifugación e intercambio de la fracción que contiene la enzima de HPPD soluble expresada en un tampón adecuado. El extracto preparado de esta manera puede, opcionalmente, congelarse en perlas y almacenarse a la temperatura del nitrógeno líquido hasta que se necesiten para su uso. Las enzimas de HPPD de control se preparan de una manera similar. Preferiblemente, se minimizan la manipulación y purificación parcial de la HPPD ya que, como se observa en la presente, la mayoría de los métodos para intentar purificar, u opcionalmente reconstituir con iones de hierro, conllevan pérdidas de actividad y capacidad de unión al inhibidor que podrán entorpecer las comparaciones deseadas entre la resistencia inherente y el nivel de actividad.

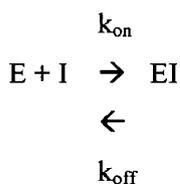
Opcionalmente, la enzima puede estar purificada en parte en presencia de inhibidores tales como los de estructura VIII (consulte más adelante) que tengan un efecto estabilizante pero que no se unan tan fuertemente que sean difíciles de eliminar posteriormente. Se han llevado a cabo de manera adecuada mediciones *in vitro*, por ejemplo, en extractos de *E. coli* donde la HPPD expresada procedente del transgén constituye, por ejemplo, un 0,25-10% de la proteína soluble total. En un aspecto particular de los métodos para la selección de polinucleótidos, se evalúa *in vitro* la resistencia inherente de las enzimas de HPPD expresadas en función de la velocidad de disociación del complejo enzima/herbicida (valor de k_{off}) y/o de acuerdo con la constante de disociación (K_d) del complejo enzima/herbicida.

Por lo tanto, en un aspecto se describe un método para seleccionar polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que comprende cribar una población de secuencias que codifican HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD aquellas que codifican una enzima capaz de formar un complejo con inhibidores de HPPD herbicidas seleccionados entre la Fórmula 1 y/o la Fórmula 2 donde, en agua a pH 7,0 y a 25 °C, la disociación de dicho complejo está gobernada por una constante de disociación (K_d) en el intervalo de 1-30 nM y/o una constante de la velocidad de disociación (k_{off}) en el intervalo de 4×10^{-5} a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y donde el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de la mesotriona contra plantas dicotiledóneas. La actividad frente a plantas dicotiledóneas se refiere en la presente a la actividad herbicida promediada a lo largo de un intervalo de 6 o más de esas malezas dicotiledóneas y especies de cultivo utilizadas normalmente en las cribas utilizadas para descubrimiento de compuestos en la comunidad agroquímica. La actividad herbicida frente a las plantas dicotiledóneas también se refiere en la presente a la actividad debida al inhibidor *per se* más que a la debida a algunos metabolitos de este, potencialmente más herbicidas, que se puedan formar en la planta o de otra manera.

En un aspecto adicional se describe un método para seleccionar polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que comprende cribar una población de secuencias que codifican HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD aquellas que codifican una enzima capaz de formar un complejo con inhibidores de HPPD herbicidas seleccionados entre la Fórmula 3 y/o la Fórmula 4 donde, en agua a pH 7,0 y a 25 °C, la disociación de dicho complejo está gobernada por una constante de disociación (K_d) en el intervalo de 1-30 nM y/o una constante de la velocidad de disociación (k_{off}) en el intervalo de 4×10^{-5} a 2×10^{-3} y donde el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de la mesotriona contra plantas dicotiledóneas.

En un aspecto adicional más se describe un método para seleccionar un polinucleótido que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que comprende cribar una población de secuencias que codifican enzimas de HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD aquellas secuencias que codifican una enzima que, en comparación con una enzima de control, muestra al menos una diferencia mayor de 2,5 veces o, preferiblemente, cuatro veces mayor en la resistencia inherente a inhibidores de HPPD seleccionados entre la Fórmula 1 y/o 2, en comparación con la Fórmula 3 y/o 4 y donde la enzima de control mencionada se selecciona de modo que muestre sustancialmente la misma selección de polinucleótidos que se obtienen cuando la enzima de control es la HPPD natural obtenida a partir de *Arabidopsis*. Para ilustrar adicionalmente lo que se quiere decir con esto y también lo que se quiere decir con algunos de los términos utilizados en los métodos de selección *in vitro* de la invención actual, la siguiente parte se refiere a un ejemplo no limitante donde el polinucleótido seleccionado expresa HPPD procedente de *Avena sativa* y donde la secuencia de HPPD de control procede de *Arabidopsis*. Las definiciones y la base de la selección utilizadas en esta ilustración se aplican de manera análoga a la selección de otros polinucleótidos que codifican otras enzimas de HPPD y que se pueden seleccionar de acuerdo con los mismos métodos de la invención u otros métodos *in vitro*. De acuerdo con este ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica, en este caso, la enzima de HPPD procedente de *Avena sativa*, se selecciona como resistente cuando, en comparación con la enzima de HPPD de control, en este caso procedente de *Arabidopsis*, se observa que la enzima de HPPD de *Avena* es resistente más de 2,5 veces a los inhibidores herbicidas seleccionados entre la Fórmula 1 y/o la Fórmula 2 en comparación con los herbicidas seleccionados entre la Fórmula 3 y/o la Fórmula 4. Con esto se quiere decir que, ensayados en condiciones idénticas (p. ej., a 25 °C en tampón Bis-Tris-propano 50 mM a pH 6,5 o 7,0 que contiene <4% o 25% v/v de glicerol y <2 o 20-25 mM de ascorbato de sodio) y preferiblemente ensayados utilizando el mismo método, una al lado de la otra el mismo día: ...

(a) los inhibidores de HPPD seleccionados entre la Fórmula 3 o 4 se disocian **más lentamente** del complejo formado con HPPD obtenida a partir de *Avena* de lo que lo hacen los inhibidores de HPPD seleccionados entre la Fórmula 1 o 2, hasta el grado de que la relación del valor de k_{off} (tal como se ilustra en el siguiente esquema) para el compuesto seleccionado entre la Fórmula 1 o la Fórmula 2 respecto al valor de k_{off} del compuesto seleccionado entre la Fórmula 3 o 4 (k_{off12}/k_{off34}) es al menos 2,5 veces y, preferiblemente, más de cuatro veces mayor que la relación obtenida de manera similar observada respecto a la disociación del mismo par de inhibidores seleccionados de la enzima de control de *Arabidopsis*, obtenida de manera similar.



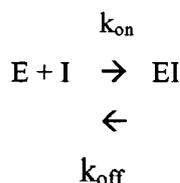
En la presente se ha observado que los inhibidores herbicidas de HPPD tienen generalmente valores bajos de k_{off} (de una magnitud inferior a $0,0003 \text{ s}^{-1}$, a menudo inferior a $0,000001 \text{ s}^{-1}$). Se apreciará que muchos métodos adecuados conocidos en la técnica para determinar valores de k_{off} tan pequeños son adecuados para llevar a la práctica el método actual. Estos incluyen medir las tasas de intercambio de inhibidores radiomarcados o marcados de otra manera ya sea con el complejo enzima inhibidor o al separarse de este. Por ejemplo, los complejos enzima inhibidor se pueden preparar fácilmente incubando preparaciones de HPPD con inhibidor marcado o sin marcar y a continuación, tras periodos adecuados, separar opcionalmente de manera rápida el complejo enzima inhibidor formado de esta manera del inhibidor en exceso mediante cualquier método adecuado tal como ultrafiltración, unión a filtros o intercambio al recorrer una columna de filtración en gel. Las reacciones de intercambio con el complejo enzima inhibidor preparado de esta manera se inician a continuación mediante la adición, según sea apropiado, de inhibidor en exceso marcado o no marcado. Las preparaciones de HPPD adecuadas para utilizar en los métodos de la invención actual son las fracciones de sobrenadante, sometidas a intercambio en tampón, relativamente impurificadas de lisados brutos centrifugados de cepas de *E. coli* modificadas para expresar la enzima de HPPD de interés hasta un nivel de, normalmente, aproximadamente un 0,25-10% de la proteína soluble total. En principio se pueden utilizar muchos métodos tales como radiométricos, fluorimétricos, RMN, despolarización de fluorescencia, EPR, Mossbauer, espectrofotometría de UV/VIS etc. o resonancia de fonones, para monitorizar las reacciones de intercambio enzima/ligando y, particularmente en este caso donde la enzima contiene un átomo de hierro en el sitio de unión del ligando. Opcionalmente, el método de monitorización puede ser continuo (como, por ejemplo, con métodos con perlas/de centelleo por proximidad) o discontinuos, basados en la recogida de datos en varios

momentos donde se retiran las muestras y los componentes marcados unidos y no unidos se separan y cuantifican rápidamente.

Los valores de k_{off} se pueden calcular de manera adecuada mediante un ajuste informático basado en la integración numérica de los datos de intercambio junto con la información de la concentración del sitio activo de HPPD y en los valores k_{on} obtenidos como se describe posteriormente. En los extractos brutos de, por ejemplo, HPPD de *Arabidopsis*, se observa habitualmente que aproximadamente un 20-30% de mesotriona unida se intercambia de manera relativamente rápida ($t_{1/2} \sim 30-40$ min para la disociación de mesotriona a 25 °C, pH 7,0 en un 20-25% v/v de glicerol) mientras que un 70-80%, que se supone aquí que corresponde a la mayor parte de la enzima que realmente es totalmente activa, se intercambia lentamente ($t_{1/2} \sim 4$ d para la disociación de mesotriona a 25 °C, pH 7,0 en un 20-25% v/v de glicerol). Esta suposición está apoyada por (1) la observación de que la manipulación adicional de la enzima asociada con la pérdida de actividad conlleva un incremento relativo de la proporción de la fracción de intercambio rápido y (2) la observación, por otra parte, de que la fracción no varía de acuerdo con el tiempo de la formación del complejo (de 10 s a 24 h) y, por lo tanto, no es un intermedio atrapado cinéticamente en la reacción de unión. En cualquier caso, en la presente, los valores de k_{off} se calculan siempre a partir de la velocidad de la reacción de intercambio lento principal. Se apreciará que son posibles muchos métodos para realizar las comparaciones cinéticas deseadas sin la determinación explícita o rigurosa de las velocidades off pero, basándose en el mismo principio básico, se logrará el mismo resultado de selección.

O:

b) los inhibidores herbicidas seleccionados entre la Fórmula 3 o 4 se unen, respecto al sustrato HPP, **más fuertemente** a la HPPD obtenida a partir de *Avena* de lo que lo hacen los herbicidas seleccionados entre la Fórmula 1 o 2, hasta el grado de que la relación del valor de K_d ($K_d = k_{off}/k_{on}$ ilustrada en el siguiente esquema) para el compuesto seleccionado entre la Fórmula 1 o la Fórmula 2 respecto al valor de K_d para el compuesto seleccionado entre la Fórmula 3 o 4 (K_{d12}/K_{d34}) es al menos 2,5 veces y, preferiblemente, más de cuatro veces superior a la relación obtenida de manera similar observada respecto a la unión del mismo par de inhibidores seleccionados a la enzima de control de *Arabidopsis*, obtenida de manera similar.



El método para determinar los valores de k_{off} se ha explicado de manera breve anteriormente. En algunos aspectos del método, se determina la K_d determinando también el valor de k_{on} , la constante de velocidad que gobierna la velocidad de formación del complejo de HPPD con el inhibidor donde $K_d = k_{off}/k_{on}$. Los métodos cinéticos enzimáticos adecuados para obtener valores de k_{on} se basan en la velocidad de inicio de la inhibición enzimática a lo largo de un intervalo de concentraciones de inhibidor y de sustrato. Los métodos adecuados combinan, por ejemplo, el ensayo de HPLC para HPPD descrito por Viviani *et al.* 1998 (Pestic. Biochem. Physiol., 62, 125-134) que se puede iniciar con la adición de enzima y se recogen puntos de evaluación durante el primer minuto más o menos de reacción, métodos estándar para las mediciones del valor de K_m para el hidroxifenolpiruvato y métodos para el análisis cinético/cálculo tal como lo describe, por ejemplo, Schloss J.V. (1989) en "Target sites of Herbicide Action" (Boger P., y Sandmann G. ed.) CRC Press Boca.

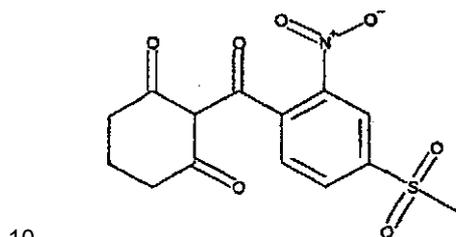
Como alternativa, se pueden determinar estimaciones de los valores de k_{on} más directamente mezclando HPPD con un herbicida inhibidor radiomarcado o marcado de otra manera y monitorizar el progreso de la reacción de unión, opcionalmente aislando rápidamente el complejo enzima inhibidor y/o mediante uno cualquiera de varios métodos (por ejemplo, fluorimetría, EPR, RMN, radiodetección, etc.). Por ejemplo, la reacción con HPPD se puede iniciar mediante la adición de herbicida radiomarcado, permitir que proceda durante una serie de tiempos diferentes y desactivar rápidamente mediante la adición y mezcla con un gran exceso de inhibidor no marcado. En este caso, el grado de unión a tiempos diferentes, por ejemplo, se puede monitorizar utilizando ultrafiltración, unión a filtros o filtración en gel para separar HPPD unido a una radiomarca de la marca no unida y cada una de esas fracciones se puede cuantificar a continuación mediante el recuento del centelleo.

Cuando se mide k_{on} mediante este tipo de mediciones de unión física es importante notar que la unión de la mayoría de los compuestos frente a algunas enzimas de HPPD parece ser bifásica donde la mitad de los sitios de unión se unen rápidamente y a continuación el resto de la unión ocurre a continuación de manera relativamente lenta. En este tipo de casos, es la fase de unión inicial rápida, que normalmente corresponde a constantes de velocidad en el intervalo de $0,1-4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, la que proporciona la constante de velocidad relevante. Esta corresponde al valor obtenido a partir de la utilización de métodos con ensayos enzimáticos ya que, aunque únicamente la mitad de los sitios están unidos inicialmente, en la misma escala temporal se inhibe esencialmente toda la actividad catalítica de la HPPD. Se apreciará que son posibles muchos métodos más o menos rigurosos para realizar las comparaciones cinéticas deseadas que puede que no conlleven la determinación explícita de las velocidades off y las velocidades on pero que, basándose en los mismos principios básicos, logran el mismo resultado de selección.

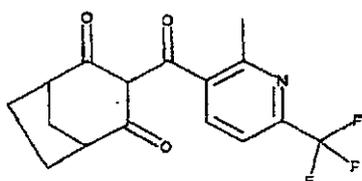
Por lo tanto, por ejemplo, en un método preferido y con un rendimiento relativamente alto, los valores de K_d

- relativos, que son todo lo que se necesita para determinar las relaciones requeridas de los valores de K_d de los inhibidores de HPPD seleccionados, se estiman indirectamente mediante competición con la unión de un patrón conocido u otro ligando "sustituto". Un ligando sustituto de este tipo podría ser cualquier molécula incluido un péptido, opcionalmente, seleccionado inicialmente a partir de un colección de presentación en fagos, un aptámero de ARN o un fragmento de un anticuerpo. Preferentemente, es un inhibidor de HPPD marcado. Por lo tanto, se puede utilizar la estructura I o IV o V como un patrón marcado y diseñar experimentos donde los valores de K_d relativos de los inhibidores de HPPD seleccionados se evalúan en función de su capacidad para competir con la cantidad de patrón marcado unido a la HPPD de ensayo o de control y hacerla disminuir.

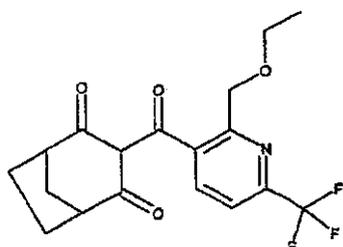
ESTRUCTURA I. 2-(Nitro-4-metanosulfonilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona



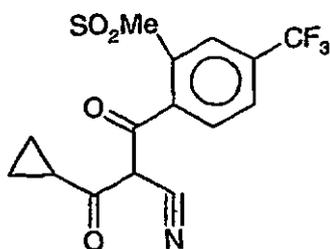
ESTRUCTURA II. 3-[[2-metil-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.1]-octano-2,4-diona



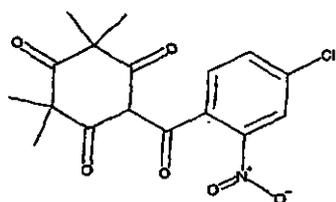
ESTRUCTURA III. 3-[[2-(etoximetil)-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.1]-octano-2,4-diona



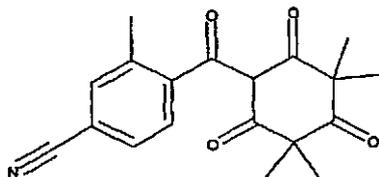
ESTRUCTURA IV. 1-[2-(metanosulfonil)-4-(trifluorometil)fenil]-3-ciclopropil-2-ciano-propano-1,3-diona



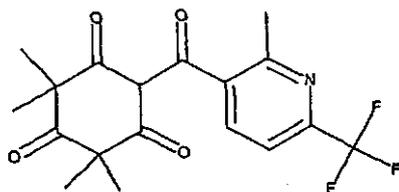
ESTRUCTURA V. 2-[2-nitro-4-clorobenzoil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona



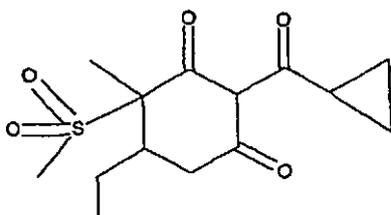
ESTRUCTURA VI. 2-[2-metil-4-cianobenzoil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona



ESTRUCTURA VII. 3-[[2-metil-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona



5 ESTRUCTURA VIII. 2-[ciclopropilcarbonil]-5-etil-4-metanosulfonil-4-metilciclohexano-1,3-diona



10 Idealmente, con el fin de obtener la mejor aproximación a los valores de K_d en equilibrio, se debería permitir que se equilibraran las reacción de unión competitiva de HPPD más los inhibidores patrón y de ensayo a, por ejemplo, 25 °C tanto tiempo como sea posible para alcanzar el equilibrio y, preferentemente, días antes de la toma de muestras y evaluación, mediante filtración en gel o unión a un filtro de nitrocelulosa, etc., de la cantidad de marca que está sin unir y que está unida a HPPD. Se sobreentenderá que el tiempo permitido para este tipo de reacciones puede ser más corto debido a limitaciones en la estabilidad enzimática y que, según se hacen más cortos los tiempos de reacción, los valores obtenidos reflejarán, y de manera más acusada, las diferencias en los valores de k_{on} más que valores de K_d pura. Se sobreentenderá que, potencialmente, se podrían utilizar un gran número de tecnologías alternativas tales como las basadas en la tecnología con perlas fluorescentes Luminex o recuento de centelleo por proximidad, por ejemplo, para evitar el requisito de un paso para separar la marca unida de la no unida y proporcionan esencialmente el mismo resultado. La utilización de este tipo de métodos para determinar los valores de K_d relativa también se pueden transformar en un formato de placa de microtitulación y ser útiles no solamente para la selección de polinucleótidos que comprenden regiones que codifican enzimas de HPPD sino también para el descubrimiento de inhibidores que son moléculas con un peso molecular bajo como potenciales cabezas de serie para nuevos herbicidas químicos.

25 En un aspecto adicional más, la invención comprende un método para seleccionar adicionalmente polinucleótidos que codifican enzimas de HPPD resistentes a inhibidores que tienen una actividad catalítica elevada, lo que quiere dar a entender un valor de k_{cat}/K_m de hidroxifenilpiruvato en el intervalo de 0,10 a 5 s⁻¹ μM⁻¹ a pH 7,0, 25 °C. Los ensayos y mediciones de K_m se llevan a cabo utilizando métodos publicados tales como el ensayo de HPLC de Viviani *et al.* 1998 (Pestic. Biochem. Physiol., 62, 125-134). Los ensayos de evolución temporal se curvan rápidamente y, utilizando métodos con parada de este tipo, es importante realizar suficientes mediciones de la velocidad inicial con tiempos adecuadamente cortos y ajustar los datos obtenidos de manera apropiada para obtener estimaciones de la velocidad. Las preparaciones de HPPD adecuadas que retienen la mayor parte de la enzima en una forma totalmente activa se preparan, por ejemplo, rápidamente como fracciones de sobrenadante, sometidas a intercambio iónico, relativamente brutos de lisados de cepas de *E. coli* manipuladas para expresar la enzima de HPPD de interés a un nivel de, típicamente, aproximadamente 0,2-10% de la proteína soluble total.

35 Con el fin de obtener la k_{cat} , el valor de $V_{máx}$ (moles de HGA formados/s), obtenido a partir de los experimentos en los que se hace variar la concentración de sustrato, se divide por la concentración de sitios activos de enzima. Existen muchos métodos para determinar la concentración de sitios activos. Los herbicidas tales como los de la estructura I, IV o V se unen muy fuertemente al sitio activo de las enzimas de HPPD y, marcados opcionalmente, generan sondas para los sitios activos adecuadas útiles para la determinación de la concentración de sitios activos. Por lo tanto, por ejemplo, a partir de las titulaciones de extractos que contienen una concentración desconocida de

sitios activos de HPPD frente a una concentración fijada de inhibidor marcado, es posible definir un gráfico de dilución del extracto frente a la cantidad de marca unida y, de esta manera, obtener la concentración de sitios de unión del inhibidor o "sitios activos". Para monitorizar la reacción de unión son adecuados muchos métodos que incluyen, por ejemplo, la utilización de radiomarcas, RMN EPR, Biacore (Pharmacia), etc.

