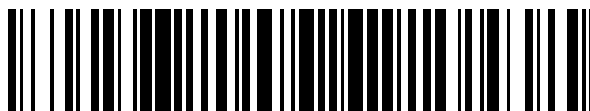


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 918**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2010** E 10190629 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016** EP 2453012

54 Título: **Variantes de HPPD y procedimientos de uso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2016**

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE AG (100.0%)**  
**Alfred-Nobel-Strasse 50**  
**40789 Monheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**LANGE, GUDRUN, DR.;**  
**POREE, FABIEN, DR.;**  
**LABER, BERND, DR.;**  
**FREIGANG, JÖRG, DR. y**  
**SCHULZ, ARNO, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 588 918 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

Variantes de HPPD y procedimientos de uso

La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de HPPD mutada, en la que dicha proteína de HPPD mutada tiene actividad de HPPD, en la que en dicha proteína de HPPD mutada un aminoácido ha sido reemplazado de modo tal que la secuencia de aminoácidos resultante comprende al menos un aminoácido seleccionado de ciertos aminoácidos en una posición específica importante por conferir una mayor tolerancia al inhibidor de HPPD. La presente invención también se refiere a proteínas codificadas por el ácido nucleico de la invención, a genes quiméricos, células vegetales que comprenden el ácido nucleico de la invención operativamente ligado a un promotor que se puede expresar en plantas y opcionalmente una región de terminación de la transcripción y poliadenilación, plantas que consisten esencialmente en las células vegetales de la invención y procedimientos para obtener plantas transgénicas.

En esta memoria descriptiva, se cita una cantidad de documentos que incluyen solicitudes de patentes y manuales de fabricantes. La divulgación de estos documentos, aunque no se consideren relevantes para la patentabilidad de esta invención, se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Más específicamente, todos los documentos mencionados se incorporan por referencia como si cada documento individual se indicara específica e individualmente como incorporado por referencia.

Las proteínas de HPPD (hidroxifenilpiruvato dioxigenasa) son enzimas que catalizan la reacción en la que se transforma el para-hidroxifenilpiruvato (abreviado en el presente documento como HPP), un producto de degradación de la tirosina, en homogentisato (abreviado en el presente documento como HG), el precursor en plantas de tocoferol y plastoquinona (Crouch N.P. et al. (1997) Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, Fritze et al., (2004), Plant Physiology 134: 1388-1400). El tocoferol actúa como un antioxidante asociado a membrana.

La plastoquinona actúa primeramente como un vehículo de electrones entre PSII y el complejo de citocromo b6/f y secundariamente, es un cofactor redox para la fitoeno desaturasa, que está implicada en la biosíntesis de los carotenoides.

Hasta ahora, más de 700 secuencias de ácidos nucleicos de diversos organismos presentes en la base de datos NCBI se anotaron como codificadores de una proteína teórica que tiene un dominio de HPPD. Pero para la mayoría de estas secuencias, no se probó que la proteína tuviera una actividad enzimática de HPPD ya sea en un ensayo in vitro o en un enfoque in planta, ni que tal proteína de HPPD pudiera conferir una tolerancia a herbicidas para los herbicidas inhibidores de HPPD cuando se expresa en una planta. Varias proteínas de HPPD y sus secuencias primarias fueron descritas en el estado de la técnica, en particular las HPPD de bacterias tales como *Pseudomonas* (Rüetschi et al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), de plantas tales como *Arabidopsis* (WO 96/38567, Genebank AF047834), zanahoria (WO 96/38567, Genebank 87257), *Avena sativa* (WO 02/046387), trigo (WO 02/046387), *Brachiaria platyphylla* (WO 02/046387), *Cenchrus echinatus* (WO 02/046387), *Lolium rigidum* (WO 02/046387), *Festuca arundinacea* (WO 02/046387), *Setaria faberi* (WO 02/046387), *Eleusine indica* (WO 02/046387), *Sorghum* (WO 02/046387), *Coccicoides* (Genebank COITRP), *Coptis japonica* (WO 06/132270), *Chlamydomonas reinhardtii* (ES 2275365), o de mamíferos tales como ratón o cerdo.

La mayoría de las plantas sintetizan tirosina por medio de arrogenato (Abou-Zeid et al. (1995), Applied Env Microb 41: 1298-1302; Bonner et al., (1995), Plant Cells Physiol. 36, 1013-1022; Byng et al., (1981), Phytochemistry 6: 1289-1292; Connely y Conn (1986), Z. Naturforsch 41c: 69-78; Gaines et al., (1982), Plants 156: 233-240). En estas plantas, el HPP se deriva solo de la degradación de tirosina. Por otro lado, en organismos tales como la levadura *Sacharomyces cerevisiae* o la bacteria *Escherichia coli*, el HPP es un precursor de tirosina y se sintetiza por la acción de una enzima, pnenato deshidrogenasa (de ahora en adelante referida como PDH), que convierte pnenato en HPP (Lingens et al., (1967) European J. Biochem 1: 363-374; Sampathkumar y Morrisson (1982), Bioch Biophys Acta 701: 204-211). En estos organismos en consecuencia la producción de HPP está conectada directamente con la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (vía de shikimato) y no con la vía de degradación de la tirosina.

La inhibición de HPPD lleva a desacoplamiento de la fotosíntesis, deficiencia en pigmentos recolectores de luz accesorios y lo más importante, a la destrucción de la clorofila por radiación UV y especies reactivas de oxígeno (blanqueo) debido a la falta de fotoprotección normalmente proporcionada por los carotenoides (Norris et al. (1995), Plant Cell 7: 2139-2149). El blanqueo de los tejidos fotosintéticamente activos lleva a la inhibición del crecimiento y la muerte de las plantas.

En la actualidad, los herbicidas inhibidores de HPPD más disponibles comercialmente pertenecen a una de estas cuatro familias químicas:

1) las tricetonas, por ejemplo sulcotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)benzoil]-1,3-ciclohexandiona], mesotriona [es decir 2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexandiona]; tembotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)-3-[(2,2,2-trifluoroetoxi)metil]benzoil]-1,3-ciclohexandiona]; tefuriltriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)-3-[[tetrahydro-2-furanil]metoxi]metil]benzoil]-1,3-ciclohexandiona]; biciclopirona [es decir 4-hidroxi-3-[[2-[(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona]; benzobiciclona [es decir 3-

(2-cloro-4-mesilbenzoil)-2-feniltiobiciclo[3.2.1]oct-2-en-4-ona]

2) los dicetonitrilos, por ejemplo 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)-propan-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonyl)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propan-1,3-diona;

3) los isoxazoles, por ejemplo isoxaflutol [es decir (5-ciclopropil-4-isoxazolil)[2-(metilsulfonyl)-4-(trifluorometil)fenil]metanona]. En plantas, el isoxaflutol se metaboliza rápidamente en DKN, un compuesto de dicetonitrilo que exhibe la propiedad de inhibidor de HPPD; y

4) los pirazolinatos, por ejemplo topamezona [es decir [3-(4,5-dihidro-3-isoxazolil)-2-metil-4-(metilsulfonyl)fenil](5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona] y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il(2-mesil-4-trifluorometilfenil)metanona); pirazofeno [2-[4-(2,4-diclorobenzoil)-1,3-dimetilpirazol-5-iloxi]acetofenona].

Estos herbicidas inhibidores de HPPD se pueden usar contra pasto y/o malas hierbas de hoja ancha en plantas de cultivo que muestran tolerancia metabólica, como maíz (*Zea mays*) en las que se degradan rápidamente (Schulz et al., (1993). *FEBS letters*, 318, 162-166; Mitchell et al., (2001) *Pest Management Science*, vol. 57, 120-128; García et al., (2000) *Biochem.*, 39, 7501-7507; Pallett et al., (2001) *Pest Management Science*, vol. 57, 133-142). A fin de extender el alcance de estos herbicidas inhibidores de HPPD, se han desarrollado varios esfuerzos a fin de conferirles a las plantas, en particular plantas sin o con una tolerancia metabólica de bajo rendimiento, un nivel de tolerancia aceptable en condiciones de campo agronómicas.

Además del intento de desviar la protección mediada por HPPD del homogentisato (documento US 6.812.010), se realizó una sobreexpresión de la enzima sensible tal como para producir cantidades de la enzima objetivo en la planta que son suficientes en relación con el herbicida (documento WO 96/38567). La sobreexpresión de HPPD dio como resultado una mejor tolerancia pre-germinación al derivado de dicetonitrilo (DKN) de isoxaflutol (IFT), pero la tolerancia no era suficiente para la tolerancia al tratamiento pre-germinación (Matringe et al., (2005), *Pest Management Science* 61: 269-276).

En el documento WO 04/024928, los autores de la invención han tratado de aumentar la biosíntesis de la prenilquinona (por ejemplo, síntesis de plastoquinonas, tocoferoles) en las células vegetales aumentando el flujo del precursor de HPP en las células de estas plantas. Esto se ha realizado conectando la síntesis de dicho precursor con la vía de "shikimato" por sobreexpresión de una enzima de PDH. También se ha observado que la transformación de plantas con un gen que codifica una enzima de PDH hace posible aumentar la tolerancia de dichas plantas a los inhibidores de HPPD.

Otra estrategia fue mutar la HPPD a fin de obtener una enzima objetivo que, mientras que retiene sus propiedades de catalizar la transformación de HPP en homogentisato, es menos sensible a los inhibidores de HPPD que la HPPD nativa antes de la mutación.

Esta estrategia se ha aplicado exitosamente para la producción de plantas tolerantes a 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)-propan-1,3-diona y a 2-ciano-1-[4-(metilsulfonyl)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propan-1,3-diona (documento EP496630), dos herbicidas inhibidores de HPPD que pertenecen a la familia de los dicetonitrilos (documento WO 99/24585). Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Ile y más en particular Gly336Trp (las posiciones del aminoácido mutado se indican con referencia a la HPPD de *Pseudomonas*) se identificaron como mutaciones que son responsables de una mayor tolerancia al tratamiento de pre-germinación con estos herbicidas de dicetonitrilo sin causar una alteración de la actividad de la enzima.

Más recientemente, la introducción de un gen HPPD de *Pseudomonas* en el genoma de plástido de tabaco y soja se mostró más efectiva que la transformación nuclear, confiriendo incluso tolerancia a la aplicación post-germinación de isoxaflutol (Dufourmantel et al., 2007, *Plant Biotechnol J* 5(1):118-33).

En la solicitud de patente WO 2009/144079, se describe una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa mutada (HPPD) en la posición 336 de la proteína de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* y su uso para obtener plantas que sean tolerantes a herbicidas del inhibidor de HPPD.

En el documento WO 2002/046387, se han identificado varios dominios de las proteínas de HPPD originados de plantas que pueden ser relevantes para conferir tolerancia a diversos herbicidas inhibidores de HPPD pero ni los datos in planta ni bioquímicos han estado mostrando confirmar el impacto de las funciones del dominio tal como se describen.

En el documento WO 2008/150473, la combinación de dos mecanismos distintos de tolerancia –un gen modificado de *Avena sativa* que codifica una enzima de HPPD mutante y una CYP450 monooxigenasa de maíz (gen nsf1)– se ejemplificó a fin de obtener una mayor tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD, pero no se divulgaron datos que demuestren los efectos sinérgicos a base de la combinación de ambas proteínas.

El documento US 2010/0197503 sugiere una cantidad de mutaciones en diferentes posiciones dentro o cerca del sitio activo de la HPPD de *Avena sativa* y examinó alguna de ellas respecto de su inhibición por determinados inhibidores de HPPD como sulcotriona in vitro e in planta.

A pesar de estos éxitos obtenidos para el desarrollo de plantas que muestran tolerancia a varios herbicidas inhibidores de HPPD descritos con anterioridad, aún sigue siendo necesario desarrollar y/o mejorar la tolerancia de plantas a inhibidores de HPPD más nuevos o diferentes, en particular inhibidores de HPPD que pertenecen a las clases de las tricetonas (por ejemplo, sulcotriona, mesotriona, tembotriona, benzobiciclona y biciclopirona) y los pirazolinatos (por ejemplo, topramezona y pirasulfotol).

Conforme a ello, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de HPPD mutada, en la que dicha proteína de HPPD mutada tiene actividad de HPPD, en la que en dicha proteína de HPPD mutada un aminoácido ha sido reemplazado de modo tal que la secuencia de aminoácidos resultante comprende al menos un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Tyr, Ile, Leu o Met en una posición en la proteína HPPD que corresponde a la posición 280 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

A menos que se indique otra cosa, las definiciones específicas o características específicas de determinadas formas de realización se pueden introducir en cualquier otra forma de realización de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, un “ácido nucleico” se entiende como una secuencia de nucleótidos que puede ser del tipo ADN o ARN, con preferencia, del tipo ADN y en particular bicatenario, ya sea de origen natural o de origen sintético, en particular una secuencia de ADN en la que los codones que codifican la HPPD de acuerdo con la invención se han optimizado de acuerdo con el organismo huésped en el que se ha de expresar (por ejemplo, sustituyendo los codones con aquellos codones de mayor preferencia o de máxima preferencia en tablas de uso de codones de tal organismo huésped o del grupo al que dicho organismo huésped pertenece, en comparación con el organismo original o fuente).

Un “ácido nucleico aislado/ADN/proteína”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a un ácido nucleico/ADN/proteína que no se da en la naturaleza (tal como un ADN artificial o sintético con una secuencia de nucleótidos diferentes que el ADN que se da en la naturaleza, o una proteína modificada) o que ya no está en el ambiente natural en el que estaba originalmente presente, por ejemplo una secuencia que codifica el ADN asociada con un elemento de regulación heterólogo (tal como una secuencia codificadora bacteriana operativamente ligada a un promotor expresable en plantas) en un gen quimérico, un ADN transferido a otra célula huésped, tal como una célula de una planta transgénica.

La terminología relacionada con ácido nucleico o proteína “que comprende” determinada secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, tal como se usa en todo el texto, se refiere a un ácido nucleico o proteína que incluye o contiene al menos la secuencia descrita, de modo que se pueda incluir otra secuencia de nucleótidos o aminoácidos en el extremo 5' (o N-terminal) y/o 3' (o C-terminal), por ejemplo (la secuencia de nucleótidos de) una proteína marcadora seleccionable, (la secuencia de nucleótidos de) un péptido de tránsito y/o una secuencia líder 5' o una secuencia remolque 3'. De modo similar, se debe entender que el uso del término “comprender”, “que comprende” o “comprende” a lo largo de todo el texto y las reivindicaciones de esta solicitud implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. La expresión “que comprende” también incluye la expresión “que consiste en”.

De acuerdo con la presente invención, la expresión “proteína de HPPD mutada” que se usa indistintamente con la expresión “proteína de HPPD mutante” denota una proteína de HPPD que tiene una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. A diferencia término “aislado” referido con anterioridad, el término “mutado” no se puede referir al ambiente de la secuencia (aminoacídica o proteica) en cuestión, como aislada de su ambiente natural o acoplada a una secuencia heteróloga (aminoacídica o proteica), sino que solo se refiere a la secuencia de aminoácidos que define dicha proteína de HPPD mutada que no se puede hallar en lugar alguno de la naturaleza sino que surgió de una secuencia de aminoácidos no mutada o inicial de tipo silvestre. En otras palabras, al llegar al ácido nucleico de la presente invención que codifica una proteína de HPPD mutada, se debe tomar una secuencia de aminoácidos inicial de una proteína existente de forma natural y debe ser modificada por el hombre reemplazando al menos un aminoácido según se define en la presente solicitud.

La secuencia que codifica una HPPD no mutada original que será mutada de acuerdo con la invención puede tener cualquier origen. En particular, puede ser de origen bacteriano, vegetal o animal. Los ejemplos ventajosos que se pueden citar son bacterias de tipo *Pseudomonas* sp., por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*, o, de otro modo, cianobacterias del género *Synechocystis*. La secuencia también puede ser de origen vegetal, en particular derivada de plantas dicotiledóneas, plantas umbelíferas o, si no, plantas monocotiledóneas. Los ejemplos ventajosos que se pueden citar son plantas tales como tabaco, *Arabidopsis*, *Daucus carotta*, *Zea mays* (maíz), trigo, cebada, *Avena sativa*, trigo, *Brachiaria platyphylla*, *Cenchrus echinatus*, *Lolium rigidum*, *Festuca arundinacea*, *Setaria faberi*, *Eleusine indica* y *Sorghum*. Las secuencias codificantes y el modo de aislarlas y clonaras, se describen en las referencias previamente citadas. En una forma de realización particular de la invención, la HPPD es de origen bacteriano, en particular de *Pseudomonas* sp., más en particular de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus* sp., *Blepharisma japonicum*, *Synechococcus* sp., *Picrophilus torridus*, *Kordia algicida* o de un origen vegetal, en particular de *Arabidopsis thaliana* o *Avena sativa*. La HPPD para preparar la(s) mutación/mutaciones para los fines de la invención puede ser cualquier HPPD natural o cualquiera de sus fragmentos activos o cualquiera de sus

variantes en los que algunos aminoácidos (1 a 10 aminoácidos) se han reemplazado, añadido o suprimido para fines de clonación, para preparar una fusión de péptido de tránsito y similares, que retiene la actividad de HPPD, es decir la propiedad de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato en homogentisato.

5 La proteína de HPPD mutada de acuerdo con la presente invención tiene actividad de HPPD, es decir, tal como se describió con anterioridad, cataliza la reacción en la que el para-hidroxifenilpiruvato se transforma en homogentisato. Con preferencia, la actividad catalítica de la HPPD mutada aislada de la presente invención, cuando se ensaya in vitro, no difiere de la de la proteína de HPPD de referencia no mutada en más del 70 %, con preferencia, más del 50 %, con mayor preferencia, más del 30 %, incluso con mayor preferencia, más del 20 % cuando se ensaya en idénticas condiciones y en ausencia de los herbicidas inhibidores de HPPD descritos con anterioridad. La actividad catalítica de una enzima de HPPD se puede definir por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. El documento WO 2009/144079 describe diversos procedimientos de cribado apropiados.

Las cribas iniciales se pueden llevar a cabo con el ácido nucleico que codifica la proteína de HPPD mutada de la invención que se expresa en las bacterias.

#### Ensayo de cribado colorimétrico para enzimas de HPPD activas:

15 Un medio de cultivo de tipo caldo de YT con agarosa al 1 %, L-tirosina 5 mM y succinato 42 mM, que contiene el agente de selección para el vector pSE420 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), se vierte en placas de pocillos profundos. El cultivo de *E. coli* en la fase de crecimiento exponencial que contiene el vector pSE420-HPPDx (HPPDx implica cualquier gen que codifica una enzima/proteína de HPPD teórica) se aplica a cada pocillo. Después de 16 horas a 37 °C, los pocillos que no contienen el medio de cultivo, aquellos que se sembraron con un cultivo de *E. coli* con el vector pSE420 vacío son transparentes, aquellos que se sembraron con un cultivo de *E. coli* conteniendo un vector pSE420-HPPDx que contiene un gen que codifica una HPPD inactiva son transparentes, si bien los pocillos sembradas con un cultivo de *E. coli* con el vector pSE420-HPPDx que codifica una HPPD activa son marrones. Previamente se demostró que este ensayo refleja la actividad de HPPD, no importa cuál sea el origen de esta actividad y permite la identificación de las actividades de HPPD (documento US 6.768.044), es decir, a un nivel cualitativo.

Se pueden llevar a cabo otros cribados y más elaborados en células vegetales o plantas que expresan la proteína de HPPD mutada de la invención.

30 Los mismos cribados también se pueden usar cuando se examina si una proteína de HPPD mutada es capaz de modular, tal como reducir o aumentar, la tolerancia de una planta a al menos un inhibidor de herbicida de HPPD que se mencionará luego más adelante, con la diferencia de que al menos uno de tales inhibidores de HPPD se añade. Los ejemplos de inhibidores de HPPD para usar en aquellos cribados incluyen tembotriona, mesotriona, pirasulfotol, biciclopirona, topramezona y sulcotriona. Un procedimiento de cribado que es simple de implementar consiste en determinar la dosis de inhibidor de HPPD que inhibe completamente la HPPD no mutada original y que es letal para las células que expresan esta HPPD no mutada y someter las células mutadas a esta dosis predeterminada y después de ello, aislar las células mutadas que han resistido esta dosis letal y luego aislar y clonar el gen que codifica la HPPD mutada.

35 De modo alternativo, a nivel cuantitativo como  $pl_{50}$  (el valor  $pl_{50}$  implica el valor log de la concentración de inhibidor necesario para inhibir el 50 % de la actividad enzimática en concentración molar) se pueden obtener datos empleando el polipéptido de HPPD aislado y purificado, es decir, el polipéptido de HPPD mutado frente al no mutado y en presencia o ausencia de cualquier herbicida inhibidor de HPPD respectivo.

40 Los términos “tolerancia”, “tolerante” o “menos sensible” denota la falta de susceptibilidad de una planta que expresa la proteína de HPPD mutada de la presente invención a sustancias, en particular herbicidas, que inhiben las proteínas de HPPD, opcionalmente en comparación con la proteína de HPPD propia de la planta o con cualquier proteína conocida de HPPD. Más específicamente, dichos términos significan los niveles relativos de tolerancia inherente de la HPPD cribada de acuerdo con un fenotipo indicador visible de la cepa o la planta transformada con un ácido nucleico que comprende el gen que codifica la respectiva proteína de HPPD en presencia de diferentes concentraciones de los diversos inhibidores de HPPD. Las respuestas a las dosis y los desplazamientos relativos en las respuestas a las dosis asociadas con estos fenotipos indicadores (formación de color marrón, inhibición del crecimiento, blanqueo, efecto herbicida, etc.) se expresan de modo conveniente en términos, por ejemplo, de valores de GR50 (concentración del 50 % de reducción del crecimiento) o de MIC (concentración inhibitoria mínima) donde los aumentos en valores corresponden a aumentos en la tolerancia inherente de la HPPD expresada, de la manera normal basada en el daño de plantas, síntomas de blanqueo meristemático, etc. en un rango de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos se pueden expresar en términos de, por ejemplo, valores de GR50 derivados de curvas de dosis/respuesta que tienen la “dosis” representada en el eje x y “muerte en porcentaje”, “efecto herbicida”, “números de plantas verdes que germinan”, etc., representados en el eje y donde valores de GR50 aumentados corresponden a niveles aumentados de tolerancia inherente de la HPPD expresada. Los herbicidas se pueden aplicar apropiadamente pre-germinación o post-germinación.

Del mismo modo, el nivel de tolerancia del ácido nucleico o gen que codifica una proteína de HPPD de acuerdo con

la invención, o la proteína de HPPD mutada de la invención se somete a criba por medio de ensayos de transgénesis, regeneración, cruza y pulverización de una planta de ensayo tal como tabaco, o de una planta de cultivo tal como soja o algodón. En línea con los resultados obtenidos por tal criba, tales plantas son al menos 2-4 veces más tolerantes a los inhibidores de HPPD como tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo y/o biciclopirona, pirasulfotol, que las plantas que no contienen ningún gen exógeno que codifique una proteína de HPPD, o que plantas que contienen un gen que comprende un ADN que codifica HPPD de *Arabidopsis thaliana*, sometido al control del mismo promotor que el ácido nucleico que codifica la proteína de HPPD mutada de la invención. Conforme a ello, la expresión "capaz de aumentar la tolerancia de una planta a al menos una herbicida que actúa sobre HPPD" denota una tolerancia incrementada en una planta en al menos el factor de 2, alternativamente al menos el factor de 3 o 4 o incluso 5 o 6 en comparación con una planta que solo expresa su HPPD endógena o una planta que expresa una HPPD de *Arabidopsis thaliana*. En este sentido, la expresión "herbicida que actúa sobre HPPD" no está limitada a sustancias que se conocen y/o que se usan como herbicidas sino a cualquier sustancia que inhibe la actividad catalítica de las proteínas de HPPD.

En una forma de realización alternativa del ácido nucleico que codifica un polipéptido de HPPD mutado que comprende al menos una de las mutaciones definidas con anterioridad, la proteína de HPPD comprende

a) una His en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 226 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

b) una Ser en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

c) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 282 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

d) una His en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 308 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

e) una Tyr en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 342 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

f) un Glu en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 394 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

g) una Gly en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 420 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2; y

h) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 423 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

En la proteína de HPPD mutada codificada por el ácido nucleico de la invención se ha modificado o reemplazado al menos un aminoácido según se define con anterioridad.

La sustitución o la delección se pueden realizar en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la HPPD no mutada original, es decir que se da en la naturaleza, según se define con anterioridad por cualquier medio que sea apropiado para sustituir, en dicha secuencia, el codón que codifica el aminoácido para sustituir con el codón que corresponde al aminoácido que se ha de sustituir o por delección de un codón, con dichos codones describiéndose ampliamente en la bibliografía y conociéndose bien por el experto en la técnica.

Se pueden usar varios procedimientos biológicos moleculares para lograr esta sustitución o delección. Un procedimiento preferido para preparar una secuencia de ácidos nucleicos mutados de acuerdo con la invención y la correspondiente proteína comprende llevar a cabo mutagénesis dirigida a sitio sobre codones que codifican uno o más aminoácidos que se seleccionan de antemano. Los procedimientos para obtener estas mutaciones dirigidas a sitio se conocen bien por el experto en la técnica y se describen ampliamente en la bibliografía (en particular: Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, editado por M. J. McPHERSON, IRL PRESS), o son procedimientos para los que es posible emplear kits comerciales (por ejemplo, el kit de mutagénesis U. S. E. de PHARMACIA). Después de la mutagénesis dirigida a sitio, es de utilidad seleccionar las células que contienen una HPPD mutada que es menos sensible a un inhibidor de HPPD usando una ayuda de cribado apropiada. Los procedimientos de cribado apropiados para lograr esto se han descrito con anterioridad.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "dicha posición corresponde a la posición X", siendo X cualquier número hallado en el respectivo contexto en la presente solicitud, no solo incluye la respectiva posición en la SEC ID N.º mencionada luego sino que también incluye cualquier secuencia que codifica una proteína de HPPD, donde, después de la alineación con la SEC ID N.º de referencia, la respectiva posición puede tener un número diferente pero corresponde al indicado para la SEC ID N.º de referencia. Si bien las secuencias de HPPD pueden ser muy diversas y solo pueden mostrar una baja identidad de secuencia de aproximadamente el 30 %, las proteínas de HPPD se caracterizan por una estructura de consenso tridimensional común que se logra a pesar de una baja

identidad de secuencia. Debido a las posiciones específicas que se conservan dentro de las proteínas de HPPD, la alineación de las proteínas de HPPD se pueden efectuar aplicando diversas herramientas de alineación de una manera sensible.

5 Los procedimientos de alineación de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos y conforme a ello, la determinación de la identidad de secuencia de dos o más secuencias, se conocen bien en la técnica. Incluyen realizar algoritmos matemáticos tales como el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4: 11-17 o el algoritmo de alineación local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489; el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:2264 y el de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)).

10 Estos algoritmos se pueden implementar en programas de ordenador incluyendo pero sin limitación CLUSTALX, ALIGN, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTDB y FASTA.

15 Por ejemplo, cuando se usa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se fijan, por supuesto, de modo tal que el porcentaje de identidad se calcule en toda la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permitan brechas en homología de hasta el 5 % de la cantidad total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

20 La identidad entre una primera secuencia y una segunda secuencia, también mencionada como una alineación de secuencias global, se determina usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). En una alineación de secuencias la consulta y las secuencias objetivo son ambas secuencias de ADN. El resultado de dicha alineación de secuencias global es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación de FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tuple = 4, Penalización por Apareamiento Incorrecto = 1, Penalización por Unión = 30, Longitud Grupo de Distribución Aleatoria = 0, Puntuación Límite = 1, Penalización de las Brechas = 5, Penalización del Tamaño de las Brechas 0,05, Tamaño de Ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objetivo, que es más corta.

30 La presente invención se basa en los resultados de una combinación de una comparación de las secuencias de aminoácidos de proteínas de HPPD de diversos organismos y el análisis de la unión de sustrato y del sitio de unión del inhibidor de proteínas de HPPD seleccionadas, usando cristalografía por rayos X. Usado este enfoque combinado, era posible determinar las posiciones clave en las proteínas de HPPD, donde un aminoácido se puede sustituir con uno de un grupo definido de otros aminoácidos a fin de modular la actividad catalítica de HPPD y la afinidad por al menos un inhibidor herbicida de HPPD con una planta que expresa la proteína de HPPD mutada.

35 La superposición de la estructura 3D de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (1TFZ) (Yang et al., 2004, Biochemistry 43, 10414-10423) con las estructuras 3D de HPPD de otras especies tales como *Pseudomonas fluorescens* (1CJX) (Serre et al., 1999, Structure Fold Des. 7, 977-988), *Streptomyces avermitilis* (1T47) (Brownlee et al., 2004, Biochemistry 43, 6370-6377), *Homo sapiens* (3ISQ) (PDB ID: 3isq Pilka et al., Structural Genomics Consortium (SGC). Crystal structure of human 4-Hydroxyfenilpiruvato dioxygenase), *Rattus norvegicus* (1SQI) (Yang et al., 2004, Biochemistry 43, 10414-10423) muestra que tienen el mismo plegado y los aminoácidos correspondientes están en una posición equivalente en la estructura 3D de la proteína. Como las especies con estructuras 3D conocidas son muy diversas en su secuencia de aminoácidos, se puede asumir que todas las secuencias de HPPD tienen el mismo plegado básico a pesar de que la identidad de secuencia general es baja. La secuencia y la estructura 3D de *Arabidopsis thaliana* se ha usado como estructura de referencia en la presente invención. La Figura 1 muestra la superposición de la estructura de HPPD de *A. thaliana* con la estructura de (a) *Pseudomonas fluorescens*, (b) *Streptomyces avermitilis*, (c) *Homo sapiens* y (d) *Rattus norvegicus*. A fin de definir el sitio de unión del sustrato y/o inhibidores, se seleccionaron los aminoácidos que desempeñan un papel en la catálisis o unión del inhibidor. Esto incluye aminoácidos en el sitio activo y aminoácidos de la hélice C-terminal. La disposición 3D se muestra en la Figura 2 que muestra los aminoácidos definidos como sitio de unión en el caso de (a) *Arabidopsis thaliana*, (b) *Pseudomonas fluorescens*, (c) *Streptomyces avermitilis*, (d) *Homo sapiens* y (e) *Rattus norvegicus*. La numeración de los aminoácidos de la estructura de *Pseudomonas fluorescens* (1cjx) se cambió a la numeración de acuerdo con la SEC ID N.º: 10. Los 36 aminoácidos que definen el sitio de unión incluyendo su posición se enumeran en la Tabla 1 para (a) *Arabidopsis thaliana*, (b) *Pseudomonas fluorescens*, (c) *Streptomyces avermitilis*, (d) *Homo sapiens* y (e) *Rattus norvegicus*.

Tabla 1: aminoácidos que forman el sitio de unión en *A. thaliana*, *P. fluorescens*, *S. avermitilis*, *H. sapiens*, *R. norvegicus*

<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
-----------------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------	--------------------------

ES 2 588 918 T3

Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido
226	H	162	H	187	H	183	H	183	H
228	V	164	T	189	V	185	V	185	V
248	H	186	R	211	T	207	H	207	H
250	F	188	A	213	M	209	F	209	F
251	A	189	R	214	K	210	W	210	W
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S
253	F	191	F	216	F	212	V	212	V
265	L	200	L	228	L	224	L	224	L
267	S	202	S	230	S	226	S	226	S
268	A	203	K	231	K	227	I	227	I
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V
270	L	205	M	233	V	229	V	229	V
271	A	206	S	234	A	230	A	230	A
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P
282	N	217	N	245	N	241	N	241	N
293	Q	226	Q	255	Q	251	Q	251	Q
294	I	227	I	256	I	252	I	252	I
307	Q	240	Q	269	Q	265	Q	265	Q
308	H	241	H	270	H	266	H	266	H
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L
342	Y	271	Y	299	Y	295	Y	295	Y
368	L	295	L	323	L	323	L	323	L
379	Q	310	Q	334	Q	334	Q	334	Q
381	F	312	F	336	F	336	F	336	F
392	F	321	F	347	F	347	F	347	F
394	E	323	E	349	E	349	E	349	E
419	F	333	F	359	F	359	F	359	F
420	G	334	G	360	G	360	G	360	G
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G
423	N	337	N	363	N	363	N	363	N
424	F	338	F	364	F	364	F	364	F
425	S	339	K	365	K	365	N	365	N
426	E	340	A	366	A	366	S	366	S
427	L	341	L	367	L	367	L	367	L
431	I	345	I	371	I	371	F	371	F

Una alineación de ejemplo de las proteínas de HPPD se da en la Tabla 2a para las proteínas de HPPD con estructuras 3D conocidas. La Tabla 2a da la numeración de los aminoácidos de la secuencia de Arabidopsis y también los aminoácidos que son comunes dentro de estas secuencias de HPPD, designando estos aminoácidos con un asterisco. Sobre la base de tal alineación y a partir de la definición del aminoácido de Arabidopsis por su posición y su naturaleza, es fácil identificar la posición del correspondiente aminoácido en otra secuencia de HPPD. La Figura 2 muestra que esto se puede llevar a cabo con la alineación de las secuencias de diferente origen vegetal, mamífero y bacteriano, lo que demuestra que este procedimiento de alineación, que es bien conocido por el experto en la técnica, puede ser generalizado a cualquier otra secuencia. Una alineación de diferentes secuencias de HPPD también se describe en la solicitud de patente WO 97/49816.