5 Debido a que la unión de algunos inhibidores de HPPD es bifásica es importante llevar a cabo la titulación de la unión cuidadosamente y variar el inhibidor y el tiempo ya que, en algunos casos, el resultado obtenido será cercano a "la mitad de los sitios" más que a una cuantificación total de la concentración de sitios activos. La reacción de unión que se utiliza para la titulación necesita que se permita, tanto como sea posible, que alcance el equilibrio con las modificaciones debidas a consideraciones prácticas de la estabilidad enzimática. Se apreciará que son posibles muchos métodos, más o menos rigurosos, para realizar las comparaciones cinéticas deseadas que puede que no conlleven la determinación explícita de k_{cat}/K_m pero que, basándose en los mismos principios básicos, lograrán el mismo resultado en lo que se refiere a la clasificación de las eficacias relativas de polinucleótidos que comprenden regiones que codifican una enzima de HPPD. Por ejemplo, los valores de k_{cat} y por lo tanto los de k_{cat}/K_m se pueden obtener utilizando anticuerpos generados para polipéptidos de HPPD purificados por SDS PAGE con el fin de cuantificar la cantidad de polipéptido de HPPD en extractos brutos activos utilizando ensayos de tipo ELISA o Western fluorescente cuantitativo. Sin embargo, los métodos basados en la cuantificación del polipéptido son independientes de si el material representa enzima activa y, por esta razón, se prefieren los métodos para la determinación de k_{cat} basados en la unión al inhibidor debido a que, para los inhibidores que se asemejan a intermedios de la reacción catalítica, la retención de esta capacidad de unirse fuertemente es equivalente a la retención de la función catalítica. Según se purifica adicionalmente la HPPD y se pierde más actividad, la enzima dañada aún se une al inhibidor marcado pero, según disminuye la actividad, una proporción creciente de esta unión se vuelve más débil y se intercambia más rápidamente. Por lo tanto, en un aspecto preferido del método, la fracción de sitios de unión del inhibidor que experimentan un intercambio relativamente rápido se descuenta en el cálculo de la k_{cat} . Por lo tanto, por ejemplo, en extractos brutos de HPPD de *Arabidopsis* se observa habitualmente que, de la capacidad de unión total medida para la mesotriona (Estructura I), aproximadamente un 20-30% se intercambia rápidamente ($t_{1/2} \sim 30-40$ min para la disociación de la mesotriona a 25 °C, pH 7,0 en un 25% v/v de glicerol) mientras que un 80% se supone en la presente que corresponde a enzima activa que se intercambia lentamente ($t_{1/2} \sim 4$ d para la disociación de mesotriona a 25 °C, pH 7,0 en un 20% v/v de glicerol). Por lo tanto, en este caso, la K_{cat} se puede basar en la determinación de sitios activos calculada como $\sim 80\%$ de la capacidad de unión total medida, aunque los valores citados en esta solicitud no tienen en cuenta ese ajuste del potencial.

En un aspecto, la presente solicitud describe enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD que no se obtienen a partir del maíz, trigo o cebada y que se caracterizan por la capacidad de la enzima de formar un complejo con la mesotriona donde la disociación de dicho complejo en agua a pH 7,0 y a 25 °C está gobernada por una constante de disociación (K_d) que tiene un valor en el intervalo de 1,0 a 30 nM y/o donde la disociación de dicho complejo está gobernada por una constante de velocidad (k_{off}) que tiene un valor en el intervalo de 4×10^{-5} a 2×10^{-3} . En un aspecto adicional, la enzima resistente al inhibidor de HPPD mencionada se caracteriza adicionalmente por tener un valor de k_{cat}/K_m en el intervalo de 0,1 a $5 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ y, más preferentemente, en el intervalo de 0,8 a $5 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$.

En un aspecto adicional una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 o una secuencia que tiene, basándose en el método Clustal de alineación y cuando se compara a lo largo de cualquier fragmento concreto de 150 aminoácidos de la alineación, al menos un 93% de identidad con la secuencia de las SEC ID Nos 8, 10, 12, 14, 16 o 18 o una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD con la SEC ID No 4 o una secuencia que tiene, basándose en el método Clustal de alineación y cuando se compara a lo largo de cualquier fragmento concreto de 150 aminoácidos de la alineación, al menos un 91% de identidad con la secuencia de la SEC ID No 4.

Las estructuras de inhibidores de HPPD citadas en esta memoria descriptiva y en algunos de los aspectos preferidos de la descripción son como siguen. Obsérvese que independientemente de qué estructuras se dibujen en una forma ceto, estas estructuras también pueden existir en una forma enólica, y que todas estas formas y todas las otras formas tautómeras también están incluidas.

50 De acuerdo con aspectos particularmente preferidos (i) se pueden seleccionar polinucleótidos para codificar enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD y (ii) se pueden producir plantas que son sustancialmente tolerantes a ejemplos representativos del herbicida de Fórmula 4, tal como

2-[2-nitro-4-clorobenzoil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona y/o

2-[2-metil-4-cianobenzoil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona y/o

55 3-[[2-metil-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]-4,4,6,6-tetrametilciclohexano-1,3,5-triona.

Las estructuras de los inhibidores de HPPD específicos citadas como Estructuras numeradas I a VIII ya se han descrito. De acuerdo con aspectos preferidos particulares (i) se pueden seleccionar polinucleótidos para codificar enzimas de HPPD resistentes a HPPD y (ii) se pueden producir plantas que son sustancialmente tolerantes a una o más de estas estructuras. Obsérvese que independientemente de qué estructuras se dibujen en una forma ceto,

estas estructuras también pueden existir en una forma enólica, y que todas estas formas y todas las otras formas tautómeras están también incluidas.

Se apreciará que las plantas transformadas, y de este modo el material vegetal transformado, de la presente descripción son tolerantes o resistentes a múltiples herbicidas dentro de los grupos de inhibidores de HPPD representados por las Fórmulas 1, 2, 3 y 4, así como a herbicidas que inhiben HPPD fuera de estos agrupamientos, tales como 5-metil-2-(2-cloro-3-etoxi-4-metanosulfonilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona.

También se apreciará que aquellas plantas que son tolerantes a inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 1 y 2 serán generalmente menos tolerantes o resistentes a herbicidas, representativos de las Fórmulas 3 y 4 tal como la estructura V. En consecuencia, aquellas plantas que son tolerantes a los inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 3 y 4 serán generalmente menos tolerantes o resistentes a herbicidas, representativos de las Fórmulas 1 y 2 tales como la estructura I (mesotriona). Allí donde las plantas son plantas transgénicas, el herbicida se puede aplicar pre- o post-emergencia, según las técnicas habituales para la aplicación de herbicidas.

La solicitud describe aún más una proteína codificada por los polinucleótidos actualmente descritos, y un vector que comprende estos polinucleótidos que comprenden una secuencia de HPPD bajo el control de expresión de un promotor derivado del gen que codifica la subunidad pequeña de rubisco, un promotor vírico de *cestrum*, un promotor de actina, un promotor de poliubiquitina, el promotor FMV35S, un promotor de plastocianina, un promotor de histona, el promotor CaMV35S y el promotor GST1. En un aspecto preferido adicional, en el que la mencionada planta es una monocotiledónea, la secuencia de HPPD está bajo el control de expresión de un promotor de poliubiquitina de maíz o un promotor vírico de *cestrum*. En todavía un aspecto preferido adicional, en el que la mencionada planta es una planta de cultivo dicotiledónea, la secuencia de HPPD está bajo el control de expresión de una subunidad pequeña de *arabidopsis* del promotor de rubisco, un promotor de actina de *arabidopsis* o un promotor vírico de *cestrum*.

El material vegetal transformado se puede someter a un primer inhibidor de HPPD – tal como un herbicida de tricetona – y se puede seleccionar visualmente en base a una diferencia de color entre el material transformado y no transformado cuando se somete al mencionado herbicida. El material no transformado se pone blanco y permanece blanco cuando se somete al procedimiento de selección, mientras que el material transformado se pone blanco pero más tarde se vuelve verde, o puede permanecer verde, igualmente, cuando se somete al mencionado procedimiento de selección. Las técnicas de transformación, selección y regeneración vegetal, que pueden requerir modificación normal con respecto a una especie vegetal particular, son bien conocidas para la persona experta. En aspectos preferidos del método de selección, el mencionado ADN (que distingue plantas transformadas de plantas no transformadas) comprende una región seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19, o comprende una región que codifica una HPPD, región la cual es complementaria a aquella que cuando se incubaba a una temperatura entre 60 y 65°C en una disolución salina tamponada con citrato de fuerza 0,3 que contiene 0,1% de SDS, seguido del aclarado a la misma temperatura con disolución salina tamponada con citrato de fuerza 0,3 que contiene 0,1% de SDS, todavía se hibrida con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19.

Cuando las secuencias de ensayo y de la invención son bicatenarias, el ácido nucleico que constituye la secuencia de ensayo tiene preferiblemente una T_M dentro de 10°C de la de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En el caso de que la secuencia de ensayo y la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 se mezclen juntas y se desnaturalicen simultáneamente, los valores de T_M de las secuencias están preferiblemente en 5°C entre sí. Más preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones relativamente restrictivas, estando preferiblemente las secuencias de ensayo o de la invención soportadas. De este modo, una secuencia de ensayo o de la invención desnaturalizada se une preferiblemente primero a un soporte, y la hibridación se efectúa durante un período de tiempo específico a una temperatura de entre 60 y 65°C en una disolución salina tamponada con citrato de fuerza 0,3 que contiene 0,1% de SDS, seguido del aclarado del soporte a la misma temperatura pero con una disolución salina tamponada con citrato de fuerza 0,1. Cuando la hibridación implica un fragmento de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19, las condiciones de hibridación pueden ser menos restrictivas, como será obvio para el experto.

En el caso de que el polinucleótido codifique más de una proteína, cada región codificante de la proteína puede estar bajo el control transcripcional de un promotor operable vegetal y terminador. Se puede desear dirigir los productos de traducción del polinucleótido hacia compartimientos subcelulares específicos dentro de la célula vegetal, en cuyo caso el polinucleótido comprende secuencias que codifican péptidos de tránsito de cloroplasto, secuencias que se dirigen a la pared celular, etc., inmediatamente 5' de las regiones que codifican los mencionados productos de traducción maduros.

La expresión traduccional de las secuencias que codifican proteínas y que están contenidas en la mencionada secuencia de ADN se puede potenciar relativamente incluyendo secuencias potenciadoras de la traducción no traducibles conocidas 5' de dichas secuencias que codifican proteínas. El experto está muy familiarizado con tales secuencias potenciadoras, que incluyen las secuencias derivadas de TMV conocidas como omega, y omega prima,

así como otras secuencias derivables, *entre otras*, de las regiones 5' de las secuencias que codifican proteínas de cubierta víricas, tales como las del virus del mosaico del tabaco. Otras regiones no traducidas de 5' preferidas incluyen aquellas derivadas de, por ejemplo, los genes que codifican rubisco o glucanasa.

5 Los polinucleótidos se pueden modificar puesto que se eliminan los motivos de inestabilidad de ARNm codificado y/o las regiones de ajuste fortuitas, o, por ejemplo, se usan codones preferidos de dicotiledóneas de manera que la expresión de la secuencia así modificada en una planta dicotiledónea produce una proteína sustancialmente similar que tiene una actividad/función sustancialmente similar a la obtenida mediante la expresión de la secuencia no modificada en el organismo en el que las regiones que codifican las proteínas de la secuencia no modificada son endógenas. En un aspecto adicional de la secuencia modificada, el grado de identidad entre la secuencia modificada y una secuencia endógenamente contenida en dicha planta dicotiledónea y que codifica sustancialmente la misma proteína es menor que alrededor de 70%.

15 La presente solicitud también describe una planta completa fértil morfológicamente normal que es transgénica para una secuencia de ADN, que no se deriva del maíz, trigo o cebada y que es seleccionable de acuerdo con los métodos descritos anteriormente de modo que comprende una región que codifica una enzima de HPPD resistente a un inhibidor de HPPD, preferiblemente con una estabilidad elevada y que tiene un valor de k_{cat}/K_m en el intervalo de 0,10 a 5,0 $s^{-1} mM^{-1}$, más preferiblemente en el intervalo de 0,8 a 5,0 $s^{-1} mM^{-1}$ la cual, en comparación con una enzima de HPPD de control derivada de *Arabidopsis*, es al menos 2,5 veces y, preferiblemente, superior a 4 veces más resistente a los herbicidas seleccionados entre la Fórmula 1 o la Fórmula 2 que a los herbicidas seleccionados entre la Fórmula 3 o la Fórmula 4. Como alternativa, la planta es transgénica para una secuencia derivada de manera similar la cual se selecciona basándose en que comprende una región que codifica una enzima de HPPD resistente a un inhibidor de HPPD capaz de formar un complejo con inhibidores de HPPD herbicidas seleccionado entre la Fórmula 1 y/o la Fórmula 2 donde, en agua a pH 7,0 y a 25 °C, la disociación del complejo mencionado está gobernada por una constante de disociación (K_d) en el intervalo de 1-30 nM y/o una constante de la velocidad de disociación (k_{off}) en el intervalo de 4×10^{-5} a $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ y donde el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de la mesotriona frente a plantas dicotiledóneas. En aspectos adicionales, la planta mencionada es transgénica respecto a un polinucleótido que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD que se obtiene a partir de una planta o, más particularmente, se obtiene a partir de una planta monocotiledónea o, aún más particularmente, de una especie de arroz, *Brachiaria*, *Chenchrus*, *Lolium*, *Festuca*, *Setaria*, *Eleusine*, *Sorghum* o *Avena*. En otros aspectos adicionales, el ADN mencionado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19.

35 Las plantas transformadas según el método incluyen, pero no se limitan a, cultivos de campo, frutas y vegetales tales como cánola, girasol, tabaco, remolacha, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, banana, melón, remolacha forrajera, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, etc. Las plantas genéticamente modificadas particularmente preferidas son soja, remolacha, guisante, habas de campo, chopo, uva, cítrico, alfalfa, centeno, avenas, césped y forraje, lino y colza, y plantas productoras de nueces en tanto que no se mencionan ya específicamente. En un aspecto particularmente preferido del método, dicha planta es una dicotiledónea, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en cánola, girasol, tabaco, remolacha, haba de soja, algodón, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, banana, melón, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, y se prefiere particularmente de forma preferible haba de soja. En aspectos adicionales preferidos, dicha planta es maíz o arroz. Preferiblemente, la planta es haba de soja, arroz o maíz. La solicitud también describe la progenie de la planta de la frase anterior y las semillas u otro material de propagación de tales plantas y progenie.

45 La presente solicitud también describe la utilización de la secuencia de ADN referenciada anteriormente en la producción de tejidos vegetales y/o plantas completas fértiles morfológicamente normales donde i) se incrementa la tolerancia de las plantas a los inhibidores de HPPD herbicidas, donde el incremento es superior respecto a los inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 1 o 2 es superior que respecto a los inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 3 o 4 o donde el incremento es superior respecto a los inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 3 o 4 es superior que respecto a los inhibidores de HPPD seleccionados entre las Fórmulas 1 o 2 y/o (ii) que contiene niveles de antioxidantes liposolubles relativamente elevados cuando se compara con organismos no transgénicos tales como tejidos o plantas. Los "antioxidantes liposolubles" incluyen, por ejemplo, plastoquinonas, α -tocoferoles y carotenoides, tales como los precursores de la vitamina A, adecuados.

55 La presente solicitud además describe adicionalmente un polinucleótido que comprende potenciadores transcripcionales y una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD cuya expresión está controlada por su promotor autólogo, donde la enzima se puede identificar de acuerdo con el método descrito en la presente. Preferentemente, la enzima de HPPD mencionada tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No 4. También se describen células vegetales que se han transformado con una secuencia polinucleotídica que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD, caracterizada por que la secuencia que codifica la HPPD es seleccionable de acuerdo con los métodos descritos en la presente y/o se puede obtener a partir de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Shewenella Colwellina*, *Vibrio vulnificus*, *Streptomyces avermitilis* y *Coccidioides immitus*. Preferiblemente, cuando las células son células dicotiledóneas la región promotora utilizada para controlar la expresión de la secuencia que codifica la HPPD se obtiene a partir de la subunidad pequeña de

rubisco y cuando las células son células monocotiledóneas la región promotora se obtiene a partir del gen poliubiquitina del maíz.

La descripción será manifiesta adicionalmente a partir de la siguiente descripción, tomada conjuntamente con los listados de secuencias asociados.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID nº 1 Secuencia de ADN de HPPD de la cepa 87-79 de *Pseudomonas fluorescens*

SEC ID nº 2 Secuencia de aminoácidos de HPPD de la cepa 87-79 de *Pseudomonas fluorescens*

SEC ID nº 3 Secuencia de ADN de HPPD de *Avena sativa*

SEC ID nº 4 Secuencia de aminoácidos de HPPD de *Avena sativa*

10 SEC ID nº 5 Secuencia de aminoácidos de HPPD de trigo

SEC ID nº 6 Secuencia de ADNc de HPPD de trigo

SEC ID nº 7 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Brachiaria platyphylla*

SEC ID nº 8 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Brachiaria platyphylla*

SEC ID nº 9 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Cenchrus echinatus*

15 SEC ID nº 10 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Cenchrus echinatus*

SEC ID nº 11 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Lolium rigidum*

SEQ ID nº 12 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Lolium rigidum*

SEQ ID nº 13 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Festuca arundinacea*

SEC ID nº 14 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Festuca arundinacea*

20 SEC ID nº 15 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Setaria faberi*

SEC ID nº 16 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Setaria faberi*

SEC ID nº 17 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Eleusine indica*

SEC ID nº 18 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Eleusine indica*

SEC ID nº 19 Secuencia parcial de ADN de HPPD de *Sorghum*

25 SEC ID nº 20 Secuencia parcial de aminoácidos de HPPD de *Sorghum*

Secuencias cebador

SEQ ID nº 21 HPPD RT2

SEQ ID nº 22 HPPDRT4

SEQ ID nº 23 DT30

30 SEQ ID nº 24 HPPD3

SEQ ID nº 25 DTR

SEQ ID nº 26 5' Avesa I

SEQ ID nº 27 3' Avesa

SEQ ID nº 28 TAHPPDNde

35 SEQ ID nº 29 TAHPPDSph

SEQ ID nº 30 TAHPPDBam

SEC ID nº 31 HPPD4R

SEC ID N° 32 HPPD 5

EJEMPLO 1. Clonación de secuencias de 4-HPPD completas y de longitud parcial a partir de Avena y otras especies monocotiledóneas

5 Se prepara ARN total a partir de plántulas de *Avena Sativa*, *Brachiaria platyphylla*, *Cenchrus echinatus*, *Lolium*
rigidum, *Festuca arundinacea*, *Setaria faberi*, *Eleusine indica* y *Sorghum sp.* de cinco días usando el método de
extracción Tri-Zol (Life Technologies). Se lleva a cabo RT-PCR en cada una de las muestras de ARN usando el kit
de RTPCR de una etapa (Invitrogen) conjuntamente con los cebadores HPPD5 (SEC ID No. 32) y HPPD4R (SEC ID
10 No. 31). Los productos obtenidos se clonan en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen), y los productos clonados se
secuencian usando los cebadores estándar directo e inverso M13. Las secuencias obtenidas se dan (o están
comprendidas en, por ejemplo, SEC ID No. 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. El ARN mensajero se obtiene, por ejemplo, a
partir de *Avena sativa* usando el sistema de purificación de ARNm Oligotex (Qiagen). El extremo 5' de, por ejemplo,
el gen de HPPD de *A. sativa* se identifica usando 5' RACE, que se lleva a cabo usando el kit Gene Racer kit
15 (Invitrogen) con los cebadores génicos específicos (GSP) HPPD RT2 (SEC ID NO. 21) y HPPD RT4 (SEC ID
NO.22). El extremo 3' del gen se identifica mediante 3' RACE, que se lleva a cabo usando Themoscript RT (Life
Technologies) con el cebador oligo dT DT30 (SEC ID No 23), seguido de la PCR con GSP HPPD3 (SEC ID No. 24)
y el cebador DTR (SEC ID No. 25). 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 clonan en
20 pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), y los productos clonados se secuencian usando los cebadores universales directo e
inverso M13 con un secuenciador de ADN automatizado ABI377. Los cebadores 5'Avesa1 (Sec ID No. 26) y 3'
Avesa (Sec ID No. 27) se diseñan para los codones de iniciación y terminación de la traducción del gen de HPPD
(SEC ID No.3) respectivamente. Ambos cebadores se usan conjuntamente con el kit de RTPCR de una etapa
(Qiagen) para obtener secuencias codificantes de longitud completa. Los productos obtenidos se clonan en pCR 2.1
TOPO, se secuencian, y se identifican como 4-HPPD mediante comparación con secuencias conocidas en la
técnica.

EJEMPLO 2. Expresión heteróloga de los genes de 4-HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, *Arabidopsis* y trigo en *E. coli*

Las secuencias de los genes de 4-HPPD de la cepa 87-79 de *Pseudomonas fluorescens* (véase el documento WO
98/20144), de *Arabidopsis* (véase el documento WO 97/2728) y de trigo (véase el documento WO 00/32757) son
30 todas conocidas en la técnica. Los tres genes se obtienen mediante RT-PCR usando cebadores que incorporan
sitios de enzimas de restricción adecuados a fin de permitir su clonación en vectores de sobreexpresión de *E. coli*
adecuados, tales como la serie pET (Novagen), y, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3. La expresión
heteróloga del gen de HPPD de *Pseudomonas* en *E. coli* también se describe en el documento WO 98/20144, cuyo
contenido se incorpora a la presente por referencia, y la expresión heteróloga de HPPD de *Arabidopsis* en *E. coli*
35 también se describe en Garcia et al in Plant Physiol (1999) 119, 1507-1516), cuyo contenido se incorpora a la
presente por referencia.

EJEMPLO 3. Expresión heteróloga del gen de 4-HPPD de *Avena sativa* en *E. coli*

El gen de HPPD de *A. sativa* de longitud completa se corta del vector pCR 2.1 TOPO, descrito en el ejemplo 1,
usando *Nde* 1 y *Bam* H1, y se liga en pET-24a (Novagen) restringido de forma similar. Este vector se transforma
entonces en células RP codón+ de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene). Las cepas hospedantes adecuadas, tales como
40 BL21(DE3) u otros lisógenos de DE3 que poseen el mencionado vector, expresan cantidades de enzima de HPPD
suficiente para proporcionar su uso en cribados de alto rendimiento para identificar inhibidores de 4-HPPD
alternativos. La autenticidad de la estirpe transformada se confirma mediante PCR, recuperación del plásmido y
análisis de restricción. La HPPD purificada de dicha cepa hospedante transformada (por ejemplo, mediante
electroforesis en gel con SDS y corte de la banda) se puede usar en la provisión de antisueros para el análisis de
45 plantas transformadas con un polinucleótido que codifica 4-HPPD.

EJEMPLO 4. Expresión heteróloga de 4-HPPD de *Pseudomonas* en tabaco

El gen de *Pseudomonas fluorescens* procedente de la cepa 87-79 (SEC ID NO 1) se edita mediante PCR para
incluir los sitios 5' *Nco*1 y 3' *Kpn*1. Este producto se liga entonces en pMJB1. pMJB1 es un plásmido derivado de
50 pUC19 que contiene el promotor vegetal de CaMV35S potenciado doble operable, un potenciador TMV omega y el
terminador de la transcripción NOS. En la Figura 2 del documento WO 98/20144 se muestra una representación
esquemática del plásmido resultante. El casete de expresión, que comprende el promotor 35S potenciado doble, el
líder TMV omega, el gen de 4-HPPD y el terminador nos, se corta usando *Hind* III/*Eco* R1 (digestión parcial con *Eco*
R1), y se clona en pBIN 19 digerido de forma similar y se transforma en células competentes TOP 10 de *E. coli*.

El ADN se recupera de la *E. coli* y se usa para transformar LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, y las bacterias
55 transformadas se seleccionan en medios que contienen rifampicina y canamicina. El tejido de tabaco se somete a
transformación mediada por *Agrobacterium* usando métodos bien descritos en la técnica y, opcionalmente, como se
describe en otra parte aquí. Los brotes transformados se regeneran a partir de callo resistente a canamicina. Los
brotes se enraízan en agar MS que contiene canamicina. Los explantes enraizados que sobreviven se vuelven a

enraizar para proporcionar aproximadamente 50 plantas transformadas resistentes a canamicina.

EJEMPLO 5. Expresión heteróloga de secuencia de HPPD de trigo en tabaco

El gen de HPPD de trigo se obtiene mediante RT-PCR usando los cebadores TAHPPDNde (SEC ID No. 28) que contiene un sitio *Nde*1 en el codón de iniciación de la traducción, o TAHPPDSph (SEC ID No. 29) que contiene el sitio Sph 1 en el codón de inicio de la traducción, y TAHPPDBam (SEC ID No. 30) que contiene un sitio BamH1 en el codón de parada de la traducción. Los productos de la PCR se clonan en pCR 2.1, y se secuencian para confirmar la autenticidad. El producto de *Nde*1:BamH1 se liga en el vector pMCJA, que es un derivado de pMJB1 (documento WO 98/20144) y contiene un sitio *Nde*1 en el codón de iniciación de la traducción en lugar de *Nco*1. Los productos de *Sph*1:BamH1 se ligan en el vector ATSSU1, un vector derivado de pUC que comprende la subunidad pequeña de *Arabidopsis* del promotor rubisco y terminador nos, o ATSSU2, un vector derivado de pUC que comprende la subunidad pequeña de *Arabidopsis* del promotor rubisco, un péptido de tránsito optimizado y el terminador nos. Estos casetes de expresión génica se transfieren todos ellos después a vectores binarios adecuados tales como BIN19 (y vectores afines) y denominados TAHPPD1 (Figura 1), TAHPPD2 (Figura 2) y TAHPPD3 (Figura 3) respectivamente. Estos constructos se transformaron todos en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, que a su vez se usó para transformar tabaco, usando la metodología descrita previamente.

Los explantes (es decir, una hoja más segmento corto del tallo que contiene la yema auxiliar) se colocan en agar MS (+ 3% de sacarosa) que contiene diversas concentraciones de mesotriona (véase anteriormente) desde 0,02 hasta 2 ppm. En tabaco, por ejemplo, los explantes no transformados se blanquean completamente a 0,02 ppm. No se recuperan tras la exposición prolongada al herbicida. En estos experimentos particulares, sólo se blanquea el brote que se desarrolla a partir de la yema, y la hoja en el tejido explantado sigue siendo verde.

Un número de las plantas transformadas PCR + ve toleran 0,1 ppm de mesotriona (alrededor de 5 veces el nivel que provoca síntomas en tabaco de tipo salvaje, por ejemplo) sin indicación de blanqueo. Su raíz es normal y es fenotípicamente indistinguible de plantas no transformadas. Un subconjunto de los transformantes es tolerante a concentraciones de > 0,2 ppm, produciendo plantas que parecen normales y enraizan bien en presencia de herbicida. Algunas de las plantas transformadas se pueden blanquear inicialmente cuando se someten al herbicida a dichas mayores concentraciones, pero con la exposición prolongada “reverdecen” y se “recuperan” progresivamente.

Un subconjunto de las mencionadas plantas transgénicas resistentes a herbicida se tratan con el herbicida conocido isoxaflutol [5-ciclopropil-4-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilbenzoil)-isoxazol] o, como alternativa, el ácido sincárpico de estructura VI. Las mencionadas plantas son, con respecto a controles no transformados, resistentes a todos los herbicidas, pero, sin embargo, son sustancialmente menos resistentes a isoxaflutol, cuyo principio activo es el dicetonitrilo (estructura IV), un herbicida de Fórmula 3, o a la estructura VI, un herbicida de Fórmula 4, que lo que son a mesotriona, un herbicida de Fórmula 1, indicando así claramente que las plantas no son completamente resistentes de forma cruzada a múltiples clases de inhibidor de 4-HPPD, que, aunque tienen el mismo modo de acción, son de tipos estructurales distintos.

Ejemplo 6. Expresión heteróloga del gen de 4-HPPD de Avena sativa en tabaco

El gen de 4-HPPD de *Avena sativa* contenido en el vector pCR 2.1 TOPO (ejemplo 1) se corta del vector usando *Nde*1 y *Bam*H1, y se liga en pMCJA digerido de forma similar. La estructura del vector resultante se muestra esquemáticamente en la Figura 4.

El casete de expresión vegetal de 4-HPPD se liga entonces en el vector binario pBin19 restringido con *Hind* III y *Eco*R1, y se transforma en células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Este vector binario se transforma entonces en tabaco usando métodos bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, como se describen en cualquier parte.

Un subconjunto de las mencionadas plantas transgénicas resistentes a herbicida se tratan con el herbicida conocido isoxaflutol [5-ciclopropil-4-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilbenzoil)-isoxazol] o, como alternativa, el ácido sincárpico de estructura VI. Las mencionadas plantas son, con respecto a controles no transformados, resistentes a todos los herbicidas, pero, sin embargo, son sustancialmente menos resistentes a isoxaflutol, cuyo principio activo es el dicetonitrilo (estructura IV), un herbicida de Fórmula 3, o a la estructura VI, un herbicida de Fórmula 4, que lo que son a mesotriona, un herbicida de Fórmula 1, indicando así claramente que las plantas no son completamente resistentes de forma cruzada a múltiples clases de inhibidor de 4-HPPD, que, aunque tienen el mismo modo de acción, son de distintos tipos estructurales.

Ejemplo 7. Producción de ADN para la transformación vegetal

Se produce ADN lineal, adecuado para uso en transformación de plantas mediante bombardeo, digiriendo un vector que contiene el casete de expresión vegetal con una enzima o enzimas de restricción adecuadas para cortar dicho casete, que entonces se purifica en un gel de agarosa y se aísla usando un Biotrap (Schleicher y Schuell).

Para la transformación mediante *Agrobacterium* de haba de soja o de maíz, el casete de expresión vegetal se subclona en vectores binarios como se describe en los ejemplos 12 y 13.

Ejemplo 8. Cribado *in planta* y selección de polinucleótidos que comprenden una región que codifica una HPPD resistente a inhibidores de HPPD

Las plantas son 1) plantas de tabaco no transformadas, variedad Samsun, que expresan el gen de HPPD de tabaco (control) endógeno, 2) plantas de tabaco transformadas para expresar HPPD de *Pseudomonas* según los ejemplos aquí, y 3) plantas de tabaco transformadas para expresar HPPD de trigo, también según los ejemplos aquí.

Se hicieron crecer grandes números de plantas a partir de semillas en pequeñas macetas en el invernadero hasta la etapa de plántula de 5-7 hojas, y se pulverizaron con un intervalo de dosis, adecuadamente de 0,0 a 2000 g/ha, de diferentes herbicidas inhibidores de HPPD seleccionados de los compuestos de fórmula 1, 2, 3 y 4. Los tratamientos se formulan adecuadamente en, por ejemplo, agua desionizada + 0,5% de tensioactivo Turbocharge™ o, como alternativa, 50% de acetona/agua, y se aplicaron a 2001/ha a una docena o más de réplicas de cada estirpe y a cada tasa de pulverización (en el que las plantas fueron plantas T1 (progenie autofecundada de transformantes primarios) y que todavía segregan a normalmente 1:2:1) o, cuando homocigotas, 3-6 plantas. El grado de daño visible en términos de blanqueamiento de meristemas y hojas, necrosis eventual y crecimiento reducido con respecto a controles sin pulverizar, se evalúa a ~1 y 3 semanas después del tratamiento. Los datos procedentes de segregantes susceptibles se excluyeron del análisis. En resumen, los resultados obtenidos son los siguientes.

Las plantas de control (no transformadas) son ~1-2 veces más susceptibles a isoxaflutol y ~2-4 veces más susceptibles a la Estructura VI, Estructura VII o Estructura V que a mesotriona, Estructura I, Estructura II de potencia similar a isoxaflutol. Las plantas que expresan HPPD de trigo son 10-40 veces menos susceptibles a mesotriona que lo que lo son a la Estructura VI o Estructura V, y también son 4-10 veces menos susceptibles a mesotriona que lo que lo son a isoxaflutol. Las plantas que expresan HPPD de trigo son 4-15 veces menos susceptibles a la Estructura II que lo que lo son a la Estructura V, Estructura VI o Estructura VII. Las plantas que expresan HPPD de *Pseudomonas fluorescens* son 2-6 veces más tolerantes a isoxaflutol, Estructura V, Estructura VI o Estructura VII que lo que lo son a mesotriona o a la Estructura II.

Los resultados demuestran, *entre otros*, plantas, que comprenden un polinucleótido de ensayo que comprende una región que codifica una HPPD de trigo, que son, por ejemplo, >16X más tolerantes a la estructura I, mesotriona, un compuesto seleccionado de la Fórmula 1 que lo que lo son, por ejemplo, a la estructura VI, un compuesto seleccionado de Fórmula 4, mientras que, para plantas de control no transformadas, la diferencia respectiva a tolerancia con respecto a los mismos compuestos es <4. La relación de los dos, relaciones de tolerancia Fórmula 1/Fórmula 2 con respecto a las plantas de ensayo y de control, es por lo tanto al menos >16/4, que es >2,5 y también >4. Por lo tanto, según el método, el polinucleótido que comprende una región que codifica una HPPD de trigo se criba vía transgénesis, regeneración, reproducción y ensayo de pulverización de tabaco y, según estos resultados, se selecciona como aquel que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD. Los resultados también demuestran plantas que comprenden un polinucleótido de ensayo que comprenden una región que codifica una HPPD de *Pseudomonas*, que son, por ejemplo, >2-4 X más tolerantes a la Estructura V, Estructura VI o Estructura VII, compuestos seleccionados de la Fórmula 4, que lo que lo son, por ejemplo, a la Estructura I, mesotriona, un compuesto seleccionado de la Fórmula 1, mientras que para plantas de control no transformadas la diferencia respectiva en tolerancia con respecto a los mismos compuestos es < ~0,3-0,5. La relación de los dos, relaciones de tolerancia Fórmula 4/Fórmula 1 con respecto a plantas de ensayo y de control es, por lo tanto, al menos >2/0,5, que es >2,5 y también >4. Por lo tanto, según el método, el polinucleótido que comprende una región que codifica una HPPD de *Pseudomonas* se criba vía transgénesis, regeneración, reproducción y pulverización de tabaco, y por lo tanto se selecciona como aquel que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD.

Ejemplo 9. Cribado *in vitro* y selección de polinucleótidos que comprenden regiones que codifican enzimas de HPPD que tienen valores kcat/Km en el intervalo de 0,10-5/uM/s.

Se preparan extractos brutos de cepas de *E. coli* recombinantes que expresan diferentes secuencias de ensayo de HPPD a partir de, por ejemplo, Arabidopsis, trigo, Avena sativa, *Pseudomonas*, etc., y como se describe en otra parte en los ejemplos. Los clones recombinantes se introducen en BL21 (DE3) una cepa RP optimizada en codones de *E. coli* suministrada por Stratagene. La proteína de HPPD se expresa en esta cepa tras la adición de 1 mM de IPTG al medio fermentador (por ejemplo medio LB suplementado con 100 ug/ml de canamicina). La proteína recombinante de la masa predicha correcta se identifica (i) en base a la tinción de Coomassie de geles de SDS de extractos celulares y comparación lado a lado con geles teñidos con Coomassie de extractos de células *E. coli* similares transformadas con un vector pET24a vacío, y (ii) mediante transferencia western usando un anticuerpo policlonal previamente provocado frente al polipéptido de HPPD, cortado y eluido a partir de un gel de SDS-PAGE. Típicamente, se lavaron 25 g de peso húmedo de células en 50 ml de tampón 0,1M de Hepes/KOH a pH 7,5. Tras la centrifugación a baja velocidad, el pelete celular se resuspende en 50 ml del mismo tampón. Las células se suspenden de manera uniforme usando un homogeneizador de vidrio, y después se interrumpen a 10000 psi usando un interruptor de células Constant Systems (Budbrooke Rd, Warwick, U.K.) Basic Z. El extracto bruto se centrifuga a ~40.000 g durante ~2 h, y el pelete se desecha. La fracción sobrenadante transparente se intercambia entonces en el mismo tampón con Sephadex G25, y el extracto así preparado se usa de forma reciente o se forma perlas en nitrógeno líquido y se almacena a -80°C hasta su uso. Típicamente, juzgado a partir de geles de SDS-PAGE teñidos con tinte de Coomassie, los extractos contenían 1-4% de la proteína soluble como HPPD.

Típicamente, las concentraciones proteicas están en el intervalo 15-30 mg/ml, y las actividades específicas, basadas en el uso del ensayo de HPLC a 25°C y una concentración de sustrato de 100 μ M de HPP, están en el intervalo de 50-300 nmoles de HGA producido/min./mg de proteína.

El título de sitios de unión del inhibidor enzimático en cada preparación de enzima se cuantifica según lo siguiente.

5 Un conjunto de reacciones se monta en tubos de centrifuga eppendorf a la temperatura del hielo. Un intervalo de volúmenes de extracto, típicamente de 0 a 50 μ l, se diluyen hasta un volumen final de 250 μ l en tampón de reacción, y la reacción en cada tubo se inicia mediante adición de una cantidad fija de inhibidor radiomarcado. El tampón de reacción es adecuadamente 50 mM de tampón de Bis-Tris-propano a pH 7,0 que contiene 25 mM de ascorbato de sodio (recientemente obtenido) y 2-3,8 mg/l de catalasa muy pura Sigma C3155, ~50.000 unidades/mg de proteína).

10 Opcionalmente, el tampón de reacción también contiene 25% v/v de glicerol. El inhibidor de HPPD radiomarcado se marca de forma adecuada con 14 C a una cantidad entre 0,5 y 3 GBq/mmol, y el inhibidor se selecciona adecuadamente de mesotriona, el dicetonitrilo derivado de isoxaflutol o 5-metil-2-(2-cloro-3-etoxi-4-metanosulfonilbenzoil)ciclohexano-1,3-diona. La concentración fija de radiomarcador en cada tubo se ajusta adecuadamente a 0,1-0,4 μ M de inhibidor de HPPD. En el caso de algunas parejas de inhibidor/enzima de HPPD,

15 las reacciones se pueden llevar a cabo i) durante un tiempo relativamente corto a 25°C, adecuadamente durante 5-15 minutos, o ii) durante un período largo, toda la noche a 4°C, seguido de 3-5 h a 25°C, a fin de lograr, respectivamente, i) la mitad de los sitios o ii) la ocupación sustancialmente completa de los sitios. Los expertos en la técnica apreciarán que esto es una materia de experimento. Al final del período, las muestras, típicamente 0,2 ml, de la reacción se recogen y se cromatografían rápidamente a una columna de filtración en gel de ~ 2 ml Pharmacia

20 "NAP5", y se separan en fracciones que contienen proteína (0,8 ml) y fracciones libres de proteína (3 ml). Las dos fracciones se dividen en viales de centelleo, se añade fluido de centelleo, y se suma el número de recuentos en cada fracción. Los recuentos en la fracción que contiene proteína representan inhibidor radiomarcado unido a proteína, y los recuentos en la fracción libre de proteína representan inhibidor no unido. La pureza y actividad radioquímica específica del inhibidor radiomarcado es conocida. Por lo tanto, suponiendo que los inhibidores se unen a HPPD en proporciones de aproximadamente 1 ó 0,5 por sitios catalíticos/monómero de proteína, se puede calcular la concentración de sitios de unión del inhibidor, y por lo tanto los sitios catalíticos en el extracto. Sería de esperar tal estequiometría para inhibidores que están dirigidos al sitio activo y que imitan a intermedios catalíticos. A título de ejemplo adicional, a continuación se dan los resultados de algunos experimentos típicos.

30 Se incubaron alícuotas de 0, 2, 5, 10, 20, 40 y 60 μ l de un extracto de HPPD de *Arabidopsis* de 20 mg de proteína/ml cada una con 10 μ l (196 Bq) de 14 C mesotriona (concentración final ~ 17 μ M a ~1,12 GBq/mmol) en un volumen final de 240 μ l de tampón de Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0 y a 25°C que contiene ascorbato de sodio 25 mM y 2-3,8 mg/l de catalasa de alta pureza (Sigma C3155, ~50.000 unidades/mg de proteína), durante 24 h a la temperatura del hielo, y después a 25°C durante ~3,5 h. Los experimentos pilotos indicaron que, en tales condiciones, la unión de mesotriona sería casi completa, ocurriendo rápidamente el ~50% inicial de la unión, y ocurriendo más lentamente el restante 50%. Se tomaron muestras de 200 μ l de cada reacción y se cromatografiaron en una columna NAP5, a fin de separar radiomarcador unido a proteína del radiomarcador no unido, y las dos fracciones se contaron. Los resultados obtenidos se representan en la TABLA 1 y se expresan en la Figura 5, pero,

35 después de correcciones adecuadas, con dps unido convertido a la concentración en μ M de marcador unido en la reacción original. De acuerdo con los estudios de TLC y RMN, la Tabla 1 indica que el 95% del radiomarcador es mesotriona (como se define por su unión a HPPD), correspondiendo ~4-5% a contaminantes de radiomarcador que no son mesotriona que no muestran unión fuerte a HPPD. La concentración de sitios de unión a mesotriona en el extracto de *Arabidopsis* sin diluir es ~12,2 μ M. El polipéptido Mr de HPPD de *Arabidopsis* es ~50 kD; de este modo, se puede calcular que HPPD constituye el 3% de la proteína del extracto de HPDD de *Arabidopsis* bruto original.

40

TABLA 1. Titulación de HPPD de *Arabidopsis* frente a 14 C mesotriona

Volumen de extracto (μ l)	14 C unido (dps)	14 C total (dps)	% unido
0	0,3	169,9	0,0
2	22,95	168,9	13,6
5	56,48	178,23	31,7
10	113,3	173,1	65,5
20	152,3	166,25	91,6
40	157,6	168	93,8
60	158,7	168,1	94,4

45

Será manifiesto para los expertos en la técnica que se pueden usar esencialmente los mismos métodos para medir el título de sitios de unión del inhibidor en extractos de otras enzimas de HPPD. De este modo, por ejemplo, un extracto de HPPD procedente de trigo a 24 mg de proteína/ml se determina que contiene ~20 +/- ~4 µM de sitios de unión para dicetonitrilo marcado con ¹⁴C o 5-metil-2-(2-cloro-3-etoxi-4-metanosulfonilbenzoil)ciclohexano-1,3-diona marcado con ¹⁴C. Para trigo, la primera molécula inhibidora se une más rápidamente, la segunda se une más lentamente, y el intervalo de error es mayor que para HPPD de *Arabidopsis* debido a que la enzima de trigo es en cierto modo menos estable y pierde más rápidamente su capacidad de unión. La HPPD de trigo (y de hecho todas las enzimas de HPPD) es estabilizada por inhibidores, y es muy estabilizada por aquellos inhibidores que se unen lo más fuertemente a ella. Tales inhibidores son la mejor elección para medir el título de sitios de unión del inhibidor.

El ensayo de HPLC para la actividad de HPPD, y la determinación de kcat y Km, se lleva a cabo según lo siguiente. El tampón de ensayo es 105 µM (o según sea apropiado) de hidroxifenilpiruvato (HPP) recientemente obtenido en tampón Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0. El tampón de dilución es tampón Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0 que contiene ascorbato de sodio 25 mM y 3,8 mg/l de catalasa bovina (Sigma C3155, ~50.000 unidades/mg). La enzima de HPPD, recientemente descongelada desde el almacenamiento se mantiene a temperatura del hielo y se diluye, también a la temperatura del hielo, hasta una concentración apropiada en tampón de dilución (típicamente, 2-8 µM) antes del uso. Los ensayos se inician por adición de 5 µl de enzima diluida a 100 µl de tampón de ensayo a 25°C en un tubo de centrifuga eppendorf y se detienen, a una serie de tiempos entre 0 y 90 s, mediante adición de 20 µl de ácido perclórico al 25% y mezclamiento con remolino. 80-100 µl de los contenidos de cada tubo eppendorf se transfieren a un vial de HPLC antes de la separación mediante HPLC de fase inversa. Para la HPLC, se cargaron 40 µl a 1,5 ml/min. en una columna Aqua C18 5µ 75 x 4,6 mm (la sílice está desactivada en los extremos) equilibrada con 5,5% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético (tampón A) usando un sistema de HPLC HP 1100. La columna se eluye, también a 1,5 ml/min., usando un lavado de 2 minutos con tampón A, seguido de un lavado de 2 minutos con una mezcla 30/70 de tampón A/acetonitrilo al 100%, seguido de otro lavado de 3,5 minutos con tampón A (entre los usos intermedios, la columna se almacena en acetonitrilo al 65%/agua). La elución de HGA (ácido homogentísico) y HPP (hidroxifenilpiruvato) se monitoriza usando una celda de flujo de UV, y se cuantifica vía integración de la absorbancia pico a 292 nm. HGA eluye a alrededor de 2 minutos, y HPP eluye más tarde. Se usó un conjunto estándar de concentraciones de HGA para proporcionar una curva estándar a fin de calibrar la absorbancia de UV del pico de HGA frente a la concentración de HGA.