Tabla 2a: alineación de secuencias de HPPD con estructuras cristalinas conocidas, es decir, *A. thaliana*, *P. fluorescens*, *S. avermitilis*, *H. sapiens*, *R. norvegicus*



ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
1	M		-		-		-			
2	G		-		-		-			
3	H		-		-		-			
4	Q		-		-		-			
5	N		-		-		-			
6	A		-		-		-			
7	A		-		-		-			
8	V		-		-		-			
9	S		-		-		-			
10	E		-		-		-			
11	N		-		-		-			
12	Q		-		-		-			
13	N		-		-		-			
14	H		-	1	M		-			
15	D		-	2	T		-			
16	D		-	3	Q		-			
17	G		-	4	T		-			
18	A		-	5	T		-			
19	A		-	6	H	8	G	8	G	
20	S		-	7	H	9	A	9	P	
21	S		-	8	T	10	K	10	K	
22	P		-	9	P	11	P	11	P	
23	G		-		-		-			
24	F		-		-		-			
25	K		-		-		-			
26	L		-		-		-			
27	V		-		-		-			
28	G		-		-		-			
29	F		-		-		-			
30	S		-		-		-			
31	K		-		-		-			
32	F		-		-		-			
33	V		-		-		-			
34	R		-	10	D	12	E	12	E	
35	K	2	A	11	T	13	R	13	R	
36	N	3	D	12	A	14	G	14	G	
37	P	4	L	13	R	15	R	15	R	
38	K	5	Y	14	Q	16	F	16	F	
39	S	6	E	15	A	17	L	17	L	
40	D	7	N	16	D	18	H	18	H	
41	K	8	P	17	P		-			
42	F	9	M	18	F		-			

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
43	K	10	G	19	P		-			
44	V	11	L	20	V		-			
45	K	12	M	21	K		-			
46	R	13	G	22	G		-			
47	F	14	F	23	M	19	F	19	F	
48	H	15	E	24	D	20	H	20	H	
49	H	16	F	25	A	21	S	21	S	
50	I	17	I	26	V	22	V	22	V	
51	E	18	E	27	V	23	T	23	T	
52	F	19	F	28	F	24	F	24	F	x
53	W	20	A	29	A	25	W	25	W	
54	C	21	S	30	V	26	V	26	V	
55	G	22	P	31	G	27	G	27	G	
56	D	23	T	32	N	28	N	28	N	
57	A	24	P	33	A	29	A	29	A	
58	T	25	G	34	K	30	K	30	K	
59	N	26	T	35	Q	31	Q	31	Q	
60	V	27	L	36	A	32	A	32	A	
61	A	28	E	37	A	33	A	33	A	
62	R	29	P	38	H	34	S	34	S	
63	R	30	I	39	Y	35	F	35	F	
64	F	31	F	40	Y	36	Y	36	Y	
65	S	32	E	41	S	37	C	37	C	
66	W	33	I	42	T	38	S	38	N	
67	G	34	M	43	A	39	K	39	K	
68	L	35	G	44	F	40	M	40	M	
69	G	36	F	45	G	41	G	41	G	
70	M	37	T	46	M	42	F	42	F	
71	R	38	K	47	Q	43	E	43	E	
72	F	39	V	48	L	44	P	44	P	
73	S	40	A	49	V	45	L	45	L	
74	A	41	T	50	A	46	A	46	A	
75	K	42	H	51	Y	47	Y	47	Y	
76	S	43	R	52	S	48	R	48	K	
77	D	44	S	53	G	49	G	49	G	
78	L	45	K	54	P	50	L	50	L	
79	S	46	N	55	E	51	E	51	E	
80	T		-	56	N	52	T	52	T	
81	G		-	57	G	53	G	53	G	
82	N		-	58	S	54	S	54	S	
83	M		-	59	R	55	R	55	R	
84	V		-	60	E	56	E	56	E	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
85	H		-	61	T	57	V	57	V	
86	A		-	62	A	58	V	58	V	
87	S	47	V	63	S	59	S	59	S	
88	Y	48	H	64	Y	60	H	60	H	
89	L	49	L	65	V	61	V	61	V	
90	L	50	Y	66	L	62	I	62	I	
91	T	51	R	67	T	63	K	63	K	
92	S	52	Q	68	N	64	Q	64	Q	
93	G	53	G	69	G	65	G	65	G	X
94	D	54	E	70	S	66	K	66	K	
95	L	55	I	71	A	67	I	67	I	
96	R	56	N	72	R	68	V	68	V	
97	F	57	L	73	F	69	F	69	F	
98	L	58	I	74	V	70	V	70	V	
99	F	59	L	75	L	71	L	71	L	
100	T	60	N	76	T	72	S	72	C	
101	A	61	N	77	S	73	S	73	S	
102	P	62	E	78	V	74	A	74	A	
103	Y	63	P	79	I	75	L	75	L	
104	S	64	N	80	K	76	N	76	N	
105	P	65	S	81	P		-			
106	S	66	I	82	A		-			
107	L	67	A	83	T		-			
108	S	68	S	84	P	77	P	77	P	
109	A		-	85	W	78	W	78	W	
110	G		-	86	G	79	N	79	N	
111	E		-	87	H	80	K	80	K	
112	I		-	88	F	81	E	81	E	
113	K		-	89	L	82	M	82	M	
114	P		-	90	A	83	G	83	G	
115	T		-		-		-			
116	T		-		-		-			
117	T		-		-		-			
118	A		-		-		-			
119	S		-		-		-			
120	I		-		-		-			
121	P		-		-		-			
122	S		-		-		-			
123	F		-		-		-			
124	D		-		-		-			
125	H		-		-		-			
126	G		-		-		-			

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
127	S		-		-		-			
128	C		-		-		-			
129	R		-		-		-			
130	S	69	Y	91	D	84	D	84	D	
131	F	70	F	92	H	85	H	85	H	
132	F	71	A	93	V	86	L	86	L	
133	S	72	A	94	A	87	V	87	V	
134	S	73	E	95	E	88	K	88	K	
135	H	74	H	96	H	89	H	89	H	X
136	G	75	G	97	G	90	G	90	G	X
137	L	76	P	98	D	91	D	91	D	
138	G	77	S	99	G	92	G	92	G	
139	V	78	V	100	V	93	V	93	V	X
140	R	79	C	101	V	94	K	94	K	
141	A	80	G	102	D	95	D	95	D	
142	V	81	M	103	L	96	I	96	I	
143	A	82	A	104	A	97	A	97	A	X
144	I	83	F	105	I	98	F	98	F	
145	E	84	R	106	E	99	E	99	E	
146	V	85	V	107	V	100	V	100	V	X
147	E	86	K	108	P	101	E	101	E	
148	D	87	D	109	D	102	D	102	D	X
149	A	88	S	110	A	103	C	103	C	
150	E	89	Q	111	R	104	D	104	E	
151	S	90	K	112	A	105	Y	105	H	
152	A	91	A	113	A	106	I	106	I	
153	F	92	Y	114	H	107	V	107	V	
154	S	93	N	115	A	108	Q	108	Q	
155	I	94	R	116	Y	109	K	109	K	
156	S	95	A	117	A	110	A	110	A	
157	V	96	L	118	I	111	R	111	R	
158	A	97	E	119	E	112	E	112	E	
159	N	98	L	120	H	113	R	113	R	
160	G	99	G	121	G	114	G	114	G	X
161	A	100	A	122	A	115	A	115	A	
162	I	101	Q	123	R	116	K	116	K	
163	P		-	124	S	117	I	117	I	
164	S		-	125	V	118	M	118	V	
165	S		-	126	A	119	R	119	R	
166	P		-	127	E	120	E	120	E	
167	P	102	P	128	P	121	P	121	P	X
168	I	103	I	129	Y	122	W	122	W	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
169	V	104	H	130	E	123	V	123	V	
170	L	105	I	131	L	124	E	124	E	
171	N	106	D	132	K	125	Q	125	E	
172	E	107	T	133	D	126	D	126	D	
173	A	108	G	134	E	127	K	127	K	
174	V	109	P	135	H	128	F	128	F	
175	T	110	M	136	G	129	G	129	G	
176	I	111	E	137	T	130	K	130	K	
177	A	112	L	138	V	131	V	131	V	
178	E	113	N	139	V	132	K	132	K	
179	V	114	L	140	L	133	F	133	F	
180	K	115	P	141	A	134	A	134	A	
181	L	116	A	142	A	135	V	135	V	
182	Y	117	I	143	I	136	L	136	L	
183	G	118	K	144	A	137	Q	137	Q	
184	D	119	G	145	T	138	T	138	T	
185	V	120	I	146	Y	139	Y	139	Y	
186	V	121	G	147	G	140	G	140	G	
187	L	122	G	148	K	141	D	141	D	
188	R	123	A	149	T	142	T	142	T	
189	Y	124	P	150	R	143	T	143	T	
190	V	125	L	151	H	144	H	144	H	
191	S	126	Y	152	T	145	T	145	T	
192	Y	127	L	153	L	146	L	146	L	
193	K	128	I	154	V	147	V	147	V	
194	A	129	D	155	D	148	E	148	E	
195	E	130	R	156	R	149	K	149	K	
196	D	131	F	157	T	150	M	150	I	
197	T	132	G	158	G	151	N	151	N	
198	E	133	E	159	Y	152	Y	152	Y	
	-	134	G		-		-			
199	K	135	S	160	D	153	I	153	T	
200	S	136	S	161	G	154	G	154	G	
201	E	137	I	162	P	155	Q	155	R	
202	F	138	Y	163	Y	156	F	156	F	
203	L	139	D	164	L	157	L	157	L	
204	P	140	I	165	P	158	P	158	P	
205	G	141	D	166	G	159	G	159	G	
206	F	142	F	167	Y	160	Y	160	F	
207	E	143	V	168	V	161	E	161	E	
208	R	144	Y	169	A	162	A	162	A	
209	V	145	L	170	A	163	P	163	P	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
210	E	146	E	171	A	164	A	164	T	
211	D	147	G		-	165	F	165	Y	
	-		-		-	166	M	166	K	
	-		-		-	167	D	167	D	
	-		-	172	P	168	P	168	T	
212	A	148	V	173	I	169	L	169	L	
213	S	149	E	174	V	170	L	170	L	
214	S	150	R	175	E	171	P	171	P	
215	F	151	N	176	P	172	K	172	K	
216	P	152	P	177	P	173	L	173	L	
217	L	153	V	178	A	174	P	174	P	
218	D	154	G	179	H	175	K	175	S	
219	Y	155	A	180	R	176	C	176	C	
220	G	156	G	181	T	177	S	177	N	
221	I	157	L	182	F	178	L	178	L	
222	R	158	K	183	Q	179	E	179	E	
223	R	159	V	184	A	180	M	180	I	
224	L	160	I	185	I	181	I	181	I	
225	D	161	D	186	D	182	D	182	D	x
226	H	162	H	187	H	183	H	183	H	x
227	A	163	L	188	C	184	I	184	I	
228	V	164	T	189	V	185	V	185	V	
229	G	165	H	190	G	186	G	186	G	
230	N	166	N	191	N	187	N	187	N	x
231	V	167	V	192	V	188	Q	188	Q	
232	P	168	Y	193	E	189	P	189	P	
	-	169	R	194	L	190	D	190	D	
	-	170	G	195	G	191	Q	191	Q	
233	E	171	R	196	R	192	E	192	E	
234	L	172	M	197	M	193	M	193	M	
235	G	173	V	198	N	194	V	194	E	
236	P	174	Y	199	E	195	S	195	S	
237	A	175	W	200	W	196	A	196	A	
238	L	176	A	201	V	197	S	197	S	
239	T	177	N	202	G	198	E	198	E	
240	Y	178	F	203	F	199	W	199	W	
241	V	179	Y	204	Y	200	Y	200	Y	
242	A	180	E	205	N	201	L	201	L	
243	G	181	K	206	K	202	K	202	K	
244	F	182	L	207	V	203	N	203	N	
245	T	183	F	208	M	204	L	204	L	
246	G	184	N	209	G	205	Q	205	Q	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
247	F	185	F	210	F	206	F	206	F	x
248	H	186	R	211	T	207	H	207	H	
249	Q	187	E	212	N	208	R	208	R	
250	F	188	A	213	M	209	F	209	F	
251	A	189	R	214	K	210	W	210	W	
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S	
253	F	191	F	216	F	212	V	212	V	
254	T	192	D	217	V	213	D	213	D	
255	A	193	I	218	G	214	D	214	D	
256	D	194	K	219	D	215	T	215	T	
257	D	195	G	220	D	216	Q	216	Q	
258	V	196	E	221	I	217	V	217	V	
259	G		-	222	A	218	H	218	H	
260	T		-	223	T	219	T	219	T	
261	A		-	224	E	220	E	220	E	
262	E	197	Y	225	Y	221	Y	221	Y	
263	S	198	T	226	S	222	S	222	S	
264	G	199	G	227	A	223	S	223	S	
265	L	200	L	228	L	224	L	224	L	x
266	N	201	T	229	M	225	R	225	R	
267	S	202	S	230	S	226	S	226	S	x
268	A	203	K	231	K	227	I	227	I	
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V	
270	L	205	M	233	V	229	V	229	V	
271	A	206	S	234	A	230	A	230	A	x
272	S	207	A	235	D	231	N	231	N	
273	N	208	P	236	G	232	Y	232	Y	
274	D	209	D	237	T	233	E	233	E	
275	E	210	G	238	L	234	E	234	E	
276	M	211	M	239	K	235	S	235	S	
277	V	212	I	240	V	236	I	236	I	
278	L	213	R	241	K	237	K	237	K	
279	L	214	I	242	F	238	M	238	M	
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P	x
281	I	216	L	244	I	240	I	240	I	
282	N	217	N	245	N	241	N	241	N	x
283	E	218	E	246	E	242	E	242	E	x
284	P	219	E	247	P	243	P	243	P	
285	V	220	S	248	A	244	A	244	A	
286	H		-	249	L	245	P	245	P	
287	G		-	250	A	246	G	246	G	
288	T	221	S	251	K	247	K	247	R	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
289	K	222	K	252	K	248	K	248	K	x
290	R	223	G		-		-			
291	K	224	A	253	K	249	K	249	K	
292	S	225	G	254	S	250	S	250	S	
293	Q	226	Q	255	Q	251	Q	251	Q	x
294	I	227	I	256	I	252	I	252	I	x
295	Q	228	E	257	D	253	Q	253	Q	
296	T	229	E	258	E	254	E	254	E	
297	Y	230	F	259	Y	255	Y	255	Y	
298	L	231	L	260	L	256	V	256	V	
299	E	232	M	261	E	257	D	257	D	
300	H	233	Q	262	F	258	Y	258	Y	
301	N	234	F	263	Y	259	N	259	N	
302	E	235	N	264	G	260	G	260	G	
303	G	236	G	265	G	261	G	261	G	x
304	A	237	E	266	A	262	A	262	A	
305	G	238	G	267	G	263	G	263	G	x
306	L	239	I	268	V	264	V	264	V	
307	Q	240	Q	269	Q	265	Q	265	Q	x
308	H	241	H	270	H	266	H	266	H	x
309	L	242	V	271	I	267	I	267	I	
310	A	243	A	272	A	268	A	268	A	x
311	L	244	F	273	L	269	L	269	L	
312	M	245	L	274	N	270	K	270	R	
313	S	246	T	275	T	271	T	271	T	
314	E	247	D	276	G	272	E	272	E	
315	D	248	D	277	D	273	D	273	D	x
316	I	249	L	278	I	274	I	274	I	
317	F	250	V	279	V	275	I	275	I	
318	R	251	K	280	E	276	T	276	T	
319	T	252	T	281	T	277	A	277	T	
320	L	253	W	282	V	278	I	278	I	
321	R	254	D	283	R	279	R	279	R	
322	E	255	A	284	T	280	H	280	H	
323	M	256	L	285	M	281	L	281	L	
324	R	257	K	286	R	282	R	282	R	
325	K	258	K	287	A	283	E	283	E	
326	R	259	I	288	A	284	R	284	R	
327	S		-		-		-			
328	S		-		-		-			
329	I		-		-		-			
330	G		-		-		-			



ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	A. thaliana	P. fluorescens		S. avermitilis		H. sapiens		R. norvegicus		aminoácido
331	G	260	G	289	G	285	G	285	G	x
332	F	261	M	290	V	286	L	286	M	
333	D	262	R	291	Q	287	E	287	E	
334	F	263	F	292	F	288	F	288	F	x
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L	
336	P	265	T	294	D	290	S	290	A	
337	S	266	A	295	T	291	V	291	V	
338	P	267	P	296	P	292	P	292	P	x
339	P	268	P		-		-			
340	P	269	D	297	D	293	S	293	S	
341	T	270	T	298	S	294	T	294	S	
342	Y	271	Y	299	Y	295	Y	295	Y	x
343	Y	272	Y	300	Y	296	Y	296	Y	x
344	Q	273	E	301	D	297	K	297	R	
345	N	274	M	302	T	298	Q	298	L	
346	L	275	L	303	L	299	L	299	L	x
347	K	276	E	304	G	300	R	300	R	
348	K	277	G	305	E	301	E	301	E	
349	R	278	R	306	W	302	K	302	N	
350	V	279	L	307	V	303	L	303	L	
351	G	280	P	308	G	304	K	304	K	
352	D	281	D	309	D	305	T	305	T	
353	V	282	H	310	T	306	A	306	S	
354	L	283	G	311	R	307	K	307	K	
355	S	284	E	312	V	308	I	308	I	
356	D	285	P	313	P	309	K	309	Q	
357	D	286	V	314	V	310	V	310	V	
358	Q	287	D		-	311	K	311	K	
	-	288	Q		-	312	E	312	E	
	-	289	L		-	313	N	313	N	
359	I	290	Q		-	314	I	314	M	
360	K	291	A	315	D	315	D	315	D	
361	E	292	R	316	T	316	A	316	V	
362	C	293	G	317	L	317	L	317	L	
363	E	294	I	318	R	318	E	318	E	
364	E	295	L	319	E	319	E	319	E	
365	L	296	L	320	L	320	L	320	L	x
366	G	297	D	321	K	321	K	321	K	
367	I	298	G	322	I	322	I	322	I	
368	L	299	S	323	L	323	L	323	L	
369	V	300	S	324	A	324	V	324	V	
370	D	301	V	325	D	325	D	325	D	

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
371	R	302	E	326	R	326	Y	326	Y	
372	D	303	G	327	D	327	D	327	D	
373	D	304	D	328	E	328	E	328	E	
374	Q	305	K	329	D	329	K	329	K	
375	G	306	R	330	G	330	G	330	G	
376	T	307	L	331	Y	331	Y	331	Y	
377	L	308	L	332	L	332	L	332	L	x
378	L	309	L	333	L	333	L	333	L	x
379	Q	310	Q	334	Q	334	Q	334	Q	x
380	I	311	I	335	I	335	I	335	I	x
381	F	312	F	336	F	336	F	336	F	x
382	T	313	S	337	T	337	T	337	T	
383	K	314	E	338	K	338	K	338	K	
384	P	315	T	339	P	339	P	339	P	
385	L	316	L	340	V	340	V	340	M	
386	G	317	M	341	Q	341	Q	341	Q	
387	D	318	G	342	D	342	D	342	D	
388	R		-	343	R	343	R	343	R	
389	P		-	344	P	344	P	344	P	
390	T	319	P	345	T	345	T	345	T	
391	I	320	V	346	V	346	L	346	L	
392	F	321	F	347	F	347	F	347	F	x
393	I	322	F	348	F	348	L	348	L	
394	E	323	E	349	E	349	E	349	E	x
395	I	324	F	350	I	350	V	350	V	
396	I	325	I	351	I	351	I	351	I	x
397	Q	326	Q	352	E	352	Q	352	Q	
398	R	327	R	353	R	353	R	353	R	x
399	V	328	K	354	H	354	H	354	H	
400	G		-		-		-			
401	C		-		-		-			
402	M		-		-		-			
403	M		-		-		-			
404	K		-		-		-			
405	D		-		-		-			
406	E		-		-		-			
407	E		-		-		-			
408	G		-		-		-			
409	K		-		-		-			
410	A		-		-		-			
411	Y		-		-		-			
412	Q		-		-		-			