El ensayo se usa para proporcionar estimaciones de los valores Km y Vmax de preparaciones de HPPD típicas. Para las determinaciones de Km, es importante obtener datos de velocidad próximos al inicial, que, para ensayos detenidos, se hace más crítico a menores concentraciones del sustrato. De este modo, es importante tomar un número de puntos de tiempo para cada concentración de sustrato y usar datos de puntos de tiempo tempranos a concentraciones de sustrato bajas. En la TABLA 2 se proporciona un ejemplo de un experimento para determinar el valor de Km y Vmax para la HPPD de trigo.

TABLA 2. HPPD de trigo ensayada a diferentes tiempos (s) y concentraciones de HPP. Los datos son cantidades de HGA formados (pmol). El extracto de HPPD de trigo madre (18 µM) se diluyó 30 veces. El ensayo, volumen final 105 µl, contenía 5 µl de HPPD diluida.

TIEMPO (s)	5	15	25	35
	Conc. de HPP µM			
3	44	129	182	207
6	-	186	282	389
8	55	220	347	462
12	68	245	417	556
20	113	352	479	777
60	133	427	700	963

El valor Km para la HPPD de trigo con respecto al sustrato HPP es alrededor de 10,1 +/- 1,5 µM. La Vmax es 33,5 +/- 4 pmol/s. A partir de la titulación de los sitios activos, se calcula que la concentración de HPPD de trigo en el ensayo es 31,5 nM, que corresponde a 3,1 pmoles de sitios enzimáticos en 105 µl. Los valores kcat y kcat/Km para HPPD de trigo se pueden calcular por lo tanto como ~11/s y ~1,1/s/µM, respectivamente. De forma similar, se determina que los valores kcat, Km y kcat/Km de HPPD de *Arabidopsis* son ~4,65/s, 3,5 µM y 1,3/s/µM, respectivamente, y también que los valores kcat, Km y kcat/Km de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* de tipo salvaje son ~5,04/s, 32 µM y 0,16/s/µM, respectivamente. Se encuentra que la forma mutante de HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, que tiene un triptófano en la posición 336, tiene un valor kcat/Km al menos 3 veces

reducido con respecto al del tipo salvaje ($k_{cat}/K_m < \sim 0,05/s/\mu M$). Se puede calcular además que las actividades específicas de las enzimas puras de *Pseudomonas* de tipo salvaje (subunidad Mr ~ 40223), de *Arabidopsis* (subunidad Mr ~ 46486) y de trigo (subunidad Mr 48923), a $25^\circ C$ y con sustrato saturante, son, al menos, 7,13, 5,7 y $\sim 13,5 \mu mol/min./mg$ de proteína, que son valores mucho mayores que los previamente conocidos para las enzimas de HPPD; estos valores crecen aún más en 20-30% cuando se tiene en cuenta además 20-30% de la unión a la fracción de sitios "de intercambio rápido" (véase más abajo) que representan de forma bastante posible la unión a enzima dañada, o sitios de otro modo no relacionados con la actividad catalítica.

Por lo tanto, según este ejemplo, un polinucleótido que comprende una región que codifica, por ejemplo, una HPPD de trigo, se criba vía un método que comprende la expresión heteróloga en una bacteria, la preparación de un extracto que contiene la HPPD expresada en una forma activa, la determinación de la concentración de sitios activos a través de la titulación frente a un inhibidor dirigido al sitio activo de unión fuerte, y la realización de ensayos enzimáticos en un intervalo de concentraciones de sustrato. Se selecciona como un polinucleótido, es útil en el contexto de la descripción actual, que codifica una enzima de HPPD adecuadamente resistente debido a que el valor de k_{cat}/K_m calculable a partir de los datos así obtenidos es $\sim 1,0/s/\mu M$ a pH 7,0, $25^\circ C$, que está tanto dentro del intervalo reivindicado de $0,1$ a $5 s^{-1} \mu M^{-1}$ como del intervalo preferido de $0,8$ a $5 s^{-1} \mu M^{-1}$.

Ejemplo 10. Cribado *in vitro* y selección de polinucleótidos que comprenden regiones que codifican enzimas de HPPD resistentes a inhibidores de HPPD basado en la medición de los valores relativos y absolutos de las constantes de velocidad que gobiernan la disociación de complejos enzima/inhibidor.

Se preparan extractos brutos de cepas recombinantes de *E. coli* que expresan, en un caso, una HPPD de control (procedente de *Arabidopsis*) y, en el otro, una o más de unas secuencias de HPPD de ensayo, como se describe en el ejemplo anterior. El título de los sitios activos y la actividad enzimática también se definen y se miden como se describe en los ejemplos anteriores.

Las constantes de disociación (velocidades off) de inhibidores seleccionados de la Fórmula 1 y/o 2 y/o 3 y/o 4 de los complejos que forman con enzimas de HPPD de ensayo y de control se miden de forma adecuada de muchas maneras. De este modo, por ejemplo, se comparan las velocidades de disociación de mesotrióna, un compuesto seleccionado de la Fórmula 1, y del dicetonitrilo de isoxaflutol, un compuesto seleccionado de la Fórmula 3, a partir de sus complejos respectivos con HPPD de trigo de ensayo y con HPPD de *Arabidopsis* de control. El método y los resultados de un ensayo típico son los siguientes.

La ^{14}C mesotrióna tiene una actividad específica de $1,12 GBq/mmol$. Ésta es $\sim 95\%$ pura radioquímicamente mediante TLC y se basa en la proporción de material que se une fuertemente a HPPD. La HPPD de *Arabidopsis* y de trigo (ensayo) se diluye cada una hasta una concentración de $\sim 0,45$ y $0,54 \mu M$, respectivamente, en $1,6 ml$ de tampón de Bis-Tris-propano $50 mM$ a pH 7,0 que contiene glicerol al 25%, ascorbato de sodio $25 mM$ y $3 mg/l$ de catalasa bovina (Sigma C3155, ~ 50.000 unidades/mg) que contiene ^{14}C mesotrióna $0,46 mM$, y se deja reaccionar a $25^\circ C$ durante $2,5-3 h$. Tras esta reacción de unión inicial, se inician las reacciones de intercambio mediante adición de mesotrióna fría hasta una concentración final de $60 \mu M$, y se retiran alícuotas de $200 \mu l$ a diversos tiempos para cromatografiar rápidamente en una columna de filtración en gel NAP5 equilibrada en $50 mM$ de BTP a pH 7 que contiene KCl $0,1 M$, separando en fracciones que contienen radiomarcador unido a proteína o radiomarcador libre, y contando con líquido de centelleo. Los resultados se resumen en la Figura 1, en la que en los experimentos de control, en los que no se añade mesotrióna fría, el inhibidor permanece sustancialmente unido.

La concentración de mesotrióna unida (eje vertical) a tiempo cero ($\sim 0,35 \mu M$ en la Figura 1) es en cierto modo menor que la concentración de enzima de *Arabidopsis* ($\sim >0,43 \mu M$) o, en el caso de trigo que estaba en exceso, del inhibidor ($\sim 0,46 \mu M$). Esto es debido a que, después de $2,5$ a $3 h$ a $25^\circ C$, la unión no es totalmente completa ($\sim 0,5$ equivalentes de mesotrióna se unen rápidamente, y el resto se une lentamente), y la velocidad es en cierto modo ralentizada por la presencia de 25% v/v de glicerol. También es manifiesto que $\sim 25\%$ de la mesotrióna unida a HPPD de *Arabidopsis* se intercambia de forma relativamente rápida, mientras que el resto se intercambia de forma lenta. En extractos brutos de *Arabidopsis* así como otras enzimas de HPPD, se encuentra normalmente que aproximadamente el 20-30% de la mesotrióna unida se intercambia de forma relativamente rápida ($t_{1/2} \sim 30-40 min.$ para la disociación de mesotrióna a partir de HPPD de *Arabidopsis* a $25^\circ C$, pH 7,0, en 20-25% v/v de glicerol), mientras que el 70-80%, que se presume aquí que corresponde al grueso de la enzima genuina completamente activa, se intercambia lentamente ($t_{1/2} \sim 4 d$ para la disociación de mesotrióna a $25^\circ C$, pH 7,0, en 20-25% v/v de glicerol). Esto es apoyado por 1) la observación de que la manipulación adicional de la enzima asociada con pérdida de actividad conduce a un incremento relativo en la proporción de la fracción que se intercambia rápidamente, y 2) la observación preliminar de que la proporción relativa de la fracción que se intercambia de forma rápida no varía, por otro lado, según el tiempo de la reacción de unión ($10 s$ a $24 h$) y por lo tanto no es un intermedio cinéticamente atrapado en la reacción de unión. La noción de que la fracción que se intercambia rápidamente representa simplemente enzima dañada se ve apoyada además por la observación de que la producción de la fracción que se intercambia rápidamente disminuye o no se observa cuando se llevan a cabo experimentos con un exceso de HPPD. El origen de la fracción que se intercambia rápidamente no está completamente claro y sigue abierto a especulación. No obstante, aquí, para los fines prácticos, los valores K_{off} se calculan siempre aquí a partir de la velocidad de la reacción de intercambio lenta principal. Tales valores K_{off} se calculan mediante modelo de ordenador

para obtener un mejor ajuste de los datos al progreso computerizado de una reacción de intercambio $EI + I^* \leftrightarrow EI^*$ + I gobernada por cuatro constantes de velocidad (pero en las que los dos valores k_{on} se supone que son los mismos como lo son cada uno de los otros dos valores k_{off}) y usando valores k_{on} según se determina independientemente en los ejemplos adicionales (la exactitud de los valores k_{on} no es, en ningún caso, generalmente crítica para tales ajustes). Está claro que la mesotrióna se disocia rápidamente de la HPPD de trigo de ensayo, pero mucho más lentamente de la HPPD de *Arabidopsis* de control. Los datos se ajustan mejor a valores k_{off} para mesotrióna de $\sim 3,8 \times 10^{-4}$ /s de HPPD de trigo y $2,0 \times 10^{-6}$ /s de HPPD de *Arabidopsis* (en los dos casos, siendo los valores k_{on} , en presencia de glicerol, 7×10^4 /s/M y $1,1 \times 10^5$ /s/M, respectivamente).

Obsérvese que todos los inhibidores de ensayo están fácilmente disponibles en una forma radiomarcada. Un método más general para medir velocidades off es formar primero el complejo con inhibidor de ensayo no marcado, para intercambiar rápidamente el complejo libre de inhibidor no marcado en exceso, y después comenzar la reacción de intercambio mediante adición de un exceso de un inhibidor marcado estándar, cuyas propiedades cinéticas ya son conocidas. La reacción se monitoriza entonces, y se determinan las proporciones relativas de marcador unido y no unido a diversos tiempos. Se encuentra que los valores k_{off} así obtenidos de la monitorización de la velocidad directa de intercambio de inhibidor marcado que se une a HPPD son, según lo esperado, generalmente muy próximos a los valores obtenidos de la monitorización de la velocidad inversa, que es el intercambio de inhibidores marcados del complejo con HPPD. Éste último es el método de elección cuando la velocidad de intercambio es rápida ($t_{1/2} < 3$ h).

Aparte de ^{14}C mesotrióna (estructura I) (actividad específica 1,12 GBq/mmol, como se usa aquí), adecuadamente se usan como inhibidores estándar ^{14}C estructura III (actividad específica 1,036 GBq/mmol, como se usa aquí), y ^{14}C 5-metil-2-(2-cloro-3-etoxi-4-metanosulfonilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona (1,81 GBq/mmol, como se usa aquí). Preferiblemente, cualquier inhibidor estándar que se encuentre que se une de la manera más fuerte (tiene el valor más bajo de K_d) a una HPPD, se usa como el inhibidor estándar con respecto a aquella HPPD para la evaluación de los valores K_d y k_{off} de los inhibidores no marcados.

El método y los resultados que siguen ilustran el método para medir los valores k_{off} de inhibidores no marcados. Se diluye HPPD de *Arabidopsis* hasta $2,76 \mu M$ en tampón de Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0 que contiene ascorbato de sodio 25 mM, 2 mg/l de catalasa bovina (Sigma C3155, ~ 50.000 unidades/mg) y $20 \mu M$ de inhibidor de ensayo, en este caso mesotrióna o estructura II. Esta reacción de unión inicial con inhibidor no marcado se deja toda la noche a la temperatura del hielo, y después durante 2-3 h a $25^\circ C$. Entonces se intercambian $200 \mu l$ libre de inhibidor no unido mediante filtración en gel en una columna Pharmacia NAP5 y dilución en 1,5 ml de tampón de Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0 que contiene ascorbato de sodio 25 mM y 2 mg/l de catalasa bovina (Sigma C3155, ~ 50.000 unidades/mg). La reacción de intercambio se inicia mediante adición de $80 \mu l$ de ^{14}C mesotrióna hasta una concentración final de $1,75 \mu M$, y se retiran alícuotas en diversos tiempos para la filtración rápida en gel en una columna NAP5 calibrada con 50 mM de BTP a pH 7 que contiene 0,1 M de KCl, separación en fracciones unidas a proteína y libres de proteína, y recuento mediante centelleo de líquidos. Los resultados se resumen en la Figura 2, en la que los triángulos representan datos de mesotrióna sin marcar, los círculos representan datos de la estructura II. En experimentos de control, en los que la enzima se preincuba sin inhibidor no marcado o, preferiblemente, con un inhibidor débil tal como en la estructura VIII, el inhibidor radiomarcado se une completamente en un período de 5-6 h (hasta una concentración de $0,385 \mu M$ en el ejemplo particular del experimento representado en la Figura 2), y permanece sustancialmente unido de forma completa durante un período de días (disminuyendo la cantidad unida en $\sim 5-7\%/d$, que corresponde al deterioro gradual de la enzima de HPPD de *Arabidopsis*). Las concentraciones de inhibidor unido en el eje vertical se normalizan con respecto a los valores de control a fin de tener en cuenta esta pérdida gradual de capacidad de unión. Las gráficas obtenidas son la inversa del tipo representado en la Figura 1. Nuevamente, los datos son consistentes con que $\sim 20\%$ de los sitios de unión de HPPD se intercambien de forma relativamente rápida, ocurriendo primero una fase inicial de unión más rápida. Además, en los controles, el equilibrio de la unión no se establece completamente hasta después de 4-6 h. Los valores de k_{off} se calculan aquí siempre a partir de la velocidad de la reacción de intercambio lenta principal, que se produce después de este período. Tales valores de k_{off} se calculan mediante modelo de ordenador para obtener un mejor ajuste de los datos al progreso computerizado de una reacción de intercambio $EI + J \leftrightarrow EJ + I$ gobernada por cuatro constantes de velocidad independientes y usando valores de k_{on} según se determina independientemente en los ejemplos posteriores. De este modo, por ejemplo, a partir de los datos en la Figura 2, está claro que la estructura II se disocia más rápidamente de HPPD de *Arabidopsis* que lo que lo hace la mesotrióna. Los datos se ajustan mejor a valores de k_{off} , obtenidos en este caso sin la presencia de 25% v/v de glicerol, de $\sim 1,16 \times 10^{-5}$ /s ($k_{on} = 0,8/s/\mu M$) y $3,3 \times 10^{-6}$ /s ($k_{on} = 1,9/s/\mu M$) de HPPD de *Arabidopsis*.

En variantes de los métodos anteriores, las velocidades off se miden en presencia o ausencia de $\sim 25\%$ v/v de glicerol. En presencia de glicerol, los valores obtenidos son generalmente $\sim 1,5-3$ X más lentos que en su ausencia, aunque algunas veces el cambio está fuera de este intervalo o, incluso, en la otra dirección. En la siguiente Tabla 3 se representan ejemplos adicionales de datos obtenidos.

TABLA 3

Constantes de velocidad de disociación (valores de k_{off}) que gobiernan la disociación de diversos inhibidores a partir

de complejos con diversas enzimas de HPPD. Cada línea representa datos de un conjunto experimental individual diferente.

Estructura del inhibidor	HPPD de <i>Arabidopsis</i> . k_{off} (s^{-1}) -glycerol ($k_{off}(s^{-1}) + glicerol$)	HPPD de trigo k_{off} (s^{-1}) -glicerol ($k_{off}(s^{-1}) + glicerol$)	HPPD de <i>P. fluorescens</i> k_{off} (s^{-1}) -glicerol ($k_{off}(s^{-1}) + glicerol$)
I	$3,3 \times 10^{-6}$ ($2,0 \times 10^{-6}$)	$1,0 \times 10^{-3}$ ($3,8 \times 10^{-4}$)	2×10^{-6} (8×10^{-6})
II	$1,16 \times 10^{-5}$ $8,6 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-4}$ $3,5 \times 10^{-4}$	- 5×10^{-5}
III	$1,1 \times 10^{-5}$	$> 2,0 \times 10^{-4}$	
IV	($1,6 \times 10^{-6}$) $8,3 \times 10^{-6}$	($1,66 \times 10^{-5}$) $6,2 \times 10^{-5}$	($4,2 \times 10^{-5}$) $1,8 \times 10^{-4}$
V	$1,25 \times 10^{-6}$ ($2,7 \times 10^{-7}$)	$4,2 \times 10^{-6}$	$> 2 \times 10^{-4}$
VI	$2,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$> 4 \times 10^{-4}$
VII	1×10^{-6}	$8,3 \times 10^{-6}$	$> 3 \times 10^{-4}$

De este modo, se puede observar, *entre otros*, que, según el método, los polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD se criban vía un procedimiento de expresión y ensayo *in vitro* con respecto a velocidades de disociación de enzima de HPPD/inhibidor de HPPD (valores de k_{off}). Se puede observar además a partir del ejemplo anterior que un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo se selecciona como aquel que codifica una HPPD resistente a inhibidores, debido a que se encuentra que la relación (k_{off1}/k_{off3}) del valor de k_{off} para el complejo de la HPPD de trigo expresada con estructura I (un compuesto seleccionado de la Fórmula 1) a aquella para el complejo formado con la estructura IV (un compuesto seleccionado de Fórmula 3) es 22,9 o 16,13, lo que es $>> 2,5$ veces mayor que la relación derivada de forma similar de 1,25 ó 0,38 observada con respecto a la disociación del mismo par de inhibidores de la enzima de control de *Arabidopsis*. Como se puede observar, el cribado y la comparación se podrían haber hecho igualmente también, por ejemplo, con respecto a la estructura II (un compuesto seleccionado de la Fórmula 2) y estructura VII (un compuesto seleccionado de la fórmula 4), con el mismo resultado de que se seleccione un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo. En este caso, la relación k_{off2}/k_{off4} con respecto a HPPD de trigo es 30 ó 42, que nuevamente es $> 2,5$ veces mayor que la relación equivalente de 11 u 8,6 con respecto a la enzima de control de *Arabidopsis*. Como alternativa, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo se criba y se selecciona en base a que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD capaz de formar un complejo en agua a pH 7,0 y a 25°C con un inhibidor de HPPD herbicida, en este caso la estructura I o estructura II, en el que la disociación del mencionado complejo está gobernada por una constante de velocidad (k_{off}) en el intervalo de 4×10^{-5} a $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ (en este caso, $3,8 \times 10^{-4}$ ó $1,0 \times 10^{-3}$ y $2,5 \times 10^{-4}/s$ o $3,5 \times 10^{-4}$, respectivamente), y en el que el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de mesotriona frente a plantas dicotiledóneas (siendo esto cierto de la estructura II como, obviamente, de la propia mesotriona).

Como alternativa, el ejemplo ilustra que, según el método, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas* se selecciona como aquel que codifica una HPPD resistente a inhibidores, debido a que se encuentra que la relación (k_{off4}/k_{off1}) del valor de k_{off} para el complejo de la HPPD de *Pseudomonas* expresada con la estructura VI (un compuesto seleccionado de fórmula 4) a aquella para el complejo formado con la estructura I (un compuesto seleccionado de fórmula 1) es $> 21,7$ o > 100 , lo que es $>> 2,5$ veces mayor que la relación derivada de forma similar de 0,6 observada con respecto a la disociación del mismo par de inhibidores de la enzima de control de *Arabidopsis*. Como se puede ver, el cribado y la comparación se podrían haber hecho igualmente también, por ejemplo, con respecto a la estructura IV (un compuesto seleccionado de fórmula 3) y la estructura I (un compuesto seleccionado de la fórmula 1), con el mismo resultado de que se seleccione un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas*. En este caso, la relación k_{off3}/k_{off1} con respecto a HPPD de *Pseudomonas* es 5,25 ó 90, lo que nuevamente es $> 2,5$ veces mayor que la relación equivalente de 0,8 ó 2,5 con respecto a la enzima de control de *Arabidopsis*. Como alternativa, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas* se criba y se selecciona en base a que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD capaz de formar un complejo en agua a pH 7,0 y a 25°C con un inhibidor de HPPD herbicida,

en este caso la estructura IV o estructura VI, en el que la disociación de dicho complejo está gobernada por una constante de velocidad (k_{off}) en el intervalo de 4×10^{-5} a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (en este caso, $4,2 \times 10^{-5}$ ó $1,8 \times 10^{-4}$ y $>2,0 \times 10^{-4}/\text{s}$, respectivamente), y en el que el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de mesotriona frente a plantas dicotiledóneas (siendo esto cierto tanto de la estructura IV como VI).

5 **Ejemplo 11. Cribado *in vitro* y selección de polinucleótidos que comprende regiones que codifican enzimas de HPPD basado en la medida de los valores relativos y absolutos de las constantes de disociación (valores de Kd) de los complejos enzima/inhibidor.**

10 Se obtienen medidas cualitativas de las diferencias en valores de Kd con respecto a diferentes inhibidores de HPPD preincubando enzima con inhibidor y midiendo después, subsiguientemente, el % de inhibición. Por ejemplo, se aísla HPPD de plántulas de maíz, se purifica parte y se ensaya mediante métodos similares a los descritos por Schulz et al 1993 (FEBS LETS. 318, 162-166) y por Secor (1994) en Plant Physiol. 106, 1429-1433. Los ensayos se realizan durante 30 minutos y se inician con adición de hidroxifenilpiruvato radiomarcado (concentración final $\sim 0,1-0,2 \text{ mM}$) tras un período de 20-30 minutos a lo largo del cual el inhibidor se preincuba con la enzima purificada parcialmente. Se observan los siguientes niveles de inhibición (con respecto a los controles) con las siguientes dosis de herbicida frente a HPPD de maíz.

	mesotriona	sulcotriona	estructura IV
1 nM	<17%		44%
10 nM	44%	8%	78%
100 nM	51%	51%	92%
1000 nM	>75%	83%	93%

Usando el mismo método de ensayo, pero usando HPPD de *Arabidopsis* (obtenida de células de *E. coli* transformadas para expresar la HPPD de *Arabidopsis* y preparadas como un extracto de *E. coli* similar a los métodos descritos por Garcia et al. en Plant Physiol (1999) 119, 1507-1516), se observan los siguientes niveles de inhibición (con respecto a controles) con las siguientes dosis de herbicida frente a HPPD de *Arabidopsis*.

	mesotriona	sulcotriona	estructura IV
1 nM	42%	57%	20%
10 nM	95%	96%	90%
100 nM	100%	100%	95%
1000 nM	100%	100%	95%

20 El experimento indica que la estructura IV es un inhibidor similar o en cierto modo menos potente de HPPD de *Arabidopsis* que mesotriona y sulcotriona (que parecen ~ 10 y 100 veces menos activos frente a la enzima de maíz que la estructura IV). Estos datos demuestran que algunos herbicidas de 1,3-ciclohexanodiona sustituida, tales como sulcotriona y mesotriona, tienen, según al menos una parte de la base de su selectividad observada, una tendencia a inhibir HPPD de plantas monocotiledóneas de forma menos potente que aquella de las plantas dicotiledóneas. A fin de obtener medidas cuantitativas de valores de Kd absolutos y relativos, se usan los métodos como se describen más abajo.

30 Los extractos brutos de cepas de *E. coli* recombinantes que expresan, en un caso, una HPPD de control (de *Arabidopsis*) y, en el otro, una o más secuencias de HPPD de ensayo se preparan como se describe en el ejemplo anterior. El título de sitios activos y actividad enzimática también se definen y se miden como se describe en los ejemplos anteriores. Las velocidades de disociación (velocidades off) de inhibidores seleccionados de la fórmula 1 y/o 2 y/o 3 y/o 4 de los complejos que forman con las enzimas de HPPD de ensayo y de control se miden de forma adecuada como se describe en los ejemplos anteriores. Los valores de Kd se calculan de forma adecuada a partir de la relación k_{off}/k_{on} . En variantes del método, tanto las velocidades on como las velocidades off se miden en presencia de $\sim 25\%$ v/v de glicerol, o ambas se miden en su ausencia. Generalmente, parece que el glicerol ralentiza las velocidades on y off en aproximadamente el mismo grado, y por lo tanto los valores de Kd no parecen variar a menudo con el glicerol. En algunas ocasiones, sin embargo, Kd depende del glicerol. Las constantes de velocidad (valores de k_{on}) que gobiernan la velocidad de unión de los inhibidores a las enzimas de HPPD se miden de forma adecuada de muchas maneras.

40 En primer lugar, los ensayos de HPLC que monitorizan la formación de HGA a diversos tiempos se realizan como describe el ejemplo 9 anterior. Incluso en ausencia de inhibidores añadidos, las curvas de progreso no son lineales, reflejando inactivación progresiva de la enzima en las condiciones de ensayo. A concentraciones crecientes de inhibidor, la curvatura se hace mucho más marcada. Es posible ajustar las curvas tanto de control como inhibida a un decaimiento exponencial simple en la cantidad de enzima activa a partir de la concentración de partida hacia un

nivel final de cero (es decir, una disminución en la concentración de enzima activa gobernada por un procedimiento en el que $E(t) = E(0) \cdot e^{-kt}$. De este modo, las constantes de velocidad aparentes (k') a un intervalo de diferentes concentraciones de inhibidor se derivan restando la constante de velocidad de control ajustada a la curva de progreso en ausencia de inhibidor a partir de la velocidad observada. Entonces se derivan estimaciones de las constantes de velocidad verdaderas (k_{on}) multiplicando las constantes de velocidad aparentes, k' , por $1/(1 + S/K_m)$, en el que S es la concentración de HPP en el ensayo. Dada la necesidad de la resta de la curva y de saber el valor de K_m , éste es probablemente el menos exacto de los diversos métodos para determinar k_{on} . No obstante, es valioso puesto que proporciona un ensayo directo de la suposición, implícita en el cálculo, de que la unión del inhibidor se puede describir adecuadamente mediante un procedimiento de unión simple $E + I \rightleftharpoons EI$ en lugar de un esquema más complejo que implica la formación rápida inicial de complejos de enzima/inhibidor rápidamente disociables que entonces se isomerizan lentamente hacia una forma más fuertemente inhibida. En este último caso, en lugar de la inhibición cero a un tiempo casi cero, se observa un nivel significativo de inhibición inicial (Schloss, J.V. (1989) en "Target sites of Herbicide Action" (Boger, P. y Sandmann G. eds) CRC Press Boca). En la Figura 3 se ilustra un experimento ejemplar.

En la Figura 3, los ensayos que contienen $100 \mu\text{M}$ de sustrato de HPP se inician con la adición de HPPD de trigo a una concentración final de $\sim 19 \text{ nM}$, y se detienen en los tiempos indicados. La curva de progreso superior es sin inhibidor presente, la central con $2,5 \mu\text{M}$, y la inferior con $10 \mu\text{M}$ de estructura II presente; estas curvas se ajustan a una velocidad inicial de $0,35 \mu\text{M/s}$ (es decir, sin inhibición inicial significativa) con constantes de velocidad de decaimiento de primer orden observadas de $0,016$, $0,029$ y $0,06/\text{s}$, respectivamente. Suponiendo un valor de K_m de $10 \mu\text{M}$, se estima por lo tanto que el valor de k_{on} está entre 48000 y $57200 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.

En un método a base de ensayo más directo para medir valores de k_{on} , la enzima de HPPD de ensayo se hace reaccionar con inhibidor durante un intervalo de tiempo, y después la reacción de inhibición se detiene eficazmente mediante adición de una concentración elevada del sustrato HPP (competitivo). Al mismo tiempo que se congela eficazmente la inhibición posterior, esto también comienza el ensayo que indica cuánto ha transcurrido la inhibición durante el período antes de que se añadiese el HPP. El siguiente ejemplo ilustra el método. Se diluye HPPD de trigo a una concentración de $0,465 \mu\text{M}$ en tampón de Bis-Tris-propano 50 mM a $\text{pH } 7,0$ que contiene ascorbato de sodio 25 mM y $3,9 \text{ mg/l}$ de catalasa bovina (Sigma C3155, ~ 50.000 unidades/mg). Se añaden $5 \mu\text{l}$ de HPPD diluida a, alternativamente, $10 \mu\text{l}$ de tampón de BTP 50 mM a $\text{pH } 7,0$ (control), $10 \mu\text{l}$ de tampón de BTP 50 mM a $\text{pH } 7,0$ que contiene $0,5 \mu\text{M}$ de estructura VI, o $10 \mu\text{l}$ de tampón de BTP 50 mM a $\text{pH } 7,0$ que contiene $2,0 \mu\text{M}$ de estructura VI. Las reacciones se dejan correr durante tiempos alternativos de 0 (ensayo "predetenido"), 10 , 30 , 50 ó 70 s a 25°C antes de la adición de $100 \mu\text{l}$ de HPP $150 \mu\text{M}$. Después de la adición de HPP, los ensayos se llevan a cabo durante 40 s antes de detenerlos con la adición de $20 \mu\text{l}$ de ácido perclórico al 25% , y se analizan mediante HPLC. En las "pre-reacciones" en el tiempo entre enzima e inhibidor, la concentración de enzima es $0,155 \mu\text{M}$ la del inhibidor, alternativamente, 0 , $0,33 \mu\text{M}$ y $1,33 \mu\text{M}$. Obsérvese que, debido a que la reacción rápida inicial de los inhibidores con HPPD que da como resultado una pérdida completa de actividad es con sólo la mitad de los sitios finalmente medibles mediante estequiometría de unión, la concentración enzimática relevante aquí para la simulación y para el cálculo de las constantes de velocidad es la mitad de la concentración enzimática según se mide en estudios de unión de titulación a largo plazo como se describe anteriormente. En los ensayos llevados a cabo durante 40 s , la concentración final máxima de inhibidor es $0,174 \mu\text{M}$. Se confirma mediante experimentos tales como el descrito para la Figura 3 que, especialmente en presencia de $130 \mu\text{M}$ de HPP, esto es demasiado poco para provocar cualquier inhibición progresiva detectable durante el transcurso del propio ensayo de 40 s , y, de este modo, se confirma que toda la inhibición observada es debida a la unión del inhibidor a la enzima que se produce durante la pre-reacción en el tiempo en ausencia de sustrato. Los datos obtenidos se ajustan a una reacción modelo $E + I \rightarrow EI$ en la que la "actividad" es equivalente a "enzima activa", y la disminución en la actividad es igual a la disminución en la especie "E" tras la adición de inhibidor. Dados los valores relativamente muy bajos de las velocidades off, se puede suponer que la reacción de inhibición es efectivamente irreversible en las condiciones de reacción (no importa significativamente si la reacción se modela como una reversible y se incluyen en el ajuste las velocidades off bajas conocidas). Los resultados del experimento y el ajuste a los datos se ilustran en la Figura 4. La gráfica superior representa la velocidad de la enzima en activación a $0,33 \mu\text{M}$ de estructura VI; la gráfica inferior, la velocidad a $1,33 \mu\text{M}$. Ambas curvas se ajustan a un valor de la constante de velocidad (k_{on}) de $70.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Las medidas de k_{off} se basan en medidas físicas en vez de a base de ensayos. De forma similar, las velocidades k_{on} también se pueden medir mediante un método físico directo, en este caso el uso de inhibidor radiomarcado y separación física de inhibidor unido a proteína del inhibidor libre. Esto es útil para obtener la correlación entre métodos de unión físicos y a base de ensayos, debido a que, por ejemplo, puede mostrar, especialmente donde una ligación física indica, inicialmente, una ligación de sólo "mitad de los sitios" que esto, no obstante, ocurre contemporáneamente con la pérdida de toda la actividad enzimática. Se encuentra que las velocidades de unión determinadas en base a la medida de la cantidad de inhibidor radiomarcado unido tras diversos tiempos de reacción se correlacionan muy bien con medidas basadas en mediciones a base de ensayos de la velocidad de disminución de la actividad enzimática. Además, también se encuentra que las medidas de k_{off} basadas en estudios de intercambio como se describe aquí en cualquier otra parte producen resultados similares independientemente de si la reacción de unión inicial para formar el complejo de enzima con inhibidor se detiene o no después de 10 s (de manera que la reacción sólo está parcialmente completa) o después de 10 h , confirmando que las velocidades on y

las velocidades off que se miden se refieren a la misma especie de complejo de enzima/inhibidor (en lugar de, por ejemplo, haber un complejo inhibido débil inicial para el cual se miden las velocidades on que se isomeriza lentamente a un complejo de unión más fuerte para el cual se miden las velocidades off), y de este modo los dos valores se pueden combinar válidamente para producir valores de Kd.

5 Un ejemplo ilustrativo de un experimento para medir la velocidad on de la unión de mesotrión a HPPD de *Arabidopsis* es el siguiente. Se montan una serie de tubos de centrifuga eppendorf a 25°C que contienen ¹⁴C mesotrión en tampón de Bis-Tris-propano 50 mM a pH 7,0 que contiene ascorbato de sodio 25 mM, 25% v/v de glicerol y 3,0 mg/l de catalasa bovina (Sigma C3155, ~50.000 unidades/mg). Las reacciones se inician mediante adición de HPPD de *Arabidopsis* de manera que las concentraciones finales de HPPD de *Arabidopsis* y ¹⁴C mesotrión son ~0,30 μM y 0,347 μM, respectivamente, se mezclan y se detiene rápidamente después de diversos intervalos de tiempo mediante adición de un gran exceso de mesotrión sin marcar hasta una concentración final de 170 μM. Después de la detención, las muestras se separan rápidamente en fracciones unidas a proteínas y fracciones libres de proteínas mediante filtración en gel rápida en una columna NAP5 Pharmacia equilibrada en BTP 50 mM a pH 7 que contiene 0,1 M de KCl, y la radioactividad en las dos fracciones se mide mediante recuento de centelleo de líquidos. Los resultados obtenidos y el ajuste de los datos se ilustran en la Figura 5.

Los datos de la Figura 5 se ajustan a un valor de la constante de velocidad k_{on} de $125000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con sólo la mitad de la mesotrión que se une a sitios de *Arabidopsis*. Hay una reacción subsiguiente mucho más lenta, no mostrada (ajústese a una constante de velocidad de $\sim 1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), en la que la mesotrión se une al sitio del inhibidor restante. Se encuentra que las combinaciones de inhibidor/HPPD varían en si sólo la mitad de los sitios están unidos inicialmente o no. En cualquier caso, es solamente la velocidad inicial, como se representa en la Figura 5, la que se toma como el valor de k_{on} . En un experimento similar a la Figura 5 pero en ausencia de glicerol, se encuentra que el valor de k_{on} es $190000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es indistinguible del valor de $\sim 250000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ encontrado usando mediciones a base de ensayos de la velocidad de pérdida de actividad. Experimentos de unión similares indican, por ejemplo, un valor de $100000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la constante de velocidad, k_{on} , que gobierna la asociación de la estructura IV con HPPD de *Arabidopsis* en presencia de glicerol. Los métodos descritos anteriormente para la medición de los valores de k_{on} y k_{off} permiten el cálculo de los valores de Kd, algunos de los cuales se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4

Constante de disociación (valores de Kd) que gobiernan la disociación de diversos inhibidores a partir de complejos con diversas enzimas de HPPD

Estructura del inhibidor	HPPD de <i>Arabidopsis</i> . Kd (pM) (valor obtenido + glicerol)	HPPD de trigo Kd (pM) (valor obtenido + glicerol)	HPPD de <i>P. fluorescens</i> Kd (pM) (valor obtenido + glicerol)
I	14 (21)	7407 (6333)	114 (200)
II	110	6727	2174
III			
IV	46 (17)	885 (596)	12200 (1100)
V	4	11	>1500
VI	25	450	>20000
VII	32	175	

30 De este modo, se puede observar, *entre otros*, que, según el método, polinucleótidos que comprenden una región que codifica una enzima de HPPD se criban vía un procedimiento de expresión y ensayo *in vitro* con respecto a las constantes de disociación de enzima de HPPD/inhibidor de HPPD (valores de Kd). Se puede observar además a partir del ejemplo anterior que un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo se selecciona como aquel que codifica una HPPD resistente a inhibidores debido a que se encuentra que la relación (Kd1/Kd3) del valor de Kd para el complejo de la HPPD de trigo expresada con la estructura I (un compuesto seleccionado de la fórmula 1) a aquella para el complejo formado con la estructura IV (un compuesto seleccionado de la fórmula 3) es 83,7 ó 14,3, que es $\gg 2,5$ veces mayor que la relación derivada de modo similar de 0,3 ó 1,1 observada con respecto a la disociación del mismo par de inhibidores de la enzima de control de *Arabidopsis* en las mismas condiciones. Como se puede observar, el cribado y la comparación se podrían haber hecho igualmente también, por ejemplo, con respecto a la estructura II (un compuesto seleccionado de la fórmula 2) y la estructura VII

(un compuesto seleccionado de la fórmula 4) con el mismo resultado que se selecciona un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo. En este caso, la relación $Kd2/Kd4$ con respecto a HPPD de trigo es 38, que nuevamente es $>2,5$ veces mayor que la relación equivalente de 3,4 con respecto a la enzima de control de *Arabidopsis*. Como alternativa, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de trigo se criba y se selecciona en base a que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD capaz de formar un complejo en agua a pH 7,0 y a 25°C con un inhibidor de HPPD herbicida, en este caso la estructura I o la estructura II, en el que la disociación del mencionado complejo está gobernada por una constante de disociación (Kd) en el intervalo de 1,0 a 30 nM (en este caso, $\sim 6,5-7,5$ nM), y en el que el inhibidor de HPPD tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de mesotriona frente a plantas dicotiledóneas (siendo esto cierto de la estructura II como, obviamente, de la propia mesotriona).

Como alternativa, el ejemplo ilustra que, según el método, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas* se selecciona como aquel que codifica una HPPD resistente a inhibidores debido a que se encuentra la relación ($Kd3/Kd1$) del valor de Kd para el complejo de la HPPD expresada de *Pseudomonas* con la estructura IV (un compuesto seleccionado de la fórmula 3) a aquella para el complejo formado con la estructura I (un compuesto seleccionado de la fórmula 1) es 107, que es $>2,5$ veces mayor que la relación derivada de forma similar de 3,3 observada con respecto a la disociación del mismo par de inhibidores de enzima de control de *Arabidopsis*. Como se puede observar, el cribado y la comparación se podrían haber hecho igualmente también, por ejemplo, con respecto a la estructura V (un compuesto seleccionado de fórmula 4) y la estructura I (un compuesto seleccionado de la fórmula 1) con el mismo resultado que se selecciona un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas*. En este caso, la relación $Kd4/Kd1$ con respecto a HPPD de *Pseudomonas* es $>4,3$, que nuevamente es $>2,5$ veces mayor que la relación equivalente de 0,28 con respecto a la enzima de control de *Arabidopsis*. Como alternativa, un polinucleótido que comprende una región que codifica HPPD de *Pseudomonas* se criba y se selecciona en base a que codifica una enzima de HPPD resistente a inhibidores de HPPD capaz de formar un complejo en agua a pH 7,0 y a 25°C con un inhibidor de HPPD herbicida, en este caso la estructura IV o la estructura VI, en el que la disociación del mencionado complejo está gobernada por una constante de disociación (Kd) en el intervalo de 1 a 30 nM (en este caso, por ejemplo, 12,2 nM), y en el que el inhibidor de HPPD seleccionado tiene al menos un cuarto de la actividad herbicida de mesotriona frente a plantas dicotiledóneas (siendo esto cierto tanto para la estructura IV como VI).

Ejemplo 12. Producción de plantas de haba de soja fértiles morfológicamente normales transformadas de forma estable que comprenden una región de ADN que codifica una enzima de HPPD de Avena sativa y que son resistentes a herbicidas inhibidores de HPPD.

Los polinucleótidos adecuados para la transformación de plantas que comprenden un gen para la expresión de HPPD de Avena sativa se describen, por ejemplo, en los ejemplos anteriores. Opcionalmente, el propio gen de HPPD puede proporcionar los medios de selección e identificación de tejido transgénico. Opcionalmente, el gen para la expresión de HPPD de avena sativa puede estar presente en el polinucleótido al lado de otras secuencias que proporcionan medios adicionales de selección/identificación de tejido transformado, incluyendo, por ejemplo, genes que proporcionan resistencia a canamicina, higromicina, fosfinotricina o glifosato. Como alternativa, estas secuencias marcadoras seleccionables pueden estar presentes en polinucleótidos distintos, y se usa un procedimiento de, por ejemplo, transformación mediante co-bombardeo y co-selección. Como alternativa, en lugar de un gen marcador seleccionable, se puede usar un gen marcador clasificable, tal como GUS, para identificar el tejido transformado. El material vegetal de haba de soja se puede transformar de forma adecuada, y las plantas fértiles se pueden regenerar mediante muchos métodos que serán bien conocidos por el experto. Por ejemplo, las plantas de haba de soja transgénicas morfológicamente normales fértiles se pueden obtener mediante 1) la producción de tejido embriogénico somático de, por ejemplo, cotiledón inmaduro, hipocotilo u otro tejido adecuado, 2) transformación mediante bombardeo con partículas o infección con Agrobacterium, y 3) regeneración de las plantas.

Como alternativa, tales plantas de haba de soja se pueden obtener mediante infección de capullos y/o tejidos florales con Agrobacterium mediante infiltración a vacío y selección de semilla transgénica y/o plantas que se hacen crecer a partir de embriones rescatados. En un ejemplo, como se describe en el documento USP 5024944, se corta tejido de cotiledón a partir de embriones inmaduros de haba de soja, preferiblemente sin el eje embrionario, y se cultiva en medio que contiene hormona, para formar material vegetal embriogénico somático. Este material se transforma usando, por ejemplo, métodos de ADN directos, bombardeo con microproyectiles revestidos con ADN, o infección con Agrobacterium, se cultiva en un medio de selección adecuado y se regenera, opcionalmente también en la presencia continua de agente de selección, en plantas de haba de soja transgénicas fértiles. Los agentes de selección pueden ser antibióticos tales como canamicina, higromicina o herbicidas tales como fosfonotricina o glifosato, o, como alternativa, la selección se puede basar en la expresión de un gen marcador visualizable tal como GUS. Como alternativa, los tejidos diana para la transformación comprenden tejido embriogénico meristémico en lugar de somaclonal, u, opcionalmente, es tejido de flor o que forma una flor.