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	<i>A. thaliana</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>	aminoácido
413	S		-		-		-			
414	G		-		-		-			
415	G	329	G	355	G	355	N	355	N	
416	C	330	D	356	S	356	H	356	H	
417	G	331	D	357	M	357	Q	357	Q	
418	G	332	G	358	G	358	G	358	G	x
419	F	333	F	359	F	359	F	359	F	x
420	G	334	G	360	G	360	G	360	G	x
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A	
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G	x
423	N	337	N	363	N	363	N	363	N	x
424	F	338	F	364	F	364	F	364	F	x
425	S	339	K	365	K	365	N	365	N	
426	E	340	A	366	A	366	S	366	S	
427	L	341	L	367	L	367	L	367	L	x
428	F	342	F	368	F	368	F	368	F	x
429	K	343	E	369	E	369	K	369	K	
430	S	344	S	370	A	370	A	370	A	
431	I	345	I	371	I	371	F	371	F	
432	E	346	E	372	E	372	E	372	E	x
433	E	347	R	373	R	373	E	373	E	
434	Y	348	D	374	E	374	E	374	E	
435	E	349	Q	375	Q	375	Q	375	Q	
436	K	350	V	376	E	376	N	376	A	
437	T	351	R	377	K	377	L	377	L	
438	L	352	R	378	R	378	R	378	R	
439	E	353	G	379	G	379	G	379	G	
440	A	354	V	380	N	380	N	380	N	
441	K	355	L	381	L	381	L	381	L	
442	Q	356	A			382	T	382	T	
443	L	357	T			383	N	383	D	
444	V	358	D			384	M	384	L	
445	G					385	E	385	E	
						386	T	386	T	
						387	N	387	N	
						388	G	388	G	
						389	V	389	V	
						390	V	390	R	
						391	P	391	S	
						392	G	392	G	
						393	M	393	M	
						394	A	394		

ES 2 588 918 T3

Pos.	1TFZ	Pos.	1CJX	Pos.	1T47	Pos.	3ISQ	Pos.	1SQI	Común
	A. thaliana		P. fluorescens		S. avermitilis		H. sapiens		R. norvegicus	aminoácido
						395	E	395		
						396	N	396		
						397	L	397		
						398	Y	398		
						399	F	399		
						400	Q	400		

5 Un análisis de secuencia de más de 700 secuencias de HPPD de bases de datos públicas incluyendo secuencias de proteínas de HPPD y proteínas de HPPD pronosticadas tales como de plantas, mamíferos, hongos y bacterias se realizó usando ClustalX. La alineación se corrigió usando la información de las estructuras 3D disponibles. Idénticas secuencias de aminoácidos con diferentes identificadores se incluyeron solo una vez y algunas secuencias con errores de secuencia obvios fueron excluidas. La alineación también incluye secuencias incompletas. La Tabla 2b muestra la alineación de las secuencias para un grupo representativo de proteínas de HPPD e incluye secuencias de plantas, bacterias, mamíferos.

Tabla 2b: alineación de un grupo representativo de secuencias de HPPD

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

RATTUS_NORVEGICUS      ---MTT-----Y--SNKGFKPE
HOMO-SAPIENS           -----GAKPE
XENOPUS-LAEVIS        ---MTS-----YTDKGFKPD
BLEPHARISMA-JAPONICUS ---MTY-----YDKQETRPD
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA ---MAPGALLVTSQNG-----RTSPLYDSGQVVPAPAAALVVG
ASPERGILLUS-FUMIGATUS ---MAPSAISTS-----PPFTDRVSS
MAGNAPORTHE-GRISEA    ---MSPSAITESPRN-----SVVDHTSGLQVDSLAVQGP
CANDIDA-ALBICANS      -----
PICHIA-STIPITIS       ---LLKELPFLPTSS-----DPITEPDIDELLSDGHVNSKYP
RHODOCOCCUS-SP.      ---MTIEQTLTD-----KERLAGLDLQLEQLVGLVEYDGTTRD
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS ---MTVEQTLTD-----DEQLAGLDLEQLRQLVGLVEYDSDHD
JANIBACTER-SP.-HTCC2649 MTDTTITNPTTDTASQPTPLDLTPQEREANLNLEQLKQLVGLVEYDESKD
STREPTOMYCES-AVERMITILIS ---MTQTTHTHP-----DTARQAD
KORDIA-ALGICIDA       ---MAAEIKNLKD-----LQNTTEYGLKFLDEAED
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME ---MSKELK-----SVDYGLEKIFDGAQD
GEMMATIMONAS-AURANTIACA ---MATLTT-----PEIGTEQD
PICROPHILUS-TORRIDUS -----MYGKNLISELRE
ARABIDOPSIS-THALIANA -----MGHQNAAVSENQNHDDGAAS--SPGFKLVGFSKFEVRKNPKSD
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI -----MGHENAAVSENQHDDAATTSASPGFKLVGFSKFEVRKNPKSD
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA -----MVPST-----ASNLLKLVGHTNFVHNNPKSD
HEVEA-BRASILIENSIS    -----MGKENDSVPS-----APGFKLLGFSNFVRTNPRSD
MEDICAGO-TRUNCATULA   -----MAIETETQTQT-----QTGFKLVGFKNFVRANPKSD
GLYCINE-MAX           -----MCNEIQAQAQAQ-----AQPGFKLVGFKNFVRTNPKSD
SOLANUM-LYCOPERSICUM ---MG--MGKETLS--TTDTG-----ATFKLVGFENNFIIRANPRSD
SOLANUM-TUBEROSUM     ---MG--MGKELTSTTTTDETG-----ATFKLG--FNNFIIRANPRSD
NICOTIANA-BENTHAMIANA ---MGKLETVTTTSATAADDSSEL-----TTNFKLVGFKNFIRTNPRSD
DAUCUS-CAROTA         ---MGKKQSEAEILSSNSNTSP-----ATFKLVGFENNFIIRANPKSD
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES ---MG-----QESTAAAAVVP-----AEPKLVGHKNFVRGNPMSD
HORDEUM-VULGARE       -----MPPTPTTAAAT--GAAAAVTPEHARP-----HRMVRFNPRSD
TRITICUM-AESTIVUM     -----MPPTPTTAAATGAGAAAAVTPEHARP-----RRMVRFNPRSD
AVENA-SATIVA          -----MPPTPATATGA--AAAAVTPEHAARS---FPRVVRVFNPRSD
ORYZA-SATIVA          -----MPPTPTTATTGAVSAAAAGENAGFRLVGHRRFVRANPRSD
SORGHUM-BICOLOR       -----MPPTPTTAAAT--GAAVAAASAEQAAPRLVGHRRNFVRVFNPRSD
ZEA-MAYS              -----MPPTPTAAAAG--AAVAAASAEQAAPRLVGHRRNFVRFNPRSD
ABO95005_OLUCIMARINUS ---MATVPS-----KRKLVGCANFVRSNPLSD
OTAUURI               -----MTTAS-----GRKLVGHANFVRCNPLSD
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 -----MASSEANAAPA-----AKRHKLVGCKNFVRNPNPKSD
SYNECHOCOCCUS-SP.    -----MNPDIR
VIBRIO-SP.-MED222     -----MVDTYN
MARINOMONAS-SP.-MEDI21 -----MNTALKIDYSIN
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS -----ADLYEN
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 -----MGPFPHDAEKSKITDEN
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 -----MGPFPHDAPKSEITDEN
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS -----MAQVTEKN

RATTUS_NORVEGICUS      RGRFLHFHSVTFWVGNAK--QAASFYCNKMGFEPLAYYKGLTGSREVVSH
HOMO-SAPIENS           RGRFLHFHSVTFWVGNAK--QAASFYCSKMGFEPLAYYRGLTGSREVVSH
XENOPUS-LAEVIS        VGRYLAFDHITFYVVGNAK--QAAAYYATRFGFNPIAYRGLTGHDRDVCTH
BLEPHARISMA-JAPONICUS LGEFYGFHHVRFYVSNSE--QAASFYTSRFGFSPVAYEGLETGNQKFCFN
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA EVNRYRGYHHAEWVVGNAK--QVAQFYITRMGFEPVAHRGLETGSRFVASH
ASPERGILLUS-FUMIGATUS LASYKGYDHVHWYVVGNAK--QAASYITRMGFKRIAYRGLTGCRSVCSH
MAGNAPORTHE-GRISEA    FPSPHGYDHTWVVGNAK--QAASYNTLFGMKLIAYRGLTGSRYFASY
CANDIDA-ALBICANS      -----MSKYLQLAMGFKEVAYKGLTGSKLI GAH
PICHIA-STIPITIS       TDGFIKFFSLKICSSNAK--QMSKYLQLAMDFKEIAYRGLENDSRLVGAH
RHODOCOCCUS-SP.      FFPVSGWDVAVVVGNAK--QTAHYFQSAFGMTLVAYSQPTTGNRDHHSF
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS FFPVSGWDGLEWIVGNAK--QTSHFQSAFGMELVAYSQPTTGNRDHHSF

```

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

JANIBACTER-SP.-HTCC2649      PFPVVTGWDAIVFVVGNDAT--QAAAYYQGTWGMELVGYSGPENGNRDHKAF
STREPTOMYCES-AVERMITILIS    PFPVKGMDAVVFVAVGNAK--QAAHYYSTAFGMQLVAYSGPENGSRETASY
KORDIA-ALGICIDA              FLPLLGTDYVELLYVGNNAK--QSAHFYKTAFGFQSEAYAGLETGLTDRVSY
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME  FLPLLGTDYVEFYVGNNAK--QAAHFYKTAFGFQSEAYSGLETGKDRVSY
GEMMATIMONAS-AURANTIACA     AFFPINGTDYVEFYVGNNAK--QASHYRAAFGYSLVAYRGPETGVRDRASY
PICROPHILUS-TORRIDUS        KEIFKRLHHVEFYVSSAK--TWSYFMNRGLGFKTVAYAGPETGIRDKISY
ARABIDOPSIS-THALIANA        KFKVKRFHHIEFWCGDAT--NVARRFWSWGLGMRFSAKSDLSTGNMNVHASY
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI  KFKVKRFHHIEFWCGDAT--NVARRFWSWGLGMRFSAKSDLSTGNMNVHASY
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA  LFAVKRFHHIEFWCTDAT--NTARRFSWGLGMPVAKSDLSTGNMNVHASY
HEVEA-BRASILIENSIS          RFNVKRFHHVEFWCTDAT--NTARRFSHGLGMPVAKSDLSTGNLTHASY
MEDICAGO-TRUNCATULA         RFQVNRFHIEFWCTDAT--NASRRFSWGLGMPVAKSDLSTGNQIHASY
GLYCINE-MAX                  FFSVKRFHHIEFWCGDAT--NTSRRFWSWGLGMPITAKSDLSTGNSVHASY
SOLANUM-LYCOPERSICUM        FFSVKRFHHIEFWCGDAT--NTSRRFWSWGLGMPITAKSDLSTGNSVHASY
SOLANUM-TUBEROSUM           FFSVKRFHHIEFWCGDAT--NTSRRFWSWGLGMPITAKSDLSTGNSVHASY
NICOTIANA-BENTHAMIANA       HFVAVKRFHHIEFWCGDAT--NTSRRFWSWGLGMPVAKSDLSTGNSVHASY
DAUCUS-CAROTA                HFPVHRFHVEFWCGDAT--NTSRRFWSWGLGMPVAKSDLSTGNSAHASY
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES  RFHTLSFHHVEFWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNSAHASQ
HORDEUM-VULGARE              RFHTLSFHHVEFWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNSVHASQ
TRITICUM-AESTIVUM           RFPVLSFHHVELWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNSAHASL
AVENA-SATIVA                 RFQALAFHHVELWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNSAHASL
ORYZA-SATIVA                 RFHTLAFHHVELWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNTAHASL
SORGHUM-BICOLOR              RFHTLAFHHVELWCADAA--SAAGRFAPALGAPLAARSDDLSTGNSAHASL
ZEA-MAYS                      AFECEKFDHIEFWCGDAT--NAAARFVGLGMLRCKSDATTGNGTYASY
ABO95005_OLUCIMARINUS      AFECVGFHDHVEFWCGDAT--NAASRFVGLGMSLRKSDASTGNGIYASY
OTAURI                        LFTMRKFHHVEFWCRDAT--TTAARFAVGLGMLVAKSDLTTGNARYASY
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545  --IVQGIHHLHFYLDLDP--RWREHFCRVWGFVSDAGN-----TL
SYNECHOCOCCUS-SP.          PLGTDGFEFVEYTAVDHKGIEQLKALLVSLGFAEIAKHSRKE-----AW
VIBRIO-SP.-MED222           PLGTDGFEFVEYTADEKGIADLKLALFVSLGFTEVAKHSRKE-----VW
MARINOMONAS-SP.-MED121     PMGLMGFEFIEFASPTPG---TLEPLFEIMGFTKVATHRSKN-----VH
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS    PAGTDGFEFVEFASADPQ---ELRDLFTRMGYAHVANHKTQK-----IE
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1  PAGTDGFEFVEFAHPDPQ---ELRDLFSKMGYELVGRHKSKD-----VE
OCEANICOLA-BATSSENSIS-HTCC2597  PVGLNGVDFIEYSGPDAH---FFEQVFKRYAFKEVQVHGKN-----IK
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS

RATTUS NORVEGICUS           VIKQ GK--IVFVLCSALNPWN-----
HOMO-SAPIENS                 VIKQ GK--IVFVLSSALNPWN-----
XENOPUS-LAEVIS               VVRQNN--ATFVVFQSPLNFGN-----
BLEPHARISMA-JAPONICUS       VVRSNH--VVIAFTSALTPEDE-----
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA  VVQNNG--VRFVFTSPVRSSA-----
ASPERGILLUS-FUMIGATUS       VVRNGD--ITFILTSPLRG-----
MAGNAPORTHE-GRISEA          LVGKED--VRFVFTSPIRSHVH-----
CANDIDA-ALBICANS             VMQNGS--ITLEIINTLETIDDDNVLKFPPFQNDLKNKFRNINHEYFLENF
PICHIA-STIPITIS              VIRNGD--VTLEIINTLETVEDDNVLFKFPYFEKDLKQFPQLNESKYLRDF
RHODOCOCCUS-SP.              VLES GA--VRFVIKGAVNPDSP-----
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS    VLKSGA--VRFVVKGAVDPASP-----
JANIBACTER-SP.-HTCC2649     VLKSGS--IRFVLKGAVSPDSP-----
STREPTOMYCES-AVERMITILIS    VLTNGS--ARFVLTSVIKATPW-----
KORDIA-ALGICIDA              VLKQDK--IRLVLTTPLGKGGE-----
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME  VLRQDK--IRLVLTSPLGASAP-----
GEMMATIMONAS-AURANTIACA     LMQQGK--IRLVLTTSITADTP-----
PICROPHILUS-TORRIDUS        VMSQGT--ARISFTSSMNDDSY-----
ARABIDOPSIS-THALIANA        LLTSGD--LRFLFTAPYSP---SLSAGEI-----
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI  LLTSGD--LRFLFTAPYSP---SLSAGEN-----
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA  LLRSGE--LNFLFTAPYSP---SIAGNT-----
HEVEA-BRASILIENSIS          LLRS GD--LSFLFTAPYSP---TIASMENF-----
MEDICAGO-TRUNCATULA         LLRS GD--LNFLFSAAYSP---SISLSS-----
GLYCINE-MAX                  LLRS GD--LSFLFSAPYSP---SLSAGSS-----
SOLANUM-LYCOPERSICUM        LLRSVSGELQFVFTAPYSP---SISVPS-----
SOLANUM-TUBEROSUM           LLRSVSGELQFVFTAPYSP---SISVPS-----
NICOTIANA-BENTHAMIANA       LLRPVSGSLQFLFTAPYSP---SISTPS-----
DAUCUS-CAROTA                LVR SAN--LSFVFTAPYSP---STTTSSG-----
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES  LLRS GE--LSFVFTAPYSP---SLAEPG-----
HORDEUM-VULGARE              LLRS GS--LAF LFTAPYAN----GCDAA-----
TRITICUM-AESTIVUM           LLRS GN--LAF LFTAPYAN----GCDAA-----