En un ejemplo, los constructos se transforman en tejidos de haba de soja embriogénicos regenerables usando enfoques de tipo biolístico (por ejemplo Santarem ER, Finer, J.J. (1999) "Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on a semi-solid medium" *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35, 451-455; documentos USP-5.503.998, USP 5830728), o vía infección con

Agrobacterium (por ejemplo documentos USP-5.024.944 USP-5.959.179). Los tejidos de haba de soja embriogénicos regenerables derivan, por ejemplo, de los cotiledones de embriones inmaduros.

El tejido embriogénico proliferativo se puede mantener, por ejemplo, en un medio semisólido. Tal tejido se obtiene, por ejemplo, de la siguiente manera. Se aíslan embriones cigóticos inmaduros que tienen una longitud de 3-4 mm a partir de vainas de por ejemplo *Glycine max* (L.) Merrill, 2-3 semanas después de la formación de la flor. Las vainas se pueden comprobar en busca de la presencia de embriones de la longitud y madurez correctas mediante "retroiluminación". Las vainas se esterilizan entonces. Los embriones inmaduros se eliminan, y se elimina de cada uno el eje. Los embriones inmaduros se colocan entonces en placas en medio de sales MS semisólido "D40-Lite" (0,2% gelrite) a pH 7,0 que contiene vitaminas B5, 3% de sacarosa y 40 mg/l de 2,4-D, durante 3-4 semanas. Para la proliferación de embriones, el material se transfiere entonces a medio de sales MS "D20" a pH 5,7 que contiene vitaminas B5, 3% de sacarosa, 20 mg/l de 2,4-D, y 0,2% de Gelrite. El material con embriones proliferativos globulares verde brillante se seleccionan y se subcultivan cada 2-3 semanas.

Para el bombardeo, se seleccionan 20-25 racimos/placa de tejido (subcultivados 4-5 días antes del bombardeo) y se colocan en el centro de la cápsula que contiene medio D20. El tejido se seca durante 15 min., destapando durante 15 minutos en una campana estéril. Las partículas de oro revestidas en el constructo de ADN (revestidas, por ejemplo, usando métodos descritos en las referencias anteriores) se bombardean dos veces en el tejido en medio D20 usando una cualquiera de un gran número de pistolas comercialmente disponibles. A título de ejemplo adicional, se usa una pistola de partículas PDS1000. Las partículas se pueden preparar y revestir con ADN de manera similar a como se describe por Klein et al 1987, *Nature*, 327, 70-73.

Como alternativa, por ejemplo, 60 mg de partículas de oro o de volframio (~1,0 µm) en un tubo de microcentrífuga se lavan repetidamente en etanol de grado HPLC, y después repetidamente en agua estéril. Las partículas se resuspenden en 1 ml de agua estéril y se dispensan en alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrífuga. Las partículas de oro se almacenan a 4°C, las partículas de volframio a -20°C. Se añaden 3 mg de ADN a cada alícuota de partículas (descongeladas), y los tubos se someten a vórtice a la velocidad máxima. Mientras se mantiene el giro de vórtice casi continuo, se añaden 50 µl de CaCl₂ 2,5M y 20 µl de espermidina 0,1M. Después de 10 minutos de giro de vórtice adicional, las muestras se centrifugan durante 5 segundos en un tubo de microcentrífuga eppendorf, el sobrenadante se extrae, y las partículas se lavan en adiciones sucesivas de etanol de grado HPLC. Las partículas se resuspenden a conciencia en 60 µl de etanol, y después se dispensan en alícuotas de 10 µl sobre la superficie de cada microportador para ser usadas en la pistola de partículas PDS1000. Los componentes de la pistola de partículas PDS1000 están esterilizados en la superficie mediante inmersión en etanol al 70% y secado con aire. Las placas diana preparadas, como se describe anteriormente, con tejido colocado en un disco de ~2,5 cm se colocan 6 cm desde la pantalla de parada. Los discos de ruptura adecuadamente escogidos se usan entonces para el bombardeo.

Una semana después del bombardeo, todos los racimos de tejidos se transfieren a medio D20, tamponado a pH 5,7, que contiene una concentración selectiva adecuada de agente de selección (por ejemplo glifosato entre 0,05 y 10 mM en el caso de que se use glifosato para la selección y que esté presente un gen resistente que codifica EPSPS o GOX en el mismo ADN transformante que el gen que expresa HPPD de *Avena sativa*, o, de otro modo, está presente en ADN co-bombardeado). Después de 3-4 semanas adicionales, todo el tejido se transfiere a medio D20 reciente que contiene una concentración incrementada adecuada de agente de selección. Después de 3-4 semanas adicionales, el tejido vivo se selecciona y se subcultiva cada 3-4 semanas en medio D20 similar que contiene agente de selección. En el caso de que esté presente algún otro marcador seleccionable distinto de glifosato, entonces las selecciones se pueden hacer según sea apropiado (por ejemplo usando concentraciones crecientes de higromicina). Como alternativa, todas las selecciones se realizan usando herbicidas inhibidores de HPPD. De este modo, las secciones de crecimiento se mantienen y, dado suficiente tejido, se pueden analizar mediante PCR para confirmar que son transgénicas para el ADN deseado.

A fin de desarrollar y madurar embriones, se colocan racimos de tejido en medio M6 que comprende sales MS a pH 5,7 que contiene vitaminas B5, 6% de maltosa y 0,2% de gelrite. Se colocan 6-9 racimos en una cápsula alta a 23°C. Después de 3-4 semanas, los embriones se alargan y se pueden separar y transferir a otra ronda de incubación en medio M6. Después de 4-6 semanas, los embriones tienen un color crema y están listos para la disección. 9 de tales embriones de color crema se colocan en una cápsula de Petri seca, se cierra con parafilm y se coloca sobre una estantería durante 2-3 días. Los embriones deberían ser en cierto modo flácidos y no "crujientes-crocantes".

Los embriones disecados se pueden germinar colocando en placas sobre OMS (medio MS libre de regulador de crecimiento). Tras la germinación, que normalmente se produce en una semana, las plantas se transfieren a cajas más grandes y, una vez que hay suficiente formación de raíces y de brotes, por tanto al suelo. Para prevenir la contaminación fúngica, es aconsejable lavar OMS de las raíces con agua destilada. Las plantas se pueden mantener y se pueden hacer crecer en elevada humedad y, inicialmente, bajo luz de 24 horas. Las plantas se pueden hacer crecer hasta que tienen una altura de 2 pies bajo luz de 24 horas, y después se les alienta a florecer y formar vainas a través de un desplazamiento hacia un régimen de luz de 16 horas. Las semillas se recogen, y la progenie se hace crecer, se cruza y se retrocruza a fin de mover los transgenes en los antecedentes deseados de las plantas usando los métodos normales de reproducción vegetal. Las plantas se analizan de forma habitual en busca de la presencia y expresión de transgenes usando los métodos normales de biología molecular, incluyendo

análisis mediante PCR, técnicas Southern, Western, ELISA y ensayo enzimático.

Ejemplo 13. Producción de plantas de maíz fértiles morfológicamente normales transformadas de forma estable que comprenden una región de ADN que codifica una enzima de HPPD de Avena sativa y que son resistentes a herbicidas inhibidores de HPPD.

5 Los constructos para la transformación de maíz tienen preferiblemente la secuencia de ADN que codifica HPPD de Avena sativa bajo el control de expresión operable del promotor de poliubiquitina del maíz, y también incluyen una secuencia terminadora adecuada tal como aquella del extremo 3' del gen Nos. Opcionalmente, esta secuencia de ADN también comprende una secuencia que proporciona un medio adicional de selección/identificación de tejido transformado, incluyendo, por ejemplo, genes que proporcionan resistencia a canamicina, butafenacilo, higromicina, fosfotricina, glifosato, o selección de manosa positiva. Como alternativa, estas secuencias marcadoras seleccionables pueden estar presentes en polinucleótidos distintos, y se usa un procedimiento de, por ejemplo, transformación mediante co-bombardamiento y co-selección. Como alternativa, en lugar de un gen marcador seleccionable, se puede usar un gen marcador clasificable, tal como GUS, para identificar tejido transformado. La secuencia de ADN se puede suministrar a tejido diana de maíz usando muchos métodos que son bien conocidos en la técnica, incluyendo (i) vía colocación en los bordes izquierdo y derecho de una secuencia de T-DNA e infección con *Agrobacterium*, (ii) como un revestimiento de ADN en microproyectiles y bombardamiento, (iii) como un revestimiento sobre hilos de carburo de silicio, o (iv) por métodos de suministro de ADN directos.

Ejemplo 14 Transformación de maíz usando *Agrobacterium*

20 Por ejemplo, ADN que comprende la secuencia de HPPD se liga en una posición en el sitio de clonación situado entre los bordes derecho e izquierdo de T-DNA de pSB 11 restringido de forma similar. La construcción del plásmido pSB 11 y la construcción de su progenitor, pSB21, se describe por Komari et al (1996, Plant J. 10: 165-174). La región de T-DNA que comprende la secuencia de HPPD se integra entonces en el vector superbinario pSB 1 (Saito et al., documento EP 672752 A1) mediante un procedimiento de recombinación homóloga. Para lograr esto, el pSB11 que comprende la secuencia de HPPD se transforma en la cepa HB101 de *E. coli* que entonces, según el método de triple cruce de Ditta et al (1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351), se empareja con una cepa LBA4404 de *Agrobacterium* que posee pSB 1 para crear la cepa transformada de *Agrobacterium*, LBA4404 (pSB 1-HPPD), en la que la presencia del plásmido pSB1-HPPD cointegrado se selecciona en base a resistencia a espectinomicina. La identidad de pSB1-HPPD también se confirma en base al análisis de restricción mediante Sal 1.

30 Como alternativa, usando métodos similares a los descritos anteriormente, un fragmento similar de la secuencia de HPPD se recombina de forma homóloga en una posición entre los bordes derecho e izquierdo del vector superbinario pTOK162 (Fig. 1 en el documento US 5591616) para generar un conjunto similar de plásmidos cointegrados seleccionados en *Agrobacterium* en base a la resistencia combinada a canamicina y espectinomicina.

35 La cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, que tiene un plásmido auxiliar PAL4404 (que tiene una región *vir* completa) está disponible de la American Type Culture Collection (ATCC 37349). Una cepa alternativa útil es *Agrobacterium* EHA101 (1986, Hood et al, J. Bacteriol., 168(3): 1283-1290), que tiene un plásmido auxiliar que tiene la región *vir* de la cepa fuertemente virulenta *Agrobacterium tumefaciens* A281.

40 Las cepas LBA4404(pSB1-HPPD) de *Agrobacterium*, etc., se distribuyen en rayas sobre placas que contienen, por ejemplo, medio sólido "PHI-L", y se cultivan a 28°C en la oscuridad durante 3 a 10 d. El medio PHI-L es como se describe en la página 26 (Ejemplo 4) del documento WO 98/32326. Como alternativa, las *Agrobacterium* se cultivan durante 3-10 d en una placa que contiene medio YP (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar a pH 6,8) como se describe por Ishida et al (1996, Nature Biotechnology, 14, 745-750), o, como alternativa, como se describe por Hei et al en el documento US 5591616 (medio AB (Drlca y Kado, 1974; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3677-3681)), pero, en cada caso, modificado para proporcionar la selección de antibiótico apropiada (por ejemplo, que contiene 50 µg/ml de espectinomicina en el caso de la cepa LBA4404(pSB1-HPPD) de *Agrobacterium*, etc., o que contiene tanto 50 µg/ml de espectinomicina como 50 µg/ml de canamicina en el caso de que se use *Agrobacterium* que contiene un vector superbinario derivado de pTOK 162.

45 Placas de *Agrobacterium* obtenidas como se describe anteriormente se almacenan a 4°C y se usan en un mes de preparación. Las suspensiones de *Agrobacterium* para la transformación de material vegetal se preparan de manera similar a como se describe en el documento US 5591616. (Usando buena práctica microbiológica para evitar contaminación de cultivos asépticos) se retiran asas de 3 X 5 mm de *Agrobacterium* de las placas, se transfieren y se suspenden en 5 ml de medio líquido AA estéril en un tubo Falcon de 14 ml. Como alternativa, las suspensiones de *Agrobacterium* para la transformación de material vegetal se preparan de manera similar a como se describe en el documento WO 98/32326. Se retiran asas de 3 X 5 mm de *Agrobacterium* de las placas, se transfieren y se suspenden en 5 ml de medio básico PHI-A estéril como se describe en el Ejemplo 4 en la página 26 del documento WO 98/32326, o, como alternativa, se suspenden en 5 ml de medio combinado PHI-I estéril, también descrito en el Ejemplo 4 en la página 26 del documento WO 98/32326. Como alternativa, las suspensiones de *Agrobacterium* para la transformación de material vegetal se preparan de manera similar a como se describe por Ishida et al (1996) Nature Biotechnology, 14, 745-750. Sin embargo, la suspensión producida de *Agrobacterium* se somete a vórtice para obtener una suspensión uniforme, y la población celular se ajusta a una cifra entre $0,5 \times 10^9$ y 2×10^9 cfu/ml

(preferiblemente el valor inferior). 1×10^9 cfu/ml corresponde a una OD (1 cm) de $\sim 0,72$ a 550 nm. Las suspensiones de *Agrobacterium* se distribuyen en alícuotas en lotes de 1 ml en tubos de microcentrifuga estériles de 2 ml y se usan tan pronto como sea posible.

5 Las líneas de maíz adecuadas para la transformación incluyen, pero no se restringen a, A188, F1 P3732, F1 (A188 x B73Ht), F1 (B73Ht x A188), F1 (A188 x BMS). Las líneas de maíz adecuadas también incluyen una variedad de A188 x cruzamientos endogámicos (por ejemplo PHJ90 x A188, PHN46 x A188, PHPP8 x A188 en la tabla 8 del documento WO 98/32326), así como líneas endogámicas de élite de diferentes grupos heteróticos (por ejemplo PHN46, PHP28 y PHJ90 en la tabla 9 del documento WO 98/32326).

10 En un ejemplo particular, los embriones inmaduros se producen de maíz "Hi-II". "Hi-II" es un híbrido entre líneas endogámicas (A188 x B73) generado por cruzamientos recíprocos entre el progenitor A de Hi-II y el progenitor B de Hi-II disponibles del Maize Genetic Cooperation Stock Center, University of Illinois en Champaign, Urbana, Illinois). Las semillas, denominadas semillas "Hi-II", obtenidas de estos cruzamientos, se plantan en un invernadero o en un campo. Las plantas Hi-II resultantes se autopolinizan o se polinizan de forma cruzada con plantas hermanas.

15 La transformación de embriones inmaduros de maíz se lleva a cabo poniendo en contacto los embriones inmaduros con las cepas recombinantes adecuadas de *Agrobacterium* descritas anteriormente. Un embrión inmaduro significa el embrión de una semilla inmadura que está en la etapa de madurar tras la polinización. Los embriones inmaduros son un tejido intacto que es capaz de dividirse celularmente para dar lugar a células de callo que entonces se pueden diferenciar para producir los tejidos y órganos de una planta completa. El material preferido para la transformación también incluye los escutelos de embriones que también son capaces de inducir callos

20 desdiferenciados con la capacidad para generar plantas fértiles normales que se han transformado inicialmente. El material preferido para la transformación también incluye así callo derivado de tales embriones o escutelos cigóticos inmaduros desdiferenciados.

25 Los embriones de maíz inmaduros se aíslan asépticamente de mazorcas en desarrollo como se describe por Green y Phillips (1976, Crop. Sci. 15: 417-421) o, como alternativa, mediante los métodos de Neuffer et al (1982, "Growing Maize for genetic purposes" en Maize for biological research, W.F. Sheridan ed., University Press, University of North Dakota, Grand Forks, North Dakota, USA). Por ejemplo, embriones de maíz inmaduros de una longitud entre 1-2 mm (preferiblemente 1-1,2 mm) se aíslan asépticamente de espigas hembras a 9-12 (preferiblemente 11) d tras la polinización usando una espátula estéril. Típicamente, las mazorcas se esterilizan en la superficie con hipoclorito de sodio al 2,63% durante 20 min. antes de lavar con agua desionizada estéril y eliminar asépticamente los

30 embriones inmaduros. Los embriones inmaduros (preferiblemente ~ 100 en número) se dejan caer directamente en un tubo de microcentrifuga de 2 ml que contiene alrededor de 2 ml del mismo medio como se usa para preparar la suspensión de *Agrobacterium* (cuyas alternativas se describen anteriormente). La tapa del tubo se cierra, y los contenidos se mezclan mediante remolino durante unos pocos segundos. El medio se separa por decantación, se añaden 2 ml de medio reciente, y se repite el remolino. Todo el medio se extrae entonces para dejar los embriones

35 inmaduros lavados en la parte inferior del tubo.

Habiendo preparado los embriones de maíz inmaduros, la siguiente fase del procedimiento, la etapa de infección, es ponerlos en contacto con la cepa transformada de *Agrobacterium*. En un ejemplo de este procedimiento, la etapa de infección tiene lugar en un medio líquido que incluye las sales inorgánicas principales y vitaminas del medio N6 (1987, Chu C.C. Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking. P. 43-50) como se describe en el ejemplo

40 4 del documento WO 98/32326. Por ejemplo, como se describe en el documento WO 98/32326, se añade 1,0 ml de suspensión de *Agrobacterium*, preparada como se describe anteriormente en medio PHI-A, a los embriones en el tubo de microcentrifuga, y se somete a remolino durante alrededor de 30 s. Como alternativa, se añade 1,0 ml de suspensión de *Agrobacterium* preparada, también como se describe anteriormente, en medio PHI-I o en medio LS-inf. Después de dejar reposar durante 5 minutos, la suspensión de *Agrobacterium* y los embriones se vertió en una

45 placa de Petri que contiene 1) medio PHI-B o 2) medio PHI-J, o 3) medio LS-AS, según que la suspensión original de *Agrobacterium* se haya preparado en medio PHI-A, medio PHI-I o medio LS-inf, respectivamente. La suspensión de *Agrobacterium* se extrae usando una pipeta Pasteur, los embriones se manipulan de manera que se asientan en el lado del eje hacia abajo sobre el medio, la placa se cierra herméticamente con parafilem y se incuba en la oscuridad a 23-25°C durante 3 días de cocultivo.

50 Tras la preparación de embriones inmaduros, un método alternativo para lograr la transformación es infectarlos durante y después de un período de desdiferenciación como se describe en el documento US 5591616. Los embriones inmaduros se colocan en medio sólido LSD 1.5 que contiene sales inorgánicas LS y vitaminas junto con 100 mg/ml de aminoácidos, 700 mg/l de L-prolina, 100 mg/l de mioinositol, 1,5 mg/ml de 2,4-D, 20 g/l de sacarosa y 2,3 g/l de gelrite. Después de 3 semanas a 25°C, los callos que se originan de los escutelos se recogen en un tubo

55 de microcentrifuga de 2 ml y se sumergen en 1 ml de suspensión de *Agrobacterium* preparada, como se describe anteriormente, en medio AA. Después de reposar durante 5 minutos, los callos resultantes se transfieren a medio sólido 2N6 que contiene acetosiringona 100 μ M y se incuban en la oscuridad a 25 °C durante un período de 3 días de cocultivo.

60 Para el paso de selección, se transfieren aproximadamente 20 embriones a cada una de varias placas nuevas que contienen medio de selección PHI-D (WO 98/32326) o medio de selección LSD 1,5 (US 5591616), selladas con

parafilm e incubadas en la oscuridad a 28 °C. Los medios de selección, ajustados a pH 5,8 con KOH, contienen, dependiendo de la presencia de genes marcadores seleccionables, concentraciones adecuadas de agentes de selección. Por ejemplo, un herbicida inhibidor de HPPD y/o, en caso de que se utilice un gen que codifica una enzima EPSPS resistente, se pueden utilizar concentraciones de entre 0,1 mM y 20 mM de concentraciones de N-fosfometilglicina (Sigma P-9556) de grado para cultivo tisular. En caso de que se utilice un gen de protoporfirinógeno oxidasa entonces se puede utilizar butafenacil como agente de selección. Como alternativa, se diseñan medios de selección para proporcionar una selección positiva con manosa (tecnología Positech™). Como alternativa, en caso de que el material de partida para la selección sean callos que se han obtenido a partir de embriones inmaduros tal como se describe en WO 5591616 entonces tales callos se lavan con agua esterilizada que contiene 250 mg/L de cefotaxima antes del cultivo con medio de selección LSD 1,5 ajustado para proporcionar la selección adecuada.

Los embriones o agrupamientos de células que proliferan a partir de embriones inmaduros se transfieren (si es necesario utilizando un escalpelo estéril) a placas que contienen medio de selección nuevo con 2 intervalos semanales a lo largo de un periodo total de aproximadamente 2 meses. Se hace aumentar el volumen de los callos seleccionados mediante el crecimiento continuo en el mismo medio hasta que el diámetro de los callos seleccionados supera aproximadamente 1,5 cm.

Se regeneran los callos seleccionados en plantas fértiles normales de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos por Duncan *et al.* (1985, Planta, 165, 322-332) por Kamo *et al.* (1985, Bot. Gaz. 146(3), 327-334) y/o por West *et al.* (1993, The Plant Cell, 5, 1361-1369) y/o por Shillito *et al.* (1989) Bio/Technol. 7, 581-587. Opcionalmente el medio de regeneración también se puede ajustar para proporcionar selección de manosa positiva continua u otra selección.

Por ejemplo, los callos seleccionados con un diámetro de 1.5-2 cm se transfieren a medio de regeneración/maduración y se incuban en la oscuridad durante aproximadamente 1-3 semanas para permitir que los embriones somáticos maduren. Un medio de regeneración adecuado es, por ejemplo, medio PHI-E (WO 98/32326) ajustado a pH 5,6 con KOH, el cual también puede, opcionalmente, contener un agente de selección o ajustarse para proporcionar la selección de manosa positiva continua.

Los callos se transfieren entonces a medio de enraizamiento/regeneración y se hacen crecer a 25°C en un calendario de 16 h de luz de día ($270 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad, o bajo iluminación continua ($\sim 250 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) hasta un tiempo de manera que se desarrollan brotes y raíces. Los medios de enraizamiento/regeneración adecuados son medio LSZ (opcionalmente, que incluye o no selección continuada). Como alternativa, los callos seleccionados se transfieren directamente a medio de regeneración LSZ ajustado a pH 5,8 con KOH y que comprende sales inorgánicas principales y minoritarias LS (Linsmaier y Skoog, 1965, Physiol. Plant 18, 100-127), 0,5 mg/ml de ácido nicotínico, 0,5 mg/ml de piridoxina.HCl, 1,0 mg/ml de tiamina.HCl, 700 mg/l de L-prolina, 100 mg/l de mioinositol, 5 mg/ml de zeatina, 20 g/l de sacarosa, 0,5 g/l de MES, 250 mg/l de cefotaxima, 8 g/l de agar purificado (Sigma A-7049), u, opcionalmente, adaptado de forma adecuada para proporcionar selección continuada (por ejemplo, en manosa, o que contiene un herbicida inhibidor de HPPD o glifosato, etc.). Tras un período de incubación en la oscuridad, las placas se someten a iluminación (continua o luz diurna como antes), y se regeneran las plántulas.

Las pequeñas plántulas se transfieren a tubos de vidrio individuales que contienen, por ejemplo, medio PHI-F o medio LSF de fuerza intermedia a pH 5,8 que comprende sales principales LS (Linsmaier y Skoog, 1965, Physiol. Plant 18, 100-127) a fuerza intermedia, sales minoritarias LS, 0,5 mg/ml de ácido nicotínico, 0,5 mg/ml de piridoxina.HCl, 1,0 mg/ml de tiamina.HCl, 100 mg/l de mioinositol, 20 g/l de sacarosa, 0,5 g/l de MES, 8 g/l de agar purificado (Sigma A-7049), y se hacen crecer durante alrededor de otra semana. Las plántulas se transfieren a macetas de suelo se endurecen en una cámara de crecimiento (85% de humedad relativa, 600 ppm de CO₂ y 250 $\text{mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y se hacen crecer hasta la madurez en una mezcla de suelo en un invernadero.

La primera generación (T0) de plantas obtenidas como antes se autofertilizan para obtener semillas de segunda generación (T1). Como alternativa (y preferiblemente), la primera generación de plantas se cruza recíprocamente con otra línea endogámica de maíz no transgénica a fin de obtener semillas de segunda generación. Se espera entonces que la progenie de estos cruces (T1) se segreguen 1:1 para el rasgo de resistencia a herbicida. Las semillas T1 se siembran, se hacen crecer en el invernadero o en el campo, y el nivel de resistencia, querencia de resistencia y segregación de resistencia a herbicidas inhibidores de HPPD seleccionados a lo largo de esta y generaciones subsiguientes se evalúan mediante la observación de la supervivencia vegetal diferencial y la facilidad para presentar síntomas de blanqueo y clorosis tras el tratamiento por pulverización con herbicidas inhibidores de HPPD formulados adecuadamente, tales como la estructura VI, isoxaflutol y la estructura II, a un intervalo de tasas entre 5 y 2000 g/ha y a un intervalo de etapas de crecimiento entre e incluyendo V2 y V8 (o, como alternativa, a los 7-21 días después de la germinación). Estas evaluaciones se realizan con respecto a segregantes susceptibles y con respecto a líneas no transformadas similares de maíz que no comprenden genes de la presente o invenciones similares capaces de conferir resistencia al glifosato. Las líneas transgénicas que muestran resistencia de alto nivel a herbicidas inhibidores de HPPD se seleccionan y nuevamente se autofertilizan o se retrocruzan a una línea congénita no transgénica.

En todas las etapas en el procedimiento anterior, las muestras tisulares de callo transformado, plántulas, material

vegetal T0 y T1 se toman opcionalmente y se analizan mediante 1) Southern y PCR a fin de indicar la presencia, número de copia e integridad de transgenes, 2) análisis Northern (o similar) a fin de medir la expresión de ARNm de transgenes, 3) análisis Western cuantitativo de geles de SDS a fin de medir los niveles de expresión de EPSPS, y 4) la medida de la actividad enzimática de HPPD. Tales métodos de análisis son bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para ensayar la presencia, integridad y expresión del transgén incluyen PCR, análisis Southern, y análisis Western.

Otros métodos de transformación de maíz

En un ejemplo adicional, callo embriogénico friable, derivado de embriones inmaduros de maíz A188 X B73, se inicia en un medio sólido y se transforma biolísticamente. Los métodos adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 98/44140 y US 5550318. El ADN se proporciona como ADN plasmídico circular o, como alternativa, se restringe para proporcionar un fragmento que contiene el casete de expresión de EPSPS lineal, y se usa tras la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa y electroelución. En un análisis adicional, las líneas de maíz, incluyendo, por ejemplo, líneas híbridas que tienen el genotipo A188 X B73, se preparan como suspensiones celulares y se transforman poniendo en contacto la célula con filamentos de carburo de silicio revestidos con ADN usando métodos como se describen esencialmente por Frame et al (1994, Plant J. 6, 941-948).

EJEMPLO 15. Medidas in vitro de HPPD de Avena

Según los métodos descritos en los ejemplos previos, se encuentra que HPPD de Avena tiene un valor de Km para HPP de $-2,5 \mu\text{M}$ y un valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ de $\sim 2 \pm 0,6/\text{s}/\mu\text{mol}$.

A 25°C y en ausencia de glicerol, las constantes de velocidad que gobiernan la disociación de los complejos con I, II, IV y V son similares a las observadas con enzima de trigo, y se estiman como $> \sim 8 \times 10^{-4}/\text{s}$, $\sim 4 \times 10^{-4}/\text{s}$, $\sim 2,5 \times 10^{-5}/\text{s}$ y $< 4 \times 10^{-6}/\text{s}$. Los valores de K_{i} correspondientes se estimaron como $> 11500 \text{ pM}$, 11400 pM , 710 pM y $< 30 \text{ pM}$.

Aunque la solicitud describe particularmente la introducción del gen de Avena en soja, maíz y tabaco, el experto reconocerá que son posibles muchas variaciones de la solicitud específica. Por ejemplo, se puede usar cualquier técnica de transformación vegetal adecuada, tal como microinyección, bombardeo mediado por partículas, transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol, electroporación, sonicación de protoplastos o células vegetales, etc., para introducir el polinucleótido o vector de la descripción en cualquier material vegetal monocotiledóneo o dicotiledóneo, que entonces se puede regenerar mediante técnicas conocidas. En particular, para generar plantas que son resistentes a ácidos sincárpicos (Fórmula 4) se prefiere particularmente la secuencia que codifica HPPD de *Shewenella Colwelliana*.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WARNER, Simon

HAWKES, Timothy

ANDREWS, Christopher

<120> Plantas resistentes a herbicidas

35 <130> 50621/EP-EPT

<150> GB0117393.9

<151> 01-07-2001

<150> GB0029899.2

<151> 07-12-2000

40 <160>41

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1074

<212> ADN

45 <213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 1

ES 2 538 471 T3

atggccgacc aatacgaaaa cccaatgggc ctgatgggct ttgaatttat tgaattcgca 60
 tcgccgactc cgggcaccct ggagccgata ttcgagatca tgggcttcac caaagtcgcg 120
 acccaccgct ccaagaatgt gcacctgtac cgccagggcg agatcaacct gatcctcaac 180
 aaccagcccg acagcctggc ctcgacttc gccgccgaac acggcccttc ggtgtgcggc 240
 atggcgttcc gggtcaaaga ctcgcagcag gcttacaacc gcgcgttgga actgggcgcc 300
 cagccgattc atatcgaaac cggcccgatg gaactcaacc tgccggccat caagggcac 360
 ggcggtgcgc cgctgtacct gatcgaccgc ttcggtgaag gcagctcgat atatgacac 420
 gacttcgtgt acctcgaagg tgtcgaccgc aaccocgtag gcgcgggcct caaggtcac 480
 gaccacctga ccacaacgt gtatcgcggc cgcattggcct actgggcca cttctacgag 540
 aaactgttca acttccgtga agcagcctac ttcgatatca agggcgaata caccggcctt 600
 acgtccaagg ccatgagtgc cccggacggc atgatccgca tcccgctgaa cgaggaatcg 660
 tccaagggcg ccggccagat cgaagagttc ctgatgcagt tcaacggcga gggcatccag 720
 cacgtggcgt tcctcaccga agacctggtc aagacctggg atgcgttgaa gaagatcggc 780
 atgcgcttca tgaccgcgcc gccggacacc tactacgaaa tgctcgaagg ccgctgcc 840
 aaccacggcg agccgggtga ccaactgcag gcgcgcgta ttttgctgga cggctcctcg 900
 atcgagggcg acaagcgcct gctgctgcag atcttctcgg aaacctgat gggcccggtg 960
 ttcttcgaat tcatccagcg caaaggcgac gatggggttg gcgagggcaa cttcaaggcg 1020
 ctgttcgagt cgatcgagcg cgaccaggta cgtcgcggtg tactgaccac cgac 1074

<210> 2

<211> 358

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 2

Met Ala Asp Gln Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Gln Pro Asp
 50 55 60

Ser Leu Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Gln Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Glu Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140

Leu Glu Gly Val Asp Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala
 165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

ES 2 538 471 T3

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Glu Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asn His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285

Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ile Glu Gly Asp
 290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Gly
 325 330 335

Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350

Gly Val Leu Thr Thr Asp
 355

<210> 3

<211> 1323

<212> ADN

5 <213> *Avena sativa*

<400> 3

ES 2 538 471 T3

atgccgccca cccccgccac cgccaccggc gccgccggg ccgccgtgac tccagagcac 60
 gcggcccgga gctttccccc agtgggtccgc gtcaaccgc gcagcgaccg cttccccgtg 120
 ctctcettcc accacgtcga gctctgggtgc gccgacggc cctcagcggc cggacgcttc 180
 tccttcgcgc tcggcgcgcc gctcgccgcc cggtcggacc tctccacggg gaactccgcg 240
 cacgcctccc tcctgctccg ctcgggcgcc ctgcgcttcc tcttcacggc gccctacgcg 300
 ccgcccgccg aggaggccgc cacggccgca gccaccgect ccatcccctc cttctccgcc 360
 gagcccgccg ggacgttcgc cgcgccccac ggcctcgcgg tgcgctccgt cggggtcgcg 420
 gtcgctgacg ccgccgaggc cttecgcgtc agcgtagccg gcggcgctcg cccggccttc 480
 gccccagccg acctcggcc a tggcttcggc ctcgccgagg tcgagctcta cggcgacgtc 540
 gtgctacgct tcgtcagcta cccggacgag acagacctgc cattcctgcc agggttcgag 600
 cgcgtgagca gccccggcgc cgtggactac ggcctcacgc ggttcgacca cgtcgtgggc 660
 aacgtcccgg agatggcccc ggtcatagac tacatgaaag gcttcttggg gttccacgag 720
 ttcgccgagt tcaccgccga ggacgtgggc acgaccgaga gcgggctcaa ctcggtggtg 780
 ctgcaccaaca actccgaggc cgtgctgctg ccgctcaacg agcccgtgca cggcaciaaag 840
 cgacggagcc agatacagac gtacctggag tatcacggcg ggcccggcgt gcagcacatc 900
 gcgctcgcca gcaacgacgt gctcaggacg ctcaaggaga tgcggggcgc cagccccatg 960
 ggcggcttcg agttcatggc gccaccgcag gcgaaatact atgaaggcgt gcggcgcac 1020
 gcaggtgacg tgctctcgga agagcagatc aaggaatgcc aggagctggg ggtgctagtc 1080
 gacagggatg atcaaggggt gttgctccaa atcttcacca agccagtagg ggacaggcca 1140
 acgtttttcc tggagatgat ccaagaatc ggggtgcatgg agaaggacga ggtcgggcaa 1200
 gagtaccaga aggggtggctg cggcgggttt ggcaagggca atttctccga gctgttcaag 1260
 tccattgagg actatgagaa atcccttgag gtcaagcaat ctgtttagc tcagaaatcc 1320
 tag 1323

<210> 4

<211> 440

5 <212> PRT

<213> *Avena sativa*

<400> 4

ES 2 538 471 T3

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

ES 2 538 471 T3

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr
 100 105 110

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala
 115 120 125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140

Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160

Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp
 180 185 190

Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val
 195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220

Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu
 225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu
 245 250 255

Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
 275 280 285

Leu Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 290 295 300

Asn Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met
 305 310 315 320

Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
 325 330 335

Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu

ES 2 538 471 T3

340

345

350

Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380

Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln
 385 390 395 400

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415

Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys
 420 425 430

Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435 440

<210> 5

<211> 433

<212> PRT

5 <213> *Triticum sp.*

<400> 5

ES 2 538 471 T3

Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Arg Pro Arg Arg Met Val Arg Phe Asn Pro Arg
 20 25 30

Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe His His Val Glu Phe Trp Cys
 35 40 45

Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala Leu Gly Ala
 50 55 60

Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Val His Ala
 65 70 75 80

Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Asn Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro
 85 90 95

Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser
 100 105 110

ES 2 538 471 T3

Ala Asp Ala Ala Arg Gln Phe Ser Ala Asp His Gly Leu Ala Val Arg
 115 120 125

Ser Ile Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala Ala Glu Ala Phe Arg Ala Ser
 130 135 140

Val Asp Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ser Pro Val Asp Leu Gly Arg
 145 150 155 160

Gly Phe Gly Phe Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg
 165 170 175

Phe Val Ser His Pro Asp Gly Arg Asp Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe
 180 185 190

Glu Gly Val Ser Asn Pro Asp Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe
 195 200 205

Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Tyr
 210 215 220

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Thr Glu
 225 230 235 240

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Met Val Leu Ala Asn
 245 250 255

Asn Ser Glu Gly Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly Thr
 260 265 270

Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His Gly Gly Ser
 275 280 285

Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu
 290 295 300

Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Asp Phe Leu Pro
 305 310 315 320

Pro Pro Leu Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp
 325 330 335

Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu
 340 345 350

ES 2 538 471 T3

Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
355 360 365

Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly
370 375 380

Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Glu Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys
385 390 395 400

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu
405 410 415

Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala Val Gln Gly
420 425 430

Ser

<210> 6

<211> 1302

<212> ADN

5 <213> *Triticum sp.*

<400> 6

ES 2 538 471 T3

atgccgcccc cccccaccac ccccgagcc accggcgccg cgcggtgac gccggagcac 60
gcggggccc gccgaatggt ccgcttcaac cgcgcagcg accgcttcca cacgctcgcc 120
ttccaccacg tcgagttctg gtgcgcgac gccgcctccg ccgccggccg cttegccttc 180
gcgctcggcg cgcgctcgc cgcaggtcc gacctctcca cggggaactc cgtgcacgcc 240
tcccagctgc tccgctcggg caacctcgc ttctcttca cggcccccta cgccaacggc 300
tgcgacgcg ccaccgcctc cctgccctcc ttctccgcg acgccgcg ccagttctcc 360
gcggaaccac gcctcgggt gcgtccata gcgctgcg cgcggacgc tgccgaggcc 420
ttccgcgcca gcgtcagcg gggcgcgcg ccggccttca gccctgtgga cctcggccgc 480
ggcttcggct tcgcgagggt cgagctctac ggcgacgtcg tgctccgctt cgtcagccac 540
ccggaacgga gggacgtgcc cttcttgccg gggttcaggg gcgtgagcaa ccagacgcc 600
gtggactacg gcctgacgc gttcgaccac gtcgtcggca acgtcccga gcttgcccc 660
gcccgggcct acgtcgcgg gttcacggg ttccacgagt tcgccgagt cacgacggag 720
gacgtgggca cggccgagag cgggctcaac tcgatggtgc tcgccaaca ctcggagggc 780
gtgctgctgc cgtcaacga gccggtgcac ggcaccaagc gccggagcca gatacagacg 840
ttctggaac accacggcg ctcgggcgtg cagcacatcg cggtgccag cagcagctg 900
ctcaggacgc tcaggagat gcgtgcgcg tccgccatgg gcggttcga cttctgcca 960

ccccgctgc cgaagtacta cgaaggcgtg cggcgcatcg ccggggatgt gctctcgag 1020
gcgagatca aggaatgcca ggagctggg gtgctcgtcg acagggacga ccaaggggtg 1080
ttgtacaaa tottcaccaa gccagtaggg gacaggccga cgttgttcct ggagatgatc 1140
cagaggatcg ggtgatgga gaaggacgag agaggggaag agtaccagaa gggtggtgc 1200
ggcgggttcg gcaaaggcaa cttctccgag ctgttcaagt ccattgaaga ttacgagaag 1260
tcccttgaag ccaagcaatc tgctgcagtt cagggatcat ag 1302

<210> 7

<211> 444

<212> ADN

5 <213> *Brachiaria platyphylla*

<400> 7

ES 2 538 471 T3

gagccggtgc wggcaccacaa gcgcccgsagc cagatacaga cgttcctgga gcaccacggc 60
 ggcccsggcg tgcagcacat cgcgctggcc agcgacgayg tgctcaggac gctgcgggag 120
 atgcaggcgc gctccgccat gggcgggttc gagttcatgs yggctccgcm gcccgastac 180
 taygacggyg tsrggcggcg cgccggggac gtgctctcgg aggagcagat targgagtgc 240
 caggaattgg gggtgctggt ggacagggat gaccaggggg tgttgctcca aatcttcacc 300
 aagccagtgg gggacaggcc aacatTTTTc ttagagataa tccaaaggat tgggtgcatg 360
 gagaaggatg agaaggggca ggaataccag aagggtggtc gcggcggctt tggaaagga 420
 aacttctccc agctgwtcaa gwcc 444

<210> 8

<211> 148

<212> PRT

5 <213> *Brachiaria platyphylla*

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (4)..(4)

<223> X es cualquier aminoácido

10 <220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (54)..(54)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

15 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (57)..(57)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

20 <222> (59)..(59)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (65)..(65)

25 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (78)..(78)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

5 <222> (146)..(146)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (148)..(148)

10 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 8

Glu Pro Val Xaa Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asp
20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly
35 40 45

Gly Phe Glu Phe Met Xaa Ala Pro Xaa Pro Xaa Tyr Tyr Asp Gly Val
50 55 60

Xaa Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Xaa Glu Cys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
100 105 110

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln Glu
115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln
130 135 140

Leu Xaa Lys Xaa
145

<210> 9

<211> 444

ES 2 538 471 T3

<212> ADN

<213> *Cenchrus echinatus*

<400> 9

gagccggtgc acggcaccaa ggcgccgagc cagattcaga cgttcctgga ccacaacggc	60
ggccctggcg tgcagcacat cgcgctggcc agcgacgacg tgctcaggac gctgcgggag	120
atgcaagcac gctcygccay gggcggrttc gagttcatgg cgcctccrcc gcccgagtac	180
tacgaaggtg tgaggcggcg cgcgggsgac gtgctctcgg aggctcagat taaagagtgc	240
caggaactgg gtgtgctggt ggacagggat gaccaggggg tgttgctcca aatcttcacc	300
aagccagtgg gggacaggca aacattgttc ttggagataa tccaaaggat tgggtgcatg	360
gagaaggayg agcaggggcg ggaataccag aagggcggtt gcggcggcty tggaaagggg	420
aacttctcsc agctgwtcaa gwcc	444

5 <210> 10

<211> 148

<212> PRT

<213> *Cenchrus echinatus*

<220>

10 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (47)..(47)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

15 <222> (137)..(137)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (146)..(146)

20 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (148)..(148)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

25 <400> 10

ES 2 538 471 T3

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Asp His Asn Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Xaa Gly
 35 40 45

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Pro Pro Glu Tyr Tyr Glu Gly Val
 50 55 60

Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Gln Thr Leu Phe Leu Glu
 100 105 110

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Gln Gly Arg Glu
 115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Xaa Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln
 130 135 140

Leu Xaa Lys Xaa
 145

<210> 11

<211> 444

<212> ADN

5 <213> *Lolium rigidum*

<400> 11

ES 2 538 471 T3

gagccggtgc acggcaccwa gcgccgcagc cagattcaga cctacctcga ctaccacggc 60
 gggcccggcg tgcagcacat cgcgctmgcc agtagcgatg tgctcaggac gctcagggag 120
 atgcgsgcgc gcacgcccat gggcggcttc gagttcatgg cgcgcgcgca ggccaaatac 180
 tacgatggyg tgcggcgyat cgcgggggat gtgctctcgg argagcagat caaggaatgc 240
 caggagctcg gggtgctcgt cgacagggat gaccaagggg tgctgctaca aatcttcacc 300
 aagccagtkg grgacaggcc aacgtttttc ctggagatga tmcaaagaat cgggtgcatg 360
 gagaaggayg aggtcgggca agagtaccag aagggtggct gcggyggggtt tggcaagggc 420
 aacttctccg agctgtwcaw gtcc 444

<210> 12

<211> 148

5 <212> PRT

<213> *Lolium rigidum*

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (7)..(7)

10 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (146)..(147)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

15 <400> 12

gagccggwgc acggcaccaa ggcgccgagc cagatacaga cctacctcga ctaccacggc 60
 gggcccggcg tgcagcacat cgcgctcgcc agcascgacg tgctcaggac gctcagggag 120
 atgcggggcg gcacgcccacat gggcggttc gagttcatgg cgccrccgca ggcsaaatac 180
 tacgawggcg tgcggcgcat cgcrggsgat gtgctctcsg aagagcagat caaggaatgc 240
 caggagctsg ggggtgctcgt cgacagggat gaccaagggg tgytgctmca aatcttcacc 300
 aagccagtgg gagacaggcc aacgtttttc ctsgagatga tacaagaat cgggtgcatg 360
 gagaaggayg aggtcgggca agagtaccag aagggtggtt gcggtggctt tggcaagggm 420
 aacttctccc agctgttcwa gtcc 444

<210> 14

<211> 148

<212> PRT

5 <213> *Festuca arundinacea*

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (32)..(32)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

15 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (62)..(62)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

20 <222> (147)..(147)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 14

Glu Pro Xaa His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 1 5 10 15

ES 2 538 471 T3

Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Xaa
 20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 35 40 45