```

# ES 2 588 918 T3

## CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

AVENA-SATIVA	LLRSGA--LAFLFTAPYAPPPQEAAATAA-----
ORYZA-SATIVA	LLRSAS--VAFLFTAPYGGDHGVDGADAAT-----
SORGHUM-BICOLOR	LLRSGA--LAFLFTAPYAH-----GADAA-----
ZEA-MAYS	LLRSGS--LSFLFTAPYAH-----GADAA-----
ABO95005_OLUCIMARINUS	AMKSND--LTFVFTAPYG-----VESGGSR-----
OTAURI	AMKSHD--LTFVFTAPYGDDERAVGCGGSS-----
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545	VLQSDN--LRFVFSAPYDVPEGEENDDARS-----
SYNECHOCOCCUS-SP.	ELEQGS--LRLRLSQPARAG-----
VIBRIO-SP.-MED222	LYRQGD--INFIVNEQPHS-----
MARINOMONAS-SP.-MED121	LYRQND--INFIVNSEPNS-----
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS	LYRQGE--INLILNNEPNS-----
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1	LWQQGD--ITYVLNADPDS-----
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597	LWQQGD--ITYIINAEPGT-----
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS	LFRQGD--INFILNCEPHT-----
.	
RATTUS NORVEGICUS	-----
HOMO-SAPIENS	-----
XENOPUS-LAEVIS	-----
BLEPHARISMA-JAPONICUS	-----
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA	-----
ASPERGILLUS-FUMIGATUS	-----
MAGNAPORTHE-GRISEA	-----
CANDIDA-ALBICANS	KLTTDDLI FDFVNSRIE SLSFKSDYLKFGKQFYNNI IRSDDYQESMAKVS
PICHTIA-STIPITIS	KITTNDLV FDFVNSRIE SFSVSPNAHYFRKLYNKI VSSRAF RNNMFDYN
RHODOCOCCUS-SP.	-----
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS	-----
JANIBACTER-SP.-HTCC2649	-----
STREPTOMYCES-AVERMITILIS	-----
KORDIA-ALGICIDA	-----
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME	-----
GEMMATIMONAS-AURANTIACA	-----
PICROPHILUS-TORRIDUS	-----
ARABIDOPSIS-THALIANA	-----
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI	-----
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA	-----
HEVEA-BRASILIENSIS	-----
MEDICAGO-TRUNCATULA	-----
GLYCINE-MAX	-----
SOLANUM-LYCOPERSICUM	-----
SOLANUM-TUBEROSUM	-----
NICOTIANA-BENTHAMIANA	-----
DAUCUS-CAROTA	-----
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES	-----
HORDEUM-VULGARE	-----
TRITICUM-AESTIVUM	-----
AVENA-SATIVA	-----
ORYZA-SATIVA	-----
SORGHUM-BICOLOR	-----
ZEA-MAYS	-----
ABO95005_OLUCIMARINUS	-----
OTAURI	-----
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545	-----
SYNECHOCOCCUS-SP.	-----
VIBRIO-SP.-MED222	-----
MARINOMONAS-SP.-MED121	-----
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS	-----
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1	-----
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597	-----
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS	-----
RATTUS NORVEGICUS	-----KEMGDHLVKHGDGVKDIAFEVEDCEHIVQK
HOMO-SAPIENS	-----KEMGDHLVKHGDGVKDIAFEVEDCDYIVQK
XENOPUS-LAEVIS	-----HPI SDHVAMHGDGVKDVAFSVEDCRGIYKR

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

BLEPHARISMA-JAPONICUS -----NEVNRHVGVKHSQDGVQDIAPFSVSDARGMYEK
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA -----RQTLKAAPLADQARLDEMYDHLDKHGDGVKDVAFEVDDVLAVYEN
ASPERGILLUS-FUMIGATUS -----LDQVDRFPPEEQELLKEIHAHLEKHKHGDGVKDVAFEVDSVDSVIFYA
MAGNAPORTHE-GRISEA -----LPEDEPI SDEDRALLKEMHAHLEKHKGDVAVKDVCFEVDNVQGVYER
CANDIDA-ALBICANS NFIVQTTINNSEEI YNDMMECTLIQKFLKLAEGVMDIAFNVNDVDTIFNR
PICHIA-STIPITIS NLILNVINNSEVIYNDIMECTLIQKFLKTHGEGVMDISFLVEDVITITFDK
RHODOCOCCUS-SP. -----LIDHHRTHGDGVVDIALAVPDVVKCIAH
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS -----LIEHHSRHGDGIRDIALSVPDVKCIAH
JANIBACTER-SP.-HTCC2649 -----LIAHHTKHGDGVVDISLEVPDVKCIAQ
STREPTOMYCES-AVERMITILIS -----GHFLADHVAEHGDGVVDLAI EVPDARAHAHAY
KORDIA-ALGICIDA -----INEHIDLHGDGVKVALVWVEDARSAFEE
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME -----INEHIVKHGDGVKVALVWVEDARSAFEE
GEMMATIMONAS-AURANTIACA -----IAEHVHRHGDGVRDYALVWDDARLAYET
PICROPHILUS-TORRIDUS -----ISNHVKKHGDGVKDIALEVDLDEAKSL
ARABIDOPSIS-THALIANA -----KPTTTASIPSFHDGSCRSFFSSHGLGVRVAIEVEDAESAFSI
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI -----PPTTTASIPSFHDVITYRSFFSSHGLGVRVAIEVEDAEAAFSI
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA -----LHTTASIPTYSHNLARLFASTHGLAVRAIAIEVQDAELAYNI
HEVEA-BRASILIENSIS -----SHTATASIPTFSGEACRNFSAKHGLGVRVAIEVEDEAIEAYNT
MEDICAGO-TRUNCATULA -----PSSTAAIPTFSASTCFSSASHGLAVRAVAIEVEDAEVAFTT
GLYCINE-MAX -----AASSASIPSFDAATCLAFAAKHGFGVRAIAIEVEDAEAAFSI
SOLANUM-LYCOPERSICUM -----TAGIPSFSTPTYRDF TAKHGLGVRVAIEVENAYLAFSA
SOLANUM-TUBEROSUM -----TAGIPSFSTSTHRDFTAKHGLGVRVAIEVENAYLAFSA
NICOTIANA-BENTHAMIANA -----SAAIPSFSTSTHRSFATHGLGVRVAIEVENAYTAFSA
DAUCUS-CAROTA -----SAAIPSFSGSFGHSAKHLAVRAIALEVEDAAAFEA
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES -----SASIPTFSDHRAFTSSHGLAVRAIAIQVDSASSAYSIA
HORDEUM-VULGARE -----TASLPSFSADAARRFSADHGI AVRSVALRVADAEEAFRA
TRITICUM-AESTIVUM -----TASLPSFSADAARRFSADHGLAVRSIALRVADAEEAFRA
AVENA-SATIVA -----TASIPSF SADAARTFAAAHGLAVRSVGVRVADAEEAFRV
ORYZA-SATIVA -----TASIPSFSPGAARRFAADHGLAVHVALRVADAADAFRA
SORGHUM-BICOLOR -----TASLPSFSAAEARRFAADHGLAVRAVALRVADAEDAFRA
ZEA-MAYS -----TAALPSFSAAAARRFAADHGLAVRAVALRVADAEDAFR-
ABO95005_OLUCIMARINUS -----GEAPHPG---HEGRAMMRF FEKHGLAARAVGVRVKDARAAYEE
OTAUARI -----VNVPHPG---NERGAMMRF FERHGLAARAVGLRVGDARAAYEE
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 -----SMFEKSGVLSHDP SPMRTFCERHGLAVRAVCLLVDDAAVAFYT
SYNECHOCOCCUS-SP. -----DEVDRHLQRHGPGVVDVALAVGEQELPALA
VIBRIO-SP.-MED222 -----QAEAFKVVHGSPVCGMAFRVNEATAAMEQ
MARINOMONAS-SP.-MEDI21 -----QSEAFAR IHGSPVCGMAFRVKDASLAMQH
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS -----IASYFAAEHGSPVCGMAFRVKDSQKAYNR
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 -----FAAGFVAEHGPCAPSMGWRVVDQAQKALDH
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 -----HAATFIEEHGPCAPSMGWRVVDQAQHAFDH
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS -----FATDFAKLHGPCVNATGFRVIDADQAFKT

RATTUS_NORVEGICUS ARERGAKIVREPWVEED-----KFGKVKFAVLQTYG-DTHTTLVEK---
HOMO-SAPIENS ARERGAKIMREPWVEQD-----KFGKVKFAVLQTYG-DTHTTLVEK---
XENOPUS-LAEVIS AIERGAKSVREPWEESD-----EFGTVVMATIQTYG-DTHTTFVER---
BLEPHARISMA-JAPONICUS AIAKGCKSFREPQVLQD-----QFGSVIIASLQTYG-DTVHTLVQN---
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA AVANGAESVSSPHTDSC-----DEGDVISAAIKTYG-DTHTTFIQR---
ASPERGILLUS-FUMIGATUS ATNNGAKIVSQPRTLED-----DNGQVRVATIQTYG-ETHTTLVER---
MAGNAPORTHE-GRISEA AVQQGAVSI APPKTLSDK-----EHGSVTMAVIQTYG-DTHTLLSR---
CANDIDA-ALBICANS AIKAGSGIIRLPKII SD-----ENGVVKLATISIPNSDIQHTLIEN---
PICHIA-STIPITIS AVAAGAGIIRLPKII SD-----CNGSVRLGTISIPKTDIQHTLIEN---
RHODOCOCCUS-SP. ARAQGATVLDDEPHDVTD-----DHGTVRLAAIATYG-DTRHTLVDR---
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS AITQGATVLDSEPHDITD-----EHGTVRLASIAIATYG-ETRHTLVDR---
JANIBACTER-SP.-HTCC2649 AKAAGARVVQEAETVSD-----EFGSVRIGAIATYG-ETRHTLVQRTVD
STREPTOMYCES-AVERMITILIS AIEHGARGVAEPYELKD-----EHGTVVLAIAIATYG-KTRHTLVDR---
KORDIA-ALGICIDA TTKRGAKPYMEPTKEED-----ENGVYIRSGIYTYG-ETVHV FVER---
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME TTKRGAKPFMEPEVEKD-----EHGEVVRSGIYTYG-ETVHMFVER---
GEMMATIMONAS-AURANTIACA AIARGAIPIQEPQVYSD-----EHGEVVIAAIGTYG-DTIHSLVER---
PICROPHILUS-TORRIDUS IEKYGTRVS-KINEIKD-----GNGKIRTAEIKTYG-ETVHTLIET---
ARABIDOPSIS-THALIANA SVANGAIPSSPPIVLNE-----AVTIAEVKLYG-DVVLRVYSYKAE
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI SVSNGAVPSSPPIVLND-----AVTIAEVKLYG-DVVLRVYSYKVA
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA SVANGAPSSSPIKLDE-----GVVLSEIQLYG-DVVLRVLSFKNT
HEVEA-BRASILIENSIS SVARGALPMGGPITLDN-----RAVVAEVHLYG-DVVLRVYSYKNS
MEDICAGO-TRUNCATULA SVNLGAIPSSPPIVILEN-----NVKLAEVHLYG-DVVLRVYSYNDL
GLYCINE-MAX SVAKGABFASPPVLVDD-----RTGFAEVRLYG-DVVLRVYSYKDA

```



## CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

SOLANUM-LYCOPERSICUM          SVARGAKPRFEPVTIDE-----HVAVAEVHLYG-DVVLRFVSLVKD
SOLANUM-TUBEROSUM            SVSRGAKPRFEPVTIDE-----HVAVAEVHLYG-DVVLRFVSVFKD
NICOTIANA-BENTHAMIANA       SVSRGAKPMFEPVTIDG-----QVAMAEVHLYG-DVVLRFVMS-LKD
DAUCUS-CAROTA                SVARGARPASAPVELDD-----QAWLAEVELYG-DVVLRFVSVFGR
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES AVSRGAKPVSPVVLADC-----ETAIAEVHLYG-DTFLRFVSCGSG
HORDEUM-VULGARE              SRRRGARPAFAPVDLGR-----GFAPAEVELYG-DVVLRFVSHPDG
TRITICUM-AESTIVUM           SVDGGARPAFSPVDLGR-----GFGFAEVELYG-DVVLRFVSHPDD
AVENA-SATIVA                 SVAGGARPAFAPADLGH-----GFGLAEVELYG-DVVLRFVSYPDE
ORYZA-SATIVA                 SVAAGARPAFQPADLGG-----GFGLAEVELYG-DVVLRFVSHPDG
SORGHUM-BICOLOR             SVAAGARPAFEPVELGL-----GFRLEAEVELYG-DVVLRYVSYRDD
ZEA-MAYS                     -----GFRLEAEVELYG-DVVLRYVSYRDD
ABO95005_OLUCIMARINUS      AVKRGARGVLAFTVLTHTVDDGCAKGGQVIAEIELYG-DVVLRFVNATDG
OTAURI                       AMKRGARGVLEPTEMRHEKHDGCVMTQII SEVELYG-DVVLRFVSRADG
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 SGQHGG-----SPAFSSACDGFAR----VSEVELYG-DVVLRYVSYFHAG
SYNECHOCOCCUS-SP.          ELLRGR-----AQLAWIP-AAAALCLHTPYG
VIBRIO-SP.-MED222          AFKGGGEEYK-TEIGP-----MELSIPIAYGIG-ESLLYFVDRYK
MARINOMONAS-SP.-MED121     ALANGAKEFS-GNLGA-----MELKLPVYIGIG-ESTLYFIDRYGD
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS    ALELGAQPIH-IDTGP-----MELNLPKIGIG-GAPLYLIDRFGE
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 AVSKGAEY-AG-----KVLDPKIGIG-GSLIYFVDQYYD
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 AVKNGATPYE-GDG-----KVMVPAIIGIG-GSLIYFIEDYYE
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS AVARGARPYEGNEHQK-----GATPPFAIYIGIG-DSLIFVMDQKNQ

RATTUS_NORVEGICUS          -INVTG----RFLPGFEAPTYKDT----LLPKLPSCNLEIIDHIVGNQ
HOMO-SAPIENS                -MNYIG----QFLPGYEAPAFMDP----LLPKLPKCSLEMIIDHIVGNQ
XENOPUS-LAEVIS             -TNYKAP--AHVFLPNYRA-CEVDP----INNVLPTVKLLNVDHVGNQ
BLEPHARISMA-JAPONICUS     -VDYTG----PFLPGFRAITKDDP----LNSAFQVNYDIIIDHVGNQ
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA -TTYTG----PFLPGYRSCCTVDS----ANKFLPPVNLEAIDHCVGNQ
ASPERGILLUS-FUMIGATUS     -GSYHG----AFLPGYRMTGVEDP----ISQLLPGVHLNRIIDHCVGNQ
MAGNAPORTHE-GRISEA        -DNFRG----TFLPGFRDVRQPAA----YSALAP-VFLQRIIDHCVGNQ
CANDIDA-ALBICANS          -INVTG----PFLPGFSQPIYPLADYYQVQLNMMPPVNLTVLDHCVENY
PICHIA-STIPITIS           -IDYTG----PFLPNYSESVTQYNSKYDQMQNIPTVSFQCIDHCVENY
RHODOCOCCUS-SP.          -SHYTG----PYLPGYTARTSGHT----KRDGAPKRLFQALDHVGNV
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS  -SRYTG----PYLPGYVERTSSYR----KRDGAPKRIFQALDHVGNV
JANIBACTER-SP.-HTCC2649   GQTYSG----PYLPGYVARSSSFV----KRDGAPKRLFQALDHVGNV
STREPTOMYCES-AVERMITILIS -TGVDG----PYLPGYVAAP-----IVEPPAHTFQAIIDHCVGNV
KORDIA-ALGICIDA           -KNYNG----VFLPGYQRWES-----HYNPEPVGLKFIIDHMVGNV
LEEUVENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME -KNYNG----QFLPGYRKWES-----DYNPEPTGLKYIIDHMVGNV
GEMMATIMONAS-AURANTIACA   -RNYNG----VFLPGFKAVTP-----HYQPSDVLGKYIIDHCVGNV
PICROPHILUS-TORRIDUS     -GDYNG----VFMPGYEESI-----NSKNTGIKKIIDHIVGNV
ARABIDOPSIS-THALIANA      DTE-----KSEFLPGFERVEDASSF-----P-LDYGIRRLDHAVGNV
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI TV-----FLPRFETVDDTSSF-----P-LDYGIRRLDHAVGNV
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA N----QSCP---FLPGFEEVGEVSSS-----RGLDFGIRRLDHAVGNV
HEVEA-BRASILIEINSIS       NP---NQNPFLFPLPGFERVSDSSN-----SSLDGIRRLDHAVGNV
MEDICAGO-TRUNCATULA       APQAPHADPSRWFLPGFEAAASSSF-----PELDYGIRRLDHAVGNV
GLYCINE-MAX               ADTL-----IFLPGFEAMDETSSF-----KELDYGIRRLDHAVGNV
SOLANUM-LYCOPERSICUM     EDSL-----IFLPGFEAMDETSSF-----KELDYGIRRLDHAVGNV
SOLANUM-TUBEROSUM        ADSL-----VFLPGFNAMDETASY-----KELDYGIRRLDHAVGNV
NICOTIANA-BENTHAMIANA     EG-----LFLPGFEAVEGTASF-----PDLDYGIRRLDHAVGNV
DAUCUS-CAROTA             ADG-----WFLPGFEVVGDVSC-----QELDYGIRRLDHAVGNV
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES TDVP-----FLPGFEGVTNP-----DAVDYGLTRFDHVGNV
HORDEUM-VULGARE          TDVP-----FLPGFEGVSNP-----DAVDYGLTRFDHVGNV
TRITICUM-AESTIVUM        TDLP-----FLPGFERVSSP-----GAVDYGLTRFDHVGNV
AVENA-SATIVA              ADAP-----FLPGFEGVSNP-----GAVDYGLRRFDHVGNV
ORYZA-SATIVA              ADAS-----FLPGFVGTSP-----GAADYGLRRFDHVGNV
SORGHUM-BICOLOR          AAGR-----FLPGFEGVASP-----GAADYGLSRFDHVGNV
ZEA-MAYS                  -----FDGDFLCNYSATRDAP-----DVSYGLQRLDHAVGNV
ABO95005_OLUCIMARINUS    -----FDGDFLCNYSATRDAP-----DVSYGLQRLDHAVGNV
OTAURI                     -----FDGDFLCNYSATRDAP-----DVSYGLQRLDHAVGNV
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 EKNA---KPKTFLPGYEDVPLEPHT-----TPLYGLQRLDHAVGNV
SYNECHOCOCCUS-SP.        IRHS-----LIPGPLDAAAEAG-----LFSHWDHVVLNV
VIBRIO-SP.-MED222        -QSIYD---VDFRFYDDAEQRMSEA-----NVGLYEIDHLTHNV
MARINOMONAS-SP.-MED121   -KSIYD---VDFNFYENYQEKMLSH-----QAGLYEVDHLTHNV
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS  GSSIYD---IDFVYLEGVERNVPV-----AGLKVIDHLTHNV
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 -TSPYN---EEDWIAQS--KPA-----VGFYYLDHLTHNV
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 -TSPYN---AEFDWLAQS--KPRG-----VGFYYLDHLTHNV