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Xaa Gly Val
 50 55 60

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 100 105 110

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln
 130 135 140

Leu Phe Xaa Ser
 145

<210> 15

<211> 444

<212> ADN

5 <213> *Setaria faberi*

<400> 15

gagccggtgc tcggcaccat gcgccgcagc cagatacaga cgttcctgga ccacaacggc 60
 ggccccggcg tgcagcacat cgcgctggcc agcgacgacg tgctcaggac gctgcgggag 120
 atgcaagcac gctcagccat gggcggattc gagttcatgg cggctccacc gcccgactat 180
 tacgaaggtg tgaggcggcg cgccggggac gtgctctcgg aggcyagat taaggagtgc 240
 caggaactgg gggtgctggt ggacagggat gaccaggggg tgttgctcca aatcttcacc 300
 aagccagtgg gggacaggca aacattgttc ttggagataa tacaaaggat tgggtgcatg 360
 gagaaggacg agcaggggca ggaataccag aagggtggtt gtggcggttt tggaarggga 420
 aacttctccc agcwgwtcaa gtcc 444

<210> 16

<211> 148

<212> PRT

<213> *Setaria faberi*

5 <220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (139)..(139)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

10 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (145)..(146)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 16

Glu Pro Val Leu Gly Thr Met Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Asp His Asn Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asp
20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly
35 40 45

Gly Phe Glu Phe Met Ala Ala Pro Pro Pro Asp Tyr Tyr Glu Gly Val
50 55 60

Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Gln Thr Leu Phe Leu Glu
100 105 110

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Gln Gly Gln Glu
115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Xaa Gly Asn Phe Ser Gln
130 135 140

Xaa Xaa Lys Ser
145

ES 2 538 471 T3

<210> 17

<211> 444

<212> ADN

<213> *Eleusine indica*

5 <400> 17

gagccggtgc tcggcaccat ggcgcgcagc cagatacaga cgtacctgga ccaccacggt	60
ggccccggcg tgcagcacat ggcgctggcc agcgcgcagc tgctcaggac gctcagggag	120
atgcgggccc gctccgccat gggcggggtc gagttcctcg cgcgcgcgcc gccaaactac	180
tacgacggtg tcaggcggcg cgcgcgggac gtgctctcgg agcagcagat aaaggagtgc	240
caggagctgg gcgtgctggt ggacagggat gaccagggcg tgttgcttca aatcttcacc	300
aagccagtgg gagacaggcc aacctgttc ttggagataa tccaaaggat cgggtgcatg	360
gagaaggatg agcgtgggca agagtaccag aaaggcggct gtggcgggtt ttggcaagggc	420
aacttctccc agctgttcta gtcc	444

<210> 18

<211> 146

<212> PRT

10 <213> *Eleusine indica*

<400> 18

ES 2 538 471 T3

Glu Pro Val Leu Gly Thr Met Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser Asp
20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly
35 40 45

Gly Phe Glu Phe Leu Ala Pro Pro Pro Pro Asn Tyr Tyr Asp Gly Val
50 55 60

Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Gln Gln Ile Lys Glu Cys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu
100 105 110

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu
115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln
130 135 140

Leu Phe
145

<210> 19

<211> 444

5 <212> ADN

<213> *Sorghum sp.*

<400> 19

gagccggtgc acggcaccwa ggcggcagc cagatacaga cgttcttga ccaccacggc 60
 ggccccggcg tgcagcacat ggcgctggcc agcgacgacg tgctcagaac gctgagggag 120
 atgcaggcgc gctcggccat gggcggttc gagttcatgg cgctccggc gcccaatac 180
 tatgacggcg tgaggcggcg cgccggggac gtgctcacgg aggcgcagat taaggagtgt 240
 caggaactag gggtgctggt ggacagagat gaccagggcg tgctgctcca gatcttcacc 300
 aagccagtgg gggacaggcc aacgttgctc ttggagatca.ttcaaaggat cgggtgcatg 360
 gagaaggatg agaaggggca agaataccag aagggtggct gtggcgggtt tggcaagggg 420
 aacttctccc agctgwtcwa gtcc 444

<210> 20

<211> 148

<212> PRT

5 <213> *Sorghum sp.*

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (146)..(147)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 20

Glu Pro Val His Gly Thr Xaa Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly
 35 40 45

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Tyr Asp Gly Val
 50 55 60

15

ES 2 538 471 T3

Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
85 90 95

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu
100 105 110

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln Glu
115 120 125

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln
130 135 140

Leu Xaa Xaa Ser
145

<210> 21

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de HPPD RT2

<400> 21

cgaccagar ctcsacgtgg tggaa 25

10 <210> 22

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador de HPPD RT4

<400> 22

cgacgtgcc gtagagctcg acctc 25

<210> 23

<211> 47

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de DT30

<400> 23
gagagaggat cctcgagttt tttttttt tttttttt tttttt 47
<210> 24
<211> 24
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de HPPD3
<400> 24
10 aayttctccg agctgttcaa gtcc 24
<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Cebador de DTR
<400> 25
aggtttaac gagagaggat cctcgag 27
<210> 26
20 <211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de *Avesa/*
25 <400> 26
acttgacata tgccgccac ccccgccacc gccaccg 37
<210> 27
<211> 39
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de *Avesa*
<400> 27
ttacgtggat ccctaggatt tctgagctac aacagattg 39
35 <210> 28
<211> 23
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de TAHPPDNde
<400> 28
5 aacacaccat atgccgccca ccc 23
<210> 29
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Cebador de TSHPPDSph
<400> 29
aacacacagc atgccgccca cccc 25
<210> 30
15 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de TAHPPDBam
20 <400> 30
ggatcctatg atcctgaac tgcagcagat tg 32
<210> 31
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de HPPD4R
<400> 31
ggactgaac agctssgaga a 21
30 <210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Cebador de HPPD5
<400> 32
gagccgtgc acggcaccaa g 21

<400> 34

Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 35

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Motivo

<400> 35

Pro Pro Thr Pro Thr
 1 5

<210> 36

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Motivo

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

15 <222> (1)..(1)

<223> X es L o V

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (4)..(4)

20 <223> X es cualquier aminoácido

<400> 36

Xaa Ala Ser Xaa Asp Val Leu
 1 5

<210> 37

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Motivo

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (1)..(1)

30 <223> X es R o Q

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (4)..(4)

- <223> X es S o T
 <220>
 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA
 <222> (5)..(5)
- 5 <223> X es P o A
 <400> 37
- Xaa Ala Arg Xaa Xaa Met Gly Gly
 1 5
- <210> 38
 <211> 8
- 10 <212> PRT
 <213> Motivo
 <220>
 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA
 <222> (1)..(1)
- 15 <223> X se selecciona del grupo K; D; E; N
 <220>
 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA
 <222> (4)..(4)
 <223> X es D o E
- 20 <400> 38
- Xaa Tyr Tyr Xaa Gly Val Arg Arg
 1 5
- <210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
- 25 <213> Motivo
 <400> 39
- Gln Glu Leu Gly Val Leu
 1 5
- <210> 40
 <211> 7
- 30 <212> PRT
 <213> Motivo
 <220>
 <221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (1)..(1)

<223> X es H o Y

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

5 <222> (2)..(2)

<223> X es H o N

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (5)..(5)

10 <223> X es P o S

<400> 40

Xaa Xaa Gly Gly Xaa Gly Val
1 5

<210> 41

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Motivo

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (5)..(5)

20 <223> X se selecciona del grupo que consiste en R; V; K; Q

<220>

<221 > CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (7)..(7)

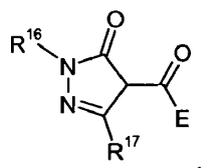
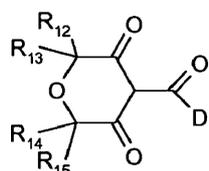
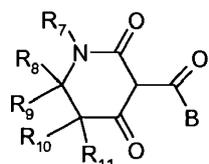
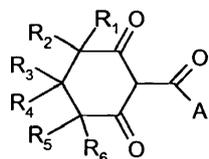
<223> X se selecciona del grupo que consiste en Q; R; E

25 <400> 41

Glu Lys Asp Glu Xaa Gly Xaa Glu
1 5

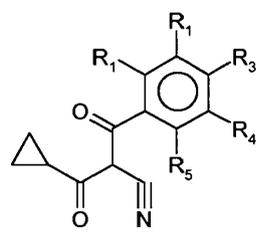
REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un polinucleótido que codifica una enzima de HPPD resistente a herbicidas tricetónicos que comprende cribar una población de secuencias que codifican una enzima de HPPD y seleccionar como secuencias que codifican una enzima de HPPD resistente a tricetonas aquellas secuencias que codifican una enzima que, en comparación con una enzima de HPPD de control tiene al menos una resistencia incrementada 2,5 o, preferiblemente, cuatro veces a herbicidas tricetónicos seleccionados entre herbicidas que tienen una de las siguientes fórmulas



y sus sales agroquímicamente aceptables, donde los grupos Ar A, B, D y E se escogen independientemente entre fenilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido, donde los sustituyentes opcionales para los grupos A, B, D y E incluyen alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄, donde R₁ o R₂, o ambos, son H y tanto R₃ como R₄ son H y R₅ o R₆, o ambos, son H, donde tanto R₈ como R₉ son H y R₁₀ o R₁₁, o ambos, son H, donde R₁₂ o R₁₃, o ambos, son H y R₁₄ o R₁₅, o ambos, son H y donde R₁-R₁₇ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄;

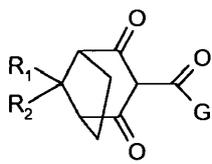
en comparación con herbicidas seleccionados del grupo de herbicidas que tienen la fórmula



y sus sales agronómicamente aceptables, donde R₁-R₆ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄,

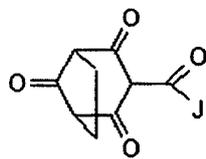
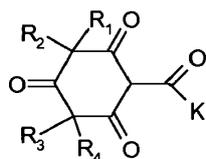
o es al menos 2,5 o preferiblemente 4 veces más resistente a herbicidas tricetónicos seleccionados del grupo de herbicidas que tienen la fórmula

30



- 5 y sus sales agronómicamente aceptables, donde el grupo G se escoge entre fenilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente y donde R₁-R₂ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄,

en comparación con herbicidas que tienen una de las siguientes fórmulas



- 10 y sus sales agronómicamente aceptables, donde los grupos Ar K y J se escogen independientemente entre fenilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente, donde los sustituyentes opcionales para los grupos K y J incluyen alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄, donde R₁-R₄ se seleccionan cada uno individualmente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, OH, SH, CN, -NH₂, -NHCOR, -CONHR, -COR, -SR, SOR, -SO₂R, NHR-SO₂R, -CO₂R, -NO₂, CF₃, -SF₅, OR y CO₂H, en los que R = alquilo de C₁-C₆ o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo o alcoxi C₁-C₄;

- 20 donde dicha enzima de HPPD de control se obtiene a partir de una dicotiledónea, particularmente de *Arabidopsis* o del tabaco;

donde la resistencia de las enzimas de HPPD a herbicidas se determina midiendo la velocidad de disociación del complejo enzima/herbicida, y;

donde la enzima de HPPD codificada por el polinucleótido seleccionado tiene un valor de k_{cat}/K_m de hidroxifenilpiruvato en el intervalo de 0,1 a 5 s⁻¹μM⁻¹ a pH 7,0 y 25 °C.

25

Figura 1

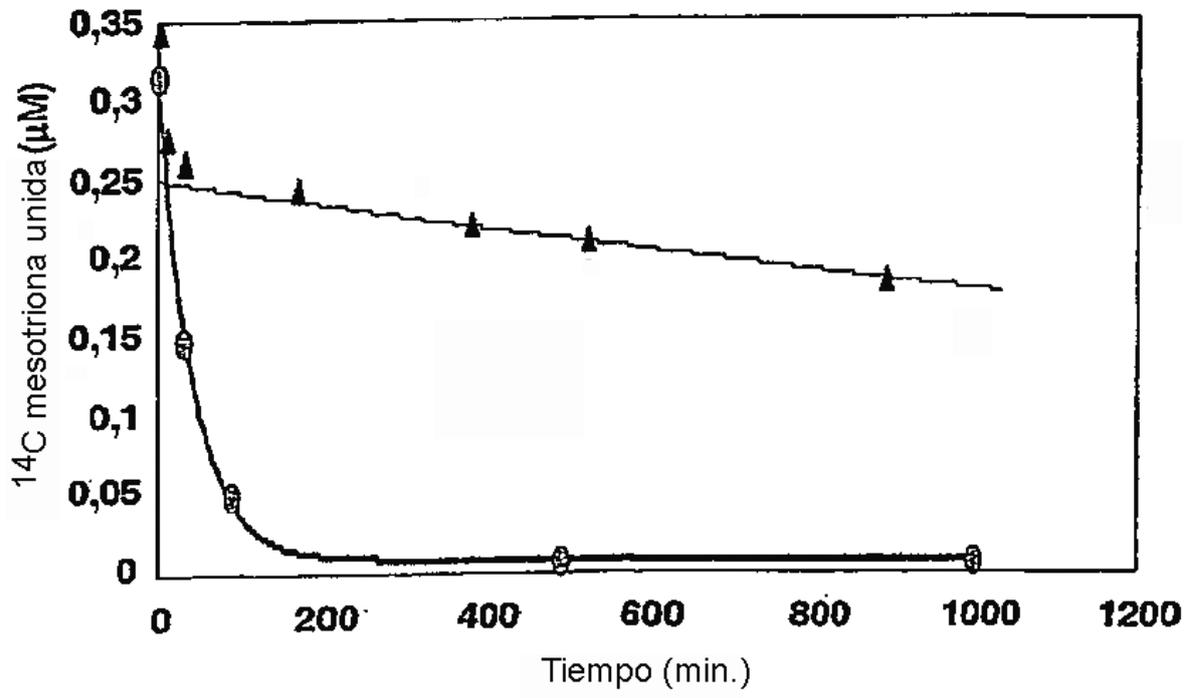


Figura 2

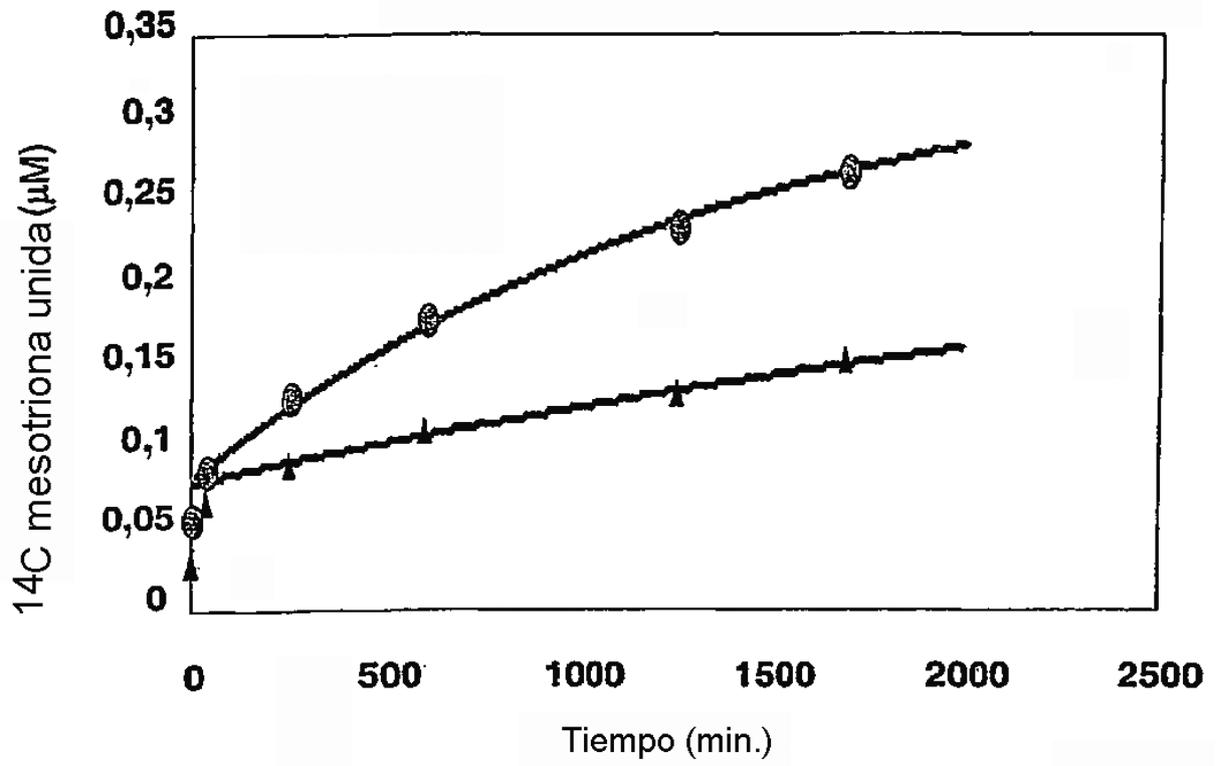


Figura 3

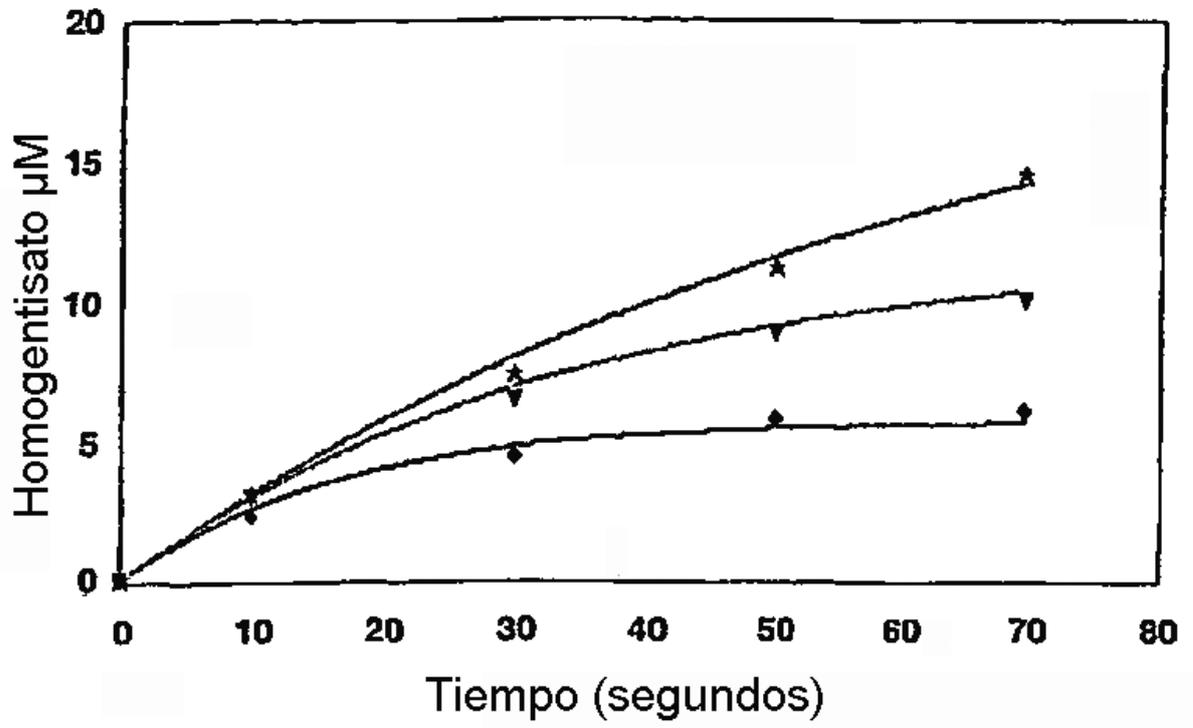


Figura 4

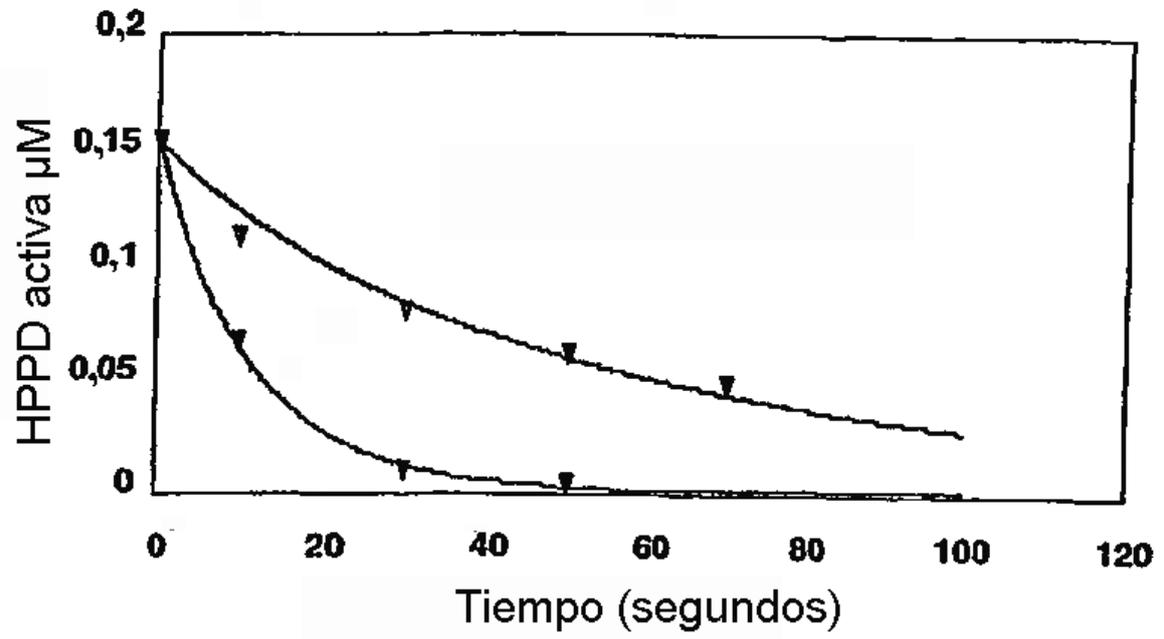


Figura 5