```

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS      -DKLYN----EIFQVKPED-KAPVG-----VGFTVVDHFTNNV

RATTUS_NORVEGICUS                PDQEMESASEWYLKLNQLQFHRFWSVDDTQVHTEYSSLRISIVVANYEESI KM
HOMO-SAPIENS                      PDQEMVSASEWYLKLNQLQFHRFWSVDDTQVHTEYSSLRISIVVANYEESI KM
XENOPUS-LAEVIS                    PDDMMVPAEWEYKMLMFHRFWSVDDTQMHDTYSALRSIVVTDYDEVI KM
BLEPHARISMA-JAPONICUS            PGGDMTPTVEWYKYLEFHRYSADSVIHTDYSALRSVVVADWDEVI KM
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA       DWDEMSDACDFYERCLGFHRFWSVDDKQICTEYSALKSIVMSSPNQVVKM
ASPERGILLUS-FUMIGATUS            DWDEMCKVCEYYEKALGFHRFWSVDDKQICTEYSALKSIVMASPNEVVKM
MAGNAPORTHE-GRISEA              DWDDMRAACDFYERCLSFHRFWSVDDNQISTDFSALNSIVMASPNNVVKM
CANDIDA-ALBICANS                 SWNQMMQAKLYADMFQFHKYWSVDEDDISTGFTALRSIVMSSNGQIKM
PICHIA-STIPITIS                  ELGKMDHWVDFYNRVMGFTNMAEFVGGDIATDYSALMSKVVSNGNHRVKF
RHODOCOCCUS-SP.                  ELGKMDQWVDFYNRVMGFTNMAEFVGGDIATDYSALMSKVVSNGNHRVKF
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS        ELGKMDQWVDFYNRVMGFTNMAEFVGGDIATDYSALMSKVVSNGNHRVKF
JANIBACTER-SP.-HTCC2649         ELGRMNEWVGFYKVMGFTNMKEFVGGDIATEYSALMSKVVSNGNHRVKF
STREPTOMYCES-AVERMITILIS        ELGRMNEWVGFYKVMGFTNMKEFVGGDIATEYSALMSKVVSNGNHRVKF
KORDIA-ALGICIDA                  GWGEMKEWCFEYAKVMGFAQII SFTDDDDISTDFTALMSKVVSNGNHRVKF
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME GWGEMNTWVKWYEDVMGCFVNFVTFDDKQITTEYSALMSKVVSNGNHRVKF
GEMMATIMONAS-AURANTIACA         ELGKMNQWVGYADVLFGRNLI TFDDTDINTEYSALMSKVVSNGNHRVKF
PICROPHILUS-TORRIDUS            YEGEMDSWVNFYIEKLGFEHLI TFDDKDIRTDYSALRSKVVKY--NDDIVF
ARABIDOPSIS-THALIANA            P--ELGPALTYVAGFTCFHQFAEFTADDVGTAE SGLNSAVLASNDEMVL L
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI  P--ELGPALTYLRLTCFHQFAEFTADDVGTAE SGLNSAVLANNDET VLL
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA  P--NLAEAIGYLKEFTCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSIVLASNDEMVL L
HEVEA-BRASILIENSIS              P--ELAPAVSVKKEFTCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSIVLANNEDTVL L
MEDICAGO-TRUNCATULA             P--ELSSAVKRYKQFTCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSIVLANNEETV L L
GLYCINE-MAX                      P--ELAPAVRYLKGFGCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSIVLANNSETV L L
SOLANUM-LYCOPERSICUM            P--ELGPVVDYI KAFTCFHEFAEFTAEDVGTAE SGLNSVLANNDET VLL
SOLANUM-TUBEROSUM               P--ELGPVVDYI KEFTCFHEFAEFTAEDVGTAE SGLNSVLANNDET VLL
NICOTIANA-BENTHAMIANA           P--ELGPAVDYI KRFTCFHEFAEFTSEDVGTAE SGLNSMVVANNDET VLL
DAUCUS-CAROTA                   T--ELGPVVEYI KGFTCFHEFAEFTAEDVGTLE SGLNSVLANNEEMV L L
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES    P--KLEPVVDYLLKFTCFHEFAEFTAEDVGTAE SGLNSVLANNNENV L F
HORDEUM-VULGARE                 P--ELAPAAAYI AGFTCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSVLANNSEGVL L
TRITICUM-AESTIVUM              P--ELAPAAAYVAGFACFHEFAEFTTEDVGTAE SGLNSMVLANNSEGVL L
AVENA-SATIVA                    P--EMAPVIDYMKGFLCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSVLANNSEAVL L
ORYZA-SATIVA                     P--ELAPVAAAYI SGFTCFHEFAEFTAEDVGTAE SGLNSVLANNAETV L L
SORGHUM-BICOLOR                 P--ELAPAAAYFAGFTCFHEFAEFTAEDVGTESGLNSMVLANNAENVL L
ZEA-MAYS                         P--ELAPAAAYFAGFTCFHEFAEFTTEDVGTAE SGLNSMVLANNSENVL L
ABO95005_OLUCIMARINUS          H--DLIETVDYI TKVTCFHEFAEFTAEDIGTID SGLNSMVLANNNEYV L L
OTAURI                           H--NLLETVDYIMKITCFHEFAEFTAEDIGTID SGLNSMVLANNNEYV L L
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545     P--NLLETVDYI TAMTGMHEFAEFTAEDVGTVD SGLNSMVLANDDEMIL L
SYNECHOCOCCUS-SP.              EQGSLQAADWYGRVLCWRRLYRS---IGTATSGLESVVVGDPEAGIQW
VIBRIO-SP.-MED222                KQGNMDVWSGFYERLGNFREIRYFDIEGKLTG---LVSRAMTSPCGKIRI
MARINOMONAS-SP.-MEDI21          MRGNMDHWAGFYENIGNFREIRYFDIEGKLTG---LVSRAMTSPCGKIRI
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS        YRGRMVYWANFYEKLNFREARYFDIKGEYTG---LTSKAMSAPDGMIRI
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1     FKGNMDVWFKFYGDLFNFREIRFFDIEGKFTG---LTSRALTSPCGRIRI
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597  FKGNMDTWFRFYGDLFNFREIRFFDIQKGYTG---LFSRALTSPCGRIRI
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS     PKGEMDKWQHIFYEDI FGFYEAKEYFDIRGSKTG---LLSRAMRSPCGKFSV

RATTUS_NORVEGICUS                PINEPAPGRK-KSQIQEYVDYNGGAGVQHIALRTEDIITTIRHLRER---
HOMO-SAPIENS                      PINEPAPGKK-KSQIQEYVDYNGGAGVQHIALKTEDIITAIRHLRER---
XENOPUS-LAEVIS                    PINEPAPGKK-KSQIQEFVEYGGAGVQHIALRTDDILRDVSAMRAR---
BLEPHARISMA-JAPONICUS            PINEPADGLR-KSQIQEYVEYGGAGVQHIALKVNDIISVISTLRAR---
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA       PINEPAHGKK-KSQIEEYVDFYNGPGVQHIALRTPNIIIEAVSNLRSR---
ASPERGILLUS-FUMIGATUS            PINEPAKGGK-QSQIEEYVDFYNGAGVQHIALLTDDIIRDTINLKR---
MAGNAPORTHE-GRISEA              PINEPAKGGK-RSQIEEYVTFNSGAGVQHIALLTSDIITTEVAMRSR---
CANDIDA-ALBICANS                 PINEPVKSTM-KSQIEFFNDFNGGPGIQHTAFRTNNIIFVTVAIMQR---
PICHIA-STIPITIS                  PINEPVKSKM-RGQIEEFHDFNGGPGVQHIALRTNDIIDTVCALLAR---
RHODOCOCCUS-SP.                  PLNEPALAKK-RSQIDEYLDYRGPQAQHLALATNDILTAVDQLTAE---
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS        PLNEPAIAKK-RSQIDEYLEFYQPGAQHLALATNDILGAVDALVDE---
JANIBACTER-SP.-HTCC2649         PLNEPAIAKK-RSQIDEYLDYFQPGAQHLAVATNDILRSVDELRLKE---
STREPTOMYCES-AVERMITILIS        PINEPALAKK-KSQIDEYLEFYGGAGVQHIALNTGDIVETVRTMAA---
KORDIA-ALGICIDA                  PINEPAEGKK-KSQIEEYLDYFNGSGVQHIAVATDDIIDTVSQMRER---
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME PINEPAEGIK-KSQIEEYLDYFYGPGAQHLAVATDDIVKTVAALKAR---
GEMMATIMONAS-AURANTIACA         PINEPASGKK-KSQIEEYLDYFYGPGAQHLALATDDILATVTLALDR---
PICROPHILUS-TORRIDUS            PINEPAKGLR-KSQIEEYLDYRSEGVQHIALLTDDIIKTVSMMEEN---

```

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

ARABIDOPSIS-THALIANA          PINEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGLQHLALMSEDI FRTLREMRKRSS-
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI PVNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALMSEDI FRTLREMRKRSG-
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA PMNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVSEDI FTTLREMRRRRSG-
HEVEA-BRASILIENSIS            PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGLQHLALVSEDI FKTLEMRRRRSG-
MEDICAGO-TRUNCATULA          PMNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGLQHLALMSADI FRTLREMRKRSG-
GLYCINE-MAX                   PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVTHDI FTTLREMRKRSSF-
SOLANUM-LYCOPERSICUM         PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVTEDI FRTLREMRKRSG-
SOLANUM-TUBEROSUM            PMNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVTEDI FRTLREMRKRSG-
NICOTIANA-BENTHAMIANA        PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVTEDI FKTLEMRKRSG-
DAUCUS-CAROTA                 PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALVSEDI FRTLREMRKRSC-
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES PLNEPVYGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHLALITEDI FRTLREMRKRSE-
HORDEUM-VULGARE              PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHI AVASSDVLRTLRKMRARSA-
TRITICUM-AESTIVUM            PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHI AVASSDVLRTLRKMRARSA-
AVENA-SATIVA                  PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHI ALASNDVLRTLRKMRARSA-
ORYZA-SATIVA                  PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHI ALASDDVLGTLRKMRARSA-
SORGHUM-BICOLOR              PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHMALASDDVLRTLRKMRARSA-
ZEA-MAYS                       PLNEPVHGTKRKRSQIQTYLEHNEGAGVQHMALASDDVLRTLRKMRARSA-
ABO95005_OLUCIMARINUS        PVNEPTFGTKRKSQIQTYLEHNEGAGLQHLALKTDDI FATVREMRKRYSHL
OTAURI                          PVNEPTFGTKRKSQIQTYLEHNEGAGLQHLALKTDDI FTTVREMRKRYSHM
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545   PVNEPTFGTKRKSQIQTYLEHNEGAGLQHLALKTDDI FATVREMRKRYSHM
SYNECHOCOCCUS-SP.            AINEPTCAAS---QIQEFLHAGGGPGIQHAAALHSSDIVAGLRRLR----
VIBRIO-SP.-MED222             PINE-SSDDK--SQIEEFIREYNGEGIQHIALATDDIYKTVKTLRDR---
MARINOMONAS-SP.-MEDI21       PINE-SSDDK--SQIEEFNLQYNGEGIQHIAMSSSDIYETVRQLKAG---
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS      PLNEESSKGA--GQIEEFMLQFNQEGIQHVAFILTDLVLKTKWDALKKI---
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1   PINE-DRDEK--GQIVAYLKKYNGEGIQHIAVGARNIYDATDAIADN---
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 PINE-DRGET--GQIVAYLKKYNGEGIQHIAVGARDIYAATDAIAEN---
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS   PINE-PTEEK--SQIQEYLDYKSGSIQHIALLLTHDINYSLESLKNS---

RATTUS_NORVEGICUS            --GMEFLAVP-SSYYRIL-----RENLKTSK--IQVKEN----MDV
HOMO-SAPIENS                  --GLEFLSVP-STYYKQL-----REKLKTAK--IKVKEN----IDA
XENOPUS-LAEVIS                --GLEFLTIP-RTYYKNL-----RARLSMSK--VQVEED----LAE
BLEPHARISMA-JAPONICUS        --GVEFLEVP-PKYDSDL-----RKRLAHS--VQIEED----LKR
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA    --GVEFISVP-DTYYENM-----RLRLKAAG--MKLEES----FDI
ASPERGILLUS-FUMIGATUS        --GVEFIKVP-DTYYEDI-----KVRLKAG--LTLHED----FET
MAGNAPORTHE-GRISEA           --GVEFIEVP-HTYYDTM-----RRRLKTEKRDWELQED----FDR
CANDIDA-ALBICANS              --GVEFNHTS-ENYNNNL-----KQRLNNDG--IKLYED----FDT
PICHIA-STIPITIS               --GIEFNHTS-DKYTNL-----ERLREDD--VALFED----FDT
RHODOCOCCUS-SP.              --GVEFLATP-DSYYEDP-----ELRARI--NVRAP----IAE
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS     --GIEFLSTP-ASYEDP-----ELRARI--EVRVP----IEE
JANIBACTER-SP.-HTCC2649       --GVEFLDTP-DAYYDEP-----EMRARI--EVRVP----IEE
STREPTOMYCES-AVERMITILIS     --GVQFLDTP-DSYYDT-----LGEWVG--DTRVP----VDT
KORDIA-ALGICIDA               --GVEFLYVP-DTYYDD-----LLERVG--DIDED----VEE
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME --GVEFLPPPQAYYDD-----IPRRLGAHMDTKED----LNK
GEMMATIMONAS-AURANTIACA      --GVEFLSVP-TSYYED-----LQERVG--KIDK----LEE
PICROPHILUS-TORRIDUS         --GIEFLKTP-GSYYES-----LSSRIG--SIDED----LNE
ARABIDOPSIS-THALIANA          IGGFDFMPSPPPTYQN-----LKKRVG--DVLSD--QIKE
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI VGGFDFMPSPPPTYKN-----LKNRVG--DVLSE--QIEE
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA VGGFEFMPSPPTTYKN-----LKNRAG--DVLSD--QIKE
HEVEA-BRASILIENSIS            VGGFDFMPSPPPTYRN-----LKNRVG--DVLTD--QIKE
MEDICAGO-TRUNCATULA          VGGFEFMPSPPVTYRN-----LKNRVG--DVLSD--QIKE
GLYCINE-MAX                    LGGFEFMPSPPTTYAN-----LHNRAA--DVLTV--QIKQ
SOLANUM-LYCOPERSICUM         VGGFEFMPAPPTTYKN-----LRSRAG--DVLSD--QIQ
SOLANUM-TUBEROSUM            VGGFEFMPSPPTTYKN-----LKSAG--DVLSD--QIQ
NICOTIANA-BENTHAMIANA        VGGFEFMPSPPTTYKN-----LKNRAG--DVLTD--QIQ
DAUCUS-CAROTA                 LGGFEFMPSPPTTYKN-----LKNRVG--DVLSD--QIKE
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES VGGFEFMPSPPTTYRN-----LKSAG--DVLSD--QIEE
HORDEUM-VULGARE              MGGFDFLPPPLPKYYEC-----VRRLAG--DVLSEA--QIKE
TRITICUM-AESTIVUM            MGGFDFLPPPCRKYEC-----VRRAG--DVLSEA--QIKE
AVENA-SATIVA                  MGGFEFMAPPAKYEC-----VRRAG--DVLSEE--QIKE
ORYZA-SATIVA                  MGGFEFLAPPNNYDC-----VRRAG--DVLSEE--QINE
SORGHUM-BICOLOR              MGGFEFMAPPEYDC-----VRRAG--DVLTEA--QIKE
ZEA-MAYS                       MGGFEFMAPPTSDYDC-----VRRAG--DVLTEA--QIKE
ABO95005_OLUCIMARINUS        RGGFDFQAPASDDYKQ-----LKAKIG--DALNDE--QYAL
OTAURI                          HGGFDFQAPASDDYKH-----LKEKIG--DALTEA--QYAL
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545   RGGFEFQKASADYAN-----LKAARVGE--DALTEA--QFKE

```

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

SYNECHOCOCCUS-SP.          OGGVDFLQVAP-QYYTS-----LERELGL--ALRSALGQAISWQD
VIBRIO-SP.-MED222          --GMDFMPTP-DTYYEKVDDRVRKGHG-----ED-----TDL
MARINOMONAS-SP.-MED121    --GLKFMSTP-DTYYAKVNDRVVGHG-----ED-----LEK
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS   --GMRFMTAPPDTYYEMLEGRLPDHG-----EP-----VDQ
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 --GLKFMPPPETYYKMSKDRVTGHQ-----EP-----LDR
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 --GVTYMPGPPDAYYDMSHDRVVDHG-----EP-----IDR
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS --EIQFLTTPPHSYEMIPERVPGVT-----ED-----ISR

RATTUS_NORVEGICUS         LEELKILVDYD-----EKGYLLQIFTKPMQDRPTLFLEVI
HOMO-SAPIENS               LEELKILVDYD-----EKGYLLQIFTKPVQDRPTLFLEVI
XENOPUS-LAEVIS             IEKLSILVDFD-----EEGYLLQIFTKPLEDRPTLFIEII
BLEPHARISMA-JAPONICUS     IEDLHILVDFD-----DRGYLLQIFTKPVEDRPTLFYEII
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA IQKLNILIDFD-----EGGYLLQLFTKPLMDRPTVFIEII
ASPERGILLUS-FUMIGATUS     IRSLDILIDFD-----EGGYLLQLFTKHLMDRPTVFIEII
MAGNAPORTHE-GRISEA        LVRNNILIDYD-----EGGYLLQLFTRPLMDRPTVFIEII
CANDIDA-ALBICANS          LRSLNILIDYDPSTKPKPKSKRKRNNKCNLLQIFSKPLHDRPTLFIEII
PICHIA-STIPITIS           LRKLNILVDYDI STR-----NKKGTGICNYLLQIFTKPLHDRPTLFIEII
RHODOCOCCUS-SP.           LQKRGILVDRD-----EDGYLLQIFTKPLVDRPTVFIEII
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS  LQKRGILVDRD-----EDGYLLQIFTKPIGDRPTVFIEII
JANIBACTER-SP.-HTCC2649   LKSRKILVDRD-----EDGYLLQIFTKPLGDRPTVFIEII
STREPTOMYCES-AVERMITILIS  LRELKILADR-----EDGYLLQIFTKPVQDRPTVFIEII
KORDIA-ALGICIDA           LKKHGILIDRD-----EEGYLLQLFTKTIVDRPTMFFFEVI
LEEUEWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME LQELSILVDAD-----EEGYLLQIFTKPLQDRPTLFIEII
GEMMATIMONAS-AURANTIACA   LAALGILVDRD-----PDGYLLQIFTKPVEDRPTLFIEII
PICROPHILUS-TORRIDUS      IEKHNILVDRD-----ENGYLLQIFTKPVTDRPTMFFFEVI
ARABIDOPSIS-THALIANA      CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPLGDRPTIFIEII
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPLGDRPTIFIEII
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA CEELGILVDR-----DAQGTLLQIFTKPVGDRPTIFVEII
HEVEA-BRASILIENSIS        CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTIFIEII
MEDICAGO-TRUNCATULA       CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPIGDRPTIFIEII
GLYCINE-MAX                CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTIFIXII
SOLANUM-LYCOPERSICUM      CEELGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTIFIEII
SOLANUM-TUBEROSUM         CEDLGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTIFIEII
NICOTIANA-BENTHAMIANA     CEDLGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTIFIEII
DAUCUS-CAROTA              CEDLGILVDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTLFIEII
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES CEKLGILIDR-----DDQGTLLQIFTKPVGDRPTLFIEII
HORDEUM-VULGARE            CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTLFLEMI
TRITICUM-AESTIVUM         CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTLFLEMI
AVENA-SATIVA               CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEMI
ORYZA-SATIVA               CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEMI
SORGHUM-BICOLOR           CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTLFLEII
ZEA-MAYS                   CQELGVLVDR-----DDQGVLLQIFTKPVGDRPTLFLEII
ABO95005_OLUCIMARINUS     VEELGLLVDR-----DDQGVLIQVFTKPVGDRPTLFLEII
OTAURI                     VEELGLLVDR-----DDQGVLIQVFTKPVGDRPTLFLEII
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 VEELGLLVDR-----DDQGVLVQIFTKPLGDRPTVFIEII
SYNECHOCOCCUS-SP.         LVEQQILLDATLPASDG-----QDRPLLQFTQPLFGRPTFFFEVI
VIBRIO-SP.-MED222         LRDLRVLIDGAPTKDG-----ILLQIFQTQTVIG--PVFFFEII
MARINOMONAS-SP.-MED121    LQDLNILIDGAPLKD-----TLLQIFDTQTVIG--PVFFFEII
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS   LQARGILLDSSVEGDK-----RLLQIFSETLMG--PVFFFEFI
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 MKKHGILIDGEGVVDGGE-----TRILLQIFSKTVIG--PIFFFEFI
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 MTKKHGILIDGEGVVDGGE-----TRILLQIFSKTVIG--PIFFFEFI
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS LEKNAILVDGD--KTG-----KYLQIFTKNTFG--PIFYELI

RATTUS_NORVEGICUS         QRHN-----HQGFGAGNFNSLFKAFEEEEQALRGN
HOMO-SAPIENS               QRHN-----HQGFGAGNFNSLFKAFEEEEQNLRGN
XENOPUS-LAEVIS             QRHN-----HQGFGAGNFKALFESIFMEQATRGN
BLEPHARISMA-JAPONICUS     QRHN-----NNGFGIGNFKALFESLEQEQRGRGN
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA QRNN-----FDGFGAGNFKSLFEAIEREQDLRGN
ASPERGILLUS-FUMIGATUS     QRHN-----FSGFGAGNFKSLFEAIEREQALRGN
MAGNAPORTHE-GRISEA        QRNE-----FDGFGAGNFKSLFEAIEREQAERGN
CANDIDA-ALBICANS          QRHH-----HNGFGKGTFFKGLFESIEEQKLRGT
PICHIA-STIPITIS           QRHH-----HNGFGKGTFFKGLFETIEEQRIRGT
RHODOCOCCUS-SP.           ERHG-----SLGFGIGNFKALFEAIEREQAARGN
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS ERHG-----SLGFGIGNFKALFEAIEREQAARGN
JANIBACTER-SP.-HTCC2649   ERHG-----SLGFGKGNFKALFESIEREQDARGN

```

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

STREPTOMYCES-AVERMITILIS	ERHG-----SMGFGKGNFKALFEAIEREQEKRGH
KORDIA-ALGICIDA	QRKG-----AQSGFGVGNFKALFEAIEREQAARGT
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME	QRMG-----AKGFGAGNFKALFESIEREQAQRGT
GEMMATIMONAS-AURANTIACA	QRKG-----ATSGFGKGNFRALFEAIEREQELRGN
PICROPHILUS-TORRIDUS	QRKG-----ARSGFGNGNFKALFEAIEREQAKRGN
ARABIDOPSIS-THALIANA	QRVGCMMKDEEGKA-----YQSGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI	QRIGCMKKDEEGRV-----YQSGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA	QRLGCMMLKDEEGKT-----YQKAGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
HEVEA-BRASILIANENSIS	QRVGCMIKDETGKE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
MEDICAGO-TRUNCATULA	QRVGCMLKDEEGKE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL ET
GLYCINE-MAX	QRIGCMVEDEEGKV-----YQKACCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
SOLANUM-LYCOPERSICUM	QRIGCMMLKDEKGQV-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKML EA
SOLANUM-TUBEROSUM	QRIGCMMLKDENGQV-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKML EA
NICOTIANA-BENTHAMIANA	QRIGCMMLKDEKGQV-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL --
DAUCUS-CAROTA	QRVGCMLKDDAGQM-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKTL EA
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES	QRVGCMMKDEEGKM-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKML ES
HORDEUM-VULGARE	QRIGCMEKDERGEE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EDY EKSLEA
TRITICUM-AESTIVUM	QRIGCMEKDERGEE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EDY EKSLEA
AVENA-SATIVA	QRIGCMEKDEVGQE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EDY EKSLEV
ORYZA-SATIVA	QRIGCMEKDESGQE-----YQKGGCGGFGKGNFSELFKSI EYEKSL EA
SORGHUM-BICOLOR	QRIGCMEKDEKGQE-----YQKGGCGGFGKGNFSQLFKSI EDY EKSLEA
ZEA-MAYS	QRIGCMEKDEKGQE-----YQKGGCGGFGKGNFSQLFKSI EDY EKSLEA
ABO95005_OLUCIMARINUS	QRIGCMRRKADSES-----FEQAAGCGGFGKGNFSELFKSI EYAEATLQI
OTAUARI	QRVGCMRKKADTDE-----LEQVAGCGGFGKGNFSELFKSI EYAEKTLNI
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545	QRIGCLREVKSDANAPPRIEQAGGCGGFGKGNFSELFKSI ENYERTLKM
SYNECHOCOCCUS-SP.	QRLG-----GATGFGEANFQALFEALERQQRQRHQ
VIBRIO-SP.-MED222	QRKG-----NEGFGEGNFKALFESIEEDQIRRGV
MARINOMONAS-SP.-MED121	QRKG-----NEGFGEGNFKALFESIEEDQIRRGV
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS	QRKG-----DDGFGEGNFKALFESIERDQVRRGV
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1	ERKG-----DDGFGEGNFKALFESIEEQEIDSGE
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597	QRKG-----DDGFGEGNFKALFESIEEQEIDNGE
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS	QRKG-----HDGFGDGNFQALFDAIERDQREGRY
RATTUS_NORVEGICUS	LTDLETNGVRSGM-----
HOMO-SAPIENS	LTNMETNGVVPGMAENLYFQ
XENOPUS-LAEVIS	L-----
BLEPHARISMA-JAPONICUS	LI-----
MYCOSPHAERELLA-GRAMINICOLA	L-----
ASPERGILLUS-FUMIGATUS	LV-----
MAGNAPORTHE-GRISEA	L-----
CANDIDA-ALBICANS	FVKSQNN-----
PICCHIA-STIPITIS	LVQVDEDDDSQQST-----
RHODOCOCCUS-SP.	F-----
RHODOCOCCUS-ERYTHROPOLIS	F-----
JANIBACTER-SP.-HTCC2649	L-----
STREPTOMYCES-AVERMITILIS	L-----
KORDIA-ALGICIDA	L-----
LEEUWENHOEKIELLA-BLANDENSIS-ME	L-----
GEMMATIMONAS-AURANTIACA	L-----
PICROPHILUS-TORRIDUS	L-----
ARABIDOPSIS-THALIANA	KQLVG-----
BRASSICA-RAPA-SUBSP.-PEKINENSI	KQLVG-----
COPTIS-JAPONICA-VAR.-DISSECTA	KANVVAA-----
HEVEA-BRASILIANENSIS	KRNAEAR-----
MEDICAGO-TRUNCATULA	RRTA-----
GLYCINE-MAX	KRTA-----
SOLANUM-LYCOPERSICUM	KHVNQVAAVE-----
SOLANUM-TUBEROSUM	KHVNQVAAA-----
NICOTIANA-BENTHAMIANA	-----
DAUCUS-CAROTA	KQITGSAAA-----
SOLENOSTEMON-SCUTELLARIOIDES	KLVTKTAMA-----
HORDEUM-VULGARE	KQSAAVQGS-----
TRITICUM-AESTIVUM	KQSAAVQGS-----
AVENA-SATIVA	KQSVVAQKS-----

CLUSTAL X (1.81) alineación de secuencias múltiples

```

ORYZA-SATIVA          KQAPTVOGS----
SORGHUM-BICOLOR       KQAAAAQGS----
ZEA-MAYS              KQAAAAAAQGS-
ABO95005_OLUCIMARINUS -----
OTAURI                -----
MICROMONAS-PUSILLA-CCMP1545 -----
SYNECHOCOCCUS-SP.    ALTP-----
VIBRIO-SP.-MED222     LDDA-----
MARINOMONAS-SP.-MED121 LND A-----
PSEUDOMONAS-FLUORESCENS LATD-----
SULFITOBACTER-SP.-NAS-14.1 LSEA-----
OCEANICOLA-BATSENSIS-HTCC2597 IAAE-----
BDELLOVIBRIO-BACTERIOVORUS LT-----
    
```

La identidad de secuencia general entre secuencias individuales de HPPD de longitud total es, en general, bastante baja y se muestra para las proteínas de HPPD representativas en la Tabla 3. La Tabla 4a muestra la alineación de secuencias de la bolsa de unión. Por el contrario, la identidad de secuencia de los 36 aminoácidos que forman el sitio de unión es significativamente mayor que la que se muestra para las proteínas de HPPD representativas en la Tabla 4b. En particular, los aminoácidos en 8 posiciones se conservan de forma estricta en todas las especies e ilustran que estos aminoácidos tienen un papel clave (por ejemplo, His226, His308, Glu394 que se unen con el hierro requerido para la catálisis). Estas posiciones, con referencia a la HPPD de Arabidopsis (SEC ID N.º: 2) son His226, Ser267, Asn282, His308, Tyr342, Glu394, Gly420, Asn423 (Tabla 5a). Una mutación de cualquiera de los aminoácidos en cualquiera de estas posiciones llevará más probablemente a una proteína inactiva. La variabilidad en otras posiciones dentro del sitio de unión es más alta. La Tabla 5b muestra las 28 posiciones variables en el sitio de unión y los aminoácidos que se identificaron en estas posiciones usando la alineación de secuencias. Algunas posiciones tienen solo una variabilidad limitada que refleja su papel en el ambiente 3D. Un ejemplo de ello está representado por la posición 269. Todas las proteínas de HPPD tienen en esta posición ya sea Val, Ala o Thr. Observando las estructuras 3D, parece que en esta posición se requiere un aminoácido apolar pequeño y una mutación en un aminoácido polar como Arg, His o Lys perturbará la estructura proteica de forma local. Otro ejemplo está representado por la posición 379. La mayoría de las secuencias tienen una glutamina en la posición 379. Sin embargo, también hay algunas secuencias bacterianas que tienen una histidina en esta posición. Observando la estructura 3D, parece que solo algunos aminoácidos se toleran en esta posición. Gln379 en *A. thaliana* estabiliza a través de su donante de enlace de H la conformación de la cadena lateral de Glu394 estrictamente conservado que a su vez interactúa con el hierro catalítico. Además, con sus aceptores de enlace de H, Gln379 estabiliza la conformación de la cadena lateral de Asn423 estrictamente conservada que a su vez interactúa con la Tyr342 estrictamente conservada. Solo glutamina, asparagina e histidina tienen un donante de enlace H y un aceptor requerido para la estabilización de esta disposición 3D particular que muy probablemente desempeña un papel clave en la interacción de la hélice C-terminal con el núcleo de la proteína de HPPD. También se observó una variabilidad limitada en la posición 381 bien con una fenilalanina o bien con una tirosina en todas las secuencias de HPPD. El anillo aromático estabiliza la unión de los inhibidores de HPPD y muy probablemente también la unión del sustrato con la unión de HPPD. Sin embargo, la presencia del grupo hidroxilo adicional en la tirosina en comparación con fenilalanina no perturba la actividad catalítica. La tercera categoría de posiciones incluye aquellas posiciones que muestran una variabilidad natural muy alta. Estas posiciones pueden no ser cruciales para la unión con el sustrato y la catálisis pero influyen sobre la unión con el inhibidor. Estas posiciones incluyen posiciones adyacentes en la cadena 248 a 255 y posiciones en la hélice C-terminal 419-427. Se puede asumir que la interacción de esta cadena particular y la hélice C-terminal con el núcleo de la proteína desempeña un papel crucial en la unión con el inhibidor. La Tabla 5b incluye para cada posición variable aquellos aminoácidos que se han identificado en las alineaciones de secuencias usando todas las secuencias de HPPD conocidas.

Tabla 3: identidad de secuencia a pares de las secuencias de HPPD a partir del grupo representativo de proteínas de HPPD

Table with 5 columns: Organism Name, and 48 numerical columns representing sequence alignment data for various species.

Tabla 4a: alineación de secuencias de aminoácidos que forman la bolsa de unión en el grupo representativo de secuencias de HPPD

Table with 2 columns: Organism Name (left) and Amino Acid Sequence (right), showing the alignment of amino acid sequences for 38 different species.





ES 2 588 918 T3

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Streptomyces avermitilis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido	Posición	Amino-ácido
282	N	217	N	245	N	241	N	241	N
308	H	241	H	270	H	266	H	266	H
342	Y	271	Y	299	Y	295	Y	295	Y
394	E	323	E	349	E	349	E	349	E
420	G	334	G	360	G	360	G	360	G
423	N	337	N	363	N	363	N	363	N

Tabla 5b: posición de aminoácidos con los aminoácidos en estas posiciones en las estructuras cristalinicas conocidas y los aminoácidos en estas posiciones dentro de todas las secuencias de HPPD

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Streptomyces avermitilis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Rattus norvegicus</i>		Variabilidad natural	
Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Aminoácido	
228	V	164	T	189	V	185	V	185	V	VTCAG	
248	H	186	R	211	T	207	H	207	H	HRQTKAYLAGSN	
250	F	188	A	213	M	209	F	209	F	FYILVAQEDGTSMRK	
251	A	189	R	214	K	210	W	210	W	AWILSRKHDEPGNY	
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S	ESTYFHQNGLMVILIR	
253	F	191	F	216	F	212	V	212	V	FVIALWMOQHY	
265	L	200	L	228	L	224	L	224	L	LMVIA	
268	A	203	K	231	K	227	I	227	I	AVLMIKRQY	
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V	VAT	
270	L	205	M	233	V	229	V	229	V	LVMIA	
271	A	206	S	234	A	230	A	230	A	ASTVRKELIMHG	
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P	PAVINI	
293	Q	226	Q	255	Q	251	Q	251	Q	QLAVRSGVFM	
294	I	227	I	256	I	252	I	252	I	IMVIASP	
307	Q	240	Q	269	Q	265	Q	265	Q	QHN	
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L	MLIN	
368	L	295	L	323	L	323	L	323	L	LM	
379	Q	310	Q	334	Q	334	Q	334	Q	QH	
381	F	312	F	336	F	336	F	336	F	FY	
392	F	321	F	347	F	347	F	347	F	FS	
419	F	333	F	359	F	359	F	359	F	FY	
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A	KQAILVNDEGS	
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G	GAPVIM	
424	F	338	F	364	F	364	F	364	F	FAVIL	
425	S	339	K	365	K	365	N	365	N	SNKGRAPSIKQR	
426	E	340	A	366	A	366	S	366	S	EQSAIVFT	
427	L	341	L	367	L	367	L	367	L	LR	
431	I	345	I	371	I	371	F	371	F	IFVMLQR	

Tabla 5c: posición de aminoácidos con los aminoácidos en estas posiciones en las estructuras cristalinas conocidas y aminoácidos más comunes en estas posiciones dentro de todas las secuencias de HPPD

Arabidopsis thaliana		Pseudomonas fluorescens		Streptomyces avermitilis		Homo sapiens		Rattus norvegicus		Más común	
Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Pos.	Aminoácido	Aminoácido	
228	V	164	T	189	V	185	V	185	V	VTCA	
248	H	186	R	211	T	207	H	207	H	HRQTKEYA	
250	F	188	A	213	M	209	F	209	F	FYILVAEDTM	
251	A	189	R	214	K	210	W	210	W	AWILRKHDEPY	
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S	ESTRY	
253	F	191	F	216	F	212	V	212	V	FVIALWY	
265	L	200	L	228	L	224	L	224	L	LMVA	
268	A	203	K	231	K	227	I	227	I	AVLMIKRQY	
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V	VA	
270	L	205	M	233	V	229	V	229	V	LVMI	
271	A	206	S	234	A	230	A	230	A	ASTVREGK	
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P	PAVI	
293	Q	226	Q	255	Q	251	Q	251	Q	QLA	
294	I	227	I	256	I	252	I	252	I	IMVA	
307	Q	240	Q	269	Q	265	Q	265	Q	QHN	
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L	MLI	
368	L	295	L	323	L	323	L	323	L	LM	
379	Q	310	Q	334	Q	334	Q	334	Q	QH	
381	F	312	F	336	F	336	F	336	F	FY	
392	F	321	F	347	F	347	F	347	F	F	
419	F	333	F	359	F	359	F	359	F	FY	
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A	KQAVLDE	
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G	GA	
424	F	338	F	364	F	364	F	364	F	FAVL	
425	S	339	K	365	K	365	N	365	N	SNKRAIQ	
426	E	340	A	366	A	366	S	366	S	ESAIVF	
427	L	341	L	367	L	367	L	367	L	LR	
431	I	345	I	371	I	371	F	371	F	IFVMQRL	

5 No todos los aminoácidos que se producen en las posiciones variables tienen la misma probabilidad de estar presentes en una proteína activa. En algunos casos la mayoría de las secuencias tienen los mismos aminoácidos en una posición particular mientras que otros aminoácidos están presentes en la posición en solo algunas pocas secuencias de HPPD. Un ejemplo es la posición 392. La mayoría de las secuencias tiene en una correspondiente posición una fenilalanina mientras que algunas, es decir, las secuencia de *Burkholderia* tienen una serina. Si bien, en algunos casos raros, los aminoácidos raros pueden ser el resultado de un error de secuenciación, en la mayoría de los otros casos, la proteína resultante es activa. La Tabla 5c muestra una lista con los aminoácidos más comunes en las posiciones variables.

10 La influencia de los aminoácidos en las posiciones variables es diferente. Algunas de estas posiciones son cruciales para la catálisis y/o la interacción de HPPD con un inhibidor mientras que otras pueden tener un menor impacto. Por ejemplo los cambios en las posiciones 269 y 280 que están en contacto directo con el inhibidor y el sustrato tendrán muy probablemente un gran impacto sobre la catálisis y la unión con el inhibidor. Además las modificaciones en las posiciones implicadas en el movimiento de la hélice inducido por el inhibidor o la unión con el sustrato tales como las posiciones 252, 421 y 422 probablemente tengan un alto impacto sobre la unión con el inhibidor. Por el contrario las modificaciones en las posiciones como 293 influyen menos probablemente en la unión con el inhibidor porque esta posición está bien alejada del sitio activo. La Tabla 6a muestra la posición con muy alto impacto y la Tabla 6b con alto impacto sobre la actividad y la unión con el inhibidor.

15 A partir de estas observaciones, los autores de la presente invención sacaron la conclusión de que los aminoácidos se prefieren en los sitios de unión que se producen de forma natural en las posiciones correspondientes. Esto significa, que esas modificaciones que intercambian un aminoácido que se da en la naturaleza en otro proporcionan probablemente una proteína de HPPD catalíticamente activa que puede ejercer una tolerancia modificada o incluso incrementada a los inhibidores de herbicidas de HPPD. Son aún más promisorias aquellas proteínas mutantes que tienen el aminoácido hallado con mayor frecuencia en la naturaleza en la posición variable seleccionada de la Tabla 5c.

25 Tabla 6a: posiciones de aminoácidos con alta prioridad mostrada para las estructuras de rayos X

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Streptomyces avermitilis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido
228	V	164	T	189	V	185	V	185	V
250	F	188	A	213	M	209	F	209	F
251	A	189	R	214	K	210	W	210	W
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S
253	F	191	F	216	F	212	V	212	V
265	L	200	L	228	L	224	L	224	L
268	A	203	K	231	K	227	I	227	I
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V
270	L	205	M	233	V	229	V	229	V
271	A	206	S	234	A	230	A	230	A
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P
307	Q	240	Q	269	Q	265	Q	265	Q
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L
368	L	295	L	323	L	323	L	323	L
379	Q	310	Q	334	Q	334	Q	334	Q
392	F	321	F	347	F	347	F	347	F

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Streptomyces avermitilis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G
426	E	340	A	366	A	366	S	366	S
427	L	341	L	367	L	367	L	367	L

Tabla 6b: posiciones de aminoácidos con muy alta prioridad mostrada para las estructuras de rayos X

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Streptomyces avermitilis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido	Pos.	Amino-ácido
252	E	190	Y	215	E	211	S	211	S
269	V	204	A	232	V	228	V	228	V
280	P	215	P	243	P	239	P	239	P
335	M	264	M	293	L	289	L	289	L
368	L	295	L	323	L	323	L	323	L
421	K	335	E	361	K	361	A	361	A
422	G	336	G	362	G	362	G	362	G

5 En otra forma de realización, en el ácido nucleico aislado de la invención según se define con anterioridad, dicho aminoácido está seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Thr, Val o Tyr en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2.

10 Diversas secuencias de proteínas HPPD o de proteínas HPPD pronosticadas se conocen en la técnica. Ellas incluyen las secuencias de HPPD de *Streptomyces avermitilis* (Genebank SAV11864), *Daucus carota* (Genebank DCU 87257), *Arabidopsis thaliana* (Genebank AF047834), *Mycosphaerella graminicola* (Genebank AF038152), *Oryza sativa* / arroz [BAD26248], *Zea mays* / maíz [ACN36372], *Avena sativa* [ABZ23427], *Pseudomonas fluorescens* [ABF50055], *Synechococcus* sp. [YP\_473959], *Blepharisma japonicum* [BAF91881], *Rhodococcus* RHA1 sp. ro0240 [YP\_702005], *Rhodococcus* RHA1 sp. ro0341 [YP\_703002], *Picrophilus torridus* [YP\_024147], *Kordia algicida* [ZP\_02161490], *Sorghum bicolor* [XP\_002453359], *Triticum aestivum* / trigo [AAZ67144], o *Hordeum vulgare* / cebada [O48604].

15 La secuencia de la proteína de HPPD tomada como punto de partida puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que codifica una proteína de HPPD catalíticamente activa. En una forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 4 [*Oryza sativa*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 247 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 4  
20 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).

25 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 6 [*Zea mays*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende al menos un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 224 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 6 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).

En otra forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8 [*Avena sativa*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Tyr, o Tyr en la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).

- 5 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 10 [*Pseudomonas fluorescens*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Phe, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 188 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 10 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 10 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 14 [*Synechococcus* sp.], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 169 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 14 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Ala o Phe.
- 15 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 16 [*Blepharisma japonicum*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 209 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 16 (correspondiente a la posición 280 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Ala o Phe.
- 20 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 18 [*Rhodococcus* RHA1 sp. ro0240], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 231 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 18 (correspondiente a la posición 280 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Phe o Ala.
- 25 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 30 [*Rhodococcus* RHA1 sp. 0341], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 232 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 30 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Phe o Ala.
- 30 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 20 [*Picrophilus torridus*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 201 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 20 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Phe o Ala.
- 35 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 22 [*Kordia algicida*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 22 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Phe o Ala.
- 40 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 24 [*Sorghum bicolor*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 24 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Ala.
- 45 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 26 [*Triticum aestivum* / trigo], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 237 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 26 (correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2), preferentemente Ala.
- 50 En otra forma de realización, del ácido nucleico aislado de la invención, dicha proteína de HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2 [*Arabidopsis thaliana*], en la que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en la posición 250 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

55 En una forma de realización adicional del ácido nucleico de la invención, en dicha proteína de HPPD mutada se han reemplazado al menos dos aminoácidos.

Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de HPPD mutada,

en la que dicha proteína de HPPD mutada tiene actividad de HPPD,

en la que en dicha proteína de HPPD mutada al menos un aminoácido en la posición 228, 248, 270, 271, 379 y/o 427 se reemplazó por otro aminoácido.

5 En una forma de realización alternativa del ácido nucleico de la invención que tiene al menos un aminoácido en la posición 228, 248, 270, 271, 379 y/o 427 suprimido o reemplazado por otro aminoácido según se define con anterioridad, dicha proteína de HPPD mutada comprende

a) una His en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 226 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

10 b) una Ser en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 267 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2 o en una posición correspondiente en una enzima de HPPD diferente;

c) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 282 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

15 d) una His en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 308 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

e) una Tyr en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 342 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

f) un Glu en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 394 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

20 g) una Gly en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 420 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2; y

h) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 423 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

25 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado según se define con anterioridad, en dicha proteína de HPPD mutada, al menos un aminoácido se reemplazó de modo tal que la secuencia de aminoácidos resultante tenía al menos uno seleccionado de

a. Ala, Cys, Gly, Thr o Val en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 228 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

30 b. Ala, Glu, Gly, His, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Tyr en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 248 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

c. Ala, Ile, Leu, Met o Val en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 270 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

d. Ala, Glu, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Ser, Thr o Val en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 271 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

35 e. His o Gln en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 379 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2; y

f. Leu o Arg en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 427 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

40 En otra forma de realización del ácido nucleico aislado según se define con anterioridad, en dicha proteína de HPPD mutada, al menos un aminoácido se reemplazó de modo tal que la secuencia de aminoácidos resultante tenía al menos uno seleccionado de

a. Val o Thr en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 228 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

45 b. Leu, Met o Val en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 270 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

c. Ala o Ser en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 271 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2,

d. Gln en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 379 de la

secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2; y

e. Leu en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 427 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

5 En otra forma de realización del ácido nucleico según se define con anterioridad, dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD (también denominado herbicida inhibidor de HPPD).

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una proteína codificada por el ácido nucleico aislado de la invención.

10 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un gen quimérico que comprende una secuencia codificadora que comprende el ácido nucleico de la invención operativamente ligado a un promotor que se puede expresar en plantas y opcionalmente una región de terminación de la transcripción y poliadenilación.

15 Como una secuencia de regulación que funciona como un promotor en células vegetales y plantas, se puede hacer uso de cualquier secuencia promotora de un gen que se expresa naturalmente en plantas, en particular un promotor que se expresa en especial en las hojas de plantas como, por ejemplo, promotores "constitutivos" de origen bacteriano, viral o vegetal, o promotores "dependientes de la luz", tales como aquel de un gen de subunidad pequeña de ribulosa-biscarboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) de planta, o cualquier promotor expresable conocido apropiado que se puede usar. Entre los promotores de origen vegetal, se pueden mencionar los promotores de histonas como se describen en el documento EP 0 507 698 A1, el promotor de actina de arroz (documento US 5.641.876), o un promotor de ubiquitina vegetal (documento US 5.510.474). Entre los promotores de un gen viral de planta, se mencionará aquel del virus mosaico de la coliflor (CaMV 19S o 35S, Sanders et al. (1987), Nucleic Acids Res. 15(4):1543-58), el circovirus (AU 689 311) o el virus mosaico de la vena Cassava (CsVMV, documento US 7.053.205).

25 En una forma de realización de esta invención, una secuencia promotora específica de regiones o tejidos vegetales particulares se puede usar para expresar las proteínas de HPPD de la invención, como promotores específicos de semillas (Datla, R. et al., 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296), en especial el promotor de nabo (documento EP 255 378 A1), el promotor de faseolina, el promotor de glutenina, el promotor de heliantina (documento WO 92/17580), el promotor de albúmina (documento WO 98/45460), el promotor de oleosina (documento WO 98/45461), el promotor SAT1 o el promotor de SAT3 (documento PCT/US98/06978).

30 También se puede usar un promotor inducible elegido ventajosamente de los promotores de fenilalanina amoníaco liasa (PAL), HMG-CoA reductasa (HMG), quitinasa, glucanasa, inhibidor de proteinasa (PI), gen de la familia PR1, nopalina sintasa (nos) y vspB (documento US 5 670 349, Tabla 3), el promotor HMG2 (documento US 5 670 349), el promotor de beta-galactosidasa (ABG1) de manzana y el promotor de aminociclopropanocarboxilato (ACC sintasa) de manzana (documento WO 98/45445).

35 De acuerdo con la invención, se pueden usar también, en combinación con el promotor, otras secuencias de regulación que se ubican entre el promotor y la secuencia codificadora, como activadores de la transcripción ("potenciadores"), por ejemplo, el activador de la traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV) descritos en la solicitud WO 87/07644, o del virus del grabado de tabaco (TEV) descrito por Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597, por ejemplo, o intrones tales como el intrón adh1 de maíz o el intrón 1 de la actina del arroz.

40 Como un terminador de regulación o secuencia de poliadenilación, se puede usar cualquier secuencia correspondiente de origen bacteriano tal como por ejemplo el terminador nos de Agrobacterium tumefaciens, de origen viral tal como por ejemplo, el terminador CaMV 35S, o de origen vegetal tal como por ejemplo un terminador de histonas como se describió en la solicitud de patente publicada EP 0 633 317 A1.

45 Un procedimiento de obtención de una proteína de HPPD mutada capaz de modular la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, en el que dicha proteína de HPPD mutada tiene actividad de HPPD, que comprende

i. proporcionar una proteína de HPPD, comprendiendo opcionalmente dicha HPPD una secuencia de aminoácidos, en la que

a) una His está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 226 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

50 b) una Ser está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

c) una Asn está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 282 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

d) una His está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la



posición 308 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

e) una Tyr está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 342 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

5 f) un Glu está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 394 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

g) una Gly está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 420 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2; y

h) un Asn está presente en una posición en una proteína de HPPD, donde dicha posición corresponde a la posición 423 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2

10 ii) sustituir un aminoácido en dicha enzima de HPPD de modo tal que la secuencia de aminoácidos resultante tenga al menos uno seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, o Tyr en una posición en una proteína de HPPD, dicha posición corresponde a la posición 250 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

15 a. y una delección o sustitución aminoacídica de al menos una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a al menos una de las posiciones 228, 248, 270, 271, 379 y 427 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

iii) determinar la inhibición de la proteína de HPPD resultante por al menos un herbicida que actúa sobre HPPD;

20 en la que una inhibición de la proteína resultante de menos o más que la observada con una proteína de HPPD de referencia es indicativa de que la proteína resultante es capaz de modular la tolerancia de una planta a dicho herbicida.

Se ha de entender que también los aminoácidos (más específicos) y posiciones enumerados con anterioridad para otras formas de realización, tales como el ácido nucleico de la invención, se pueden aplicar al procedimiento de obtención de una proteína de HPPD mutada tal como se describió con anterioridad.

25 En una forma de realización alternativa del procedimiento de obtención de una proteína de HPPD mutada tal como se describió con anterioridad, dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD.

30 Dentro del procedimiento de obtención anterior de una proteína de HPPD mutada, se pueden seleccionar diferentes herbicidas que actúan sobre la HPPD. Conforme a ello, en otra forma de realización del procedimiento de obtención de una proteína de HPPD mutada tal como se describió con anterioridad, en donde dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, el herbicida que actúa sobre HPPD está seleccionado de tricetonas, o pirazolinatos, con preferencia, tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuriltriona, en particular tembotriona y tales plantas que contienen la HPPD de la invención tienen una tolerancia agrónomicamente aceptable a un herbicida inhibidor de HPPD en particular a tricetonas, o pirazolinatos, con preferencia, tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuriltriona, en particular tembotriona.

35 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una planta transgénica que comprende introducir en dicho genoma vegetal el ácido nucleico de la presente invención operativamente ligado a un promotor expresable en plantas, el gen quimérico de la invención o un ácido nucleico que codifica la enzima de HPPD identificada por el procedimiento de la reivindicación 20 o 21.

40 En una forma de realización alternativa del procedimiento de producción de una planta transgénica tal como se describe con anterioridad, el ácido nucleico de la invención, en el que dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, o un ácido nucleico identificado por el procedimiento de obtención de una proteína de HPPD mutada, en el que dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, ambos operativamente ligados a un promotor expresable en plantas, o el gen quimérico de la invención que comprende un ácido nucleico, en el que dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD, se introduce en dicha planta.

45 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una célula vegetal que comprende el ácido nucleico aislado de la invención o el gen quimérico de la invención en su información genética.

La presente invención también se refiere a una planta, una parte de una planta o tejido vegetal que consiste esencialmente en las células vegetales de la invención.

Por otra parte, la presente invención se refiere a una planta que se puede obtener a partir del procedimiento de

obtención de una proteína de HPPD mutada capaz de modular o aumentar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD en todos los aspectos alternativos descritos con anterioridad.

La planta de la presente invención puede ser cualquier planta. Los ejemplos no limitativos de plantas de la invención incluyen trigo, algodón, canola, arroz, maíz, sorgo, soja, canola, girasol, tabaco, remolacha, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, Soya spp., caña de azúcar, guisante, judía, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y gramíneas forrajeras, lino y colza oleaginosa y plantas productoras de nueces. La presente invención también se refiere a una semilla de la planta de la invención.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de modulación de la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD que comprende introducir el ácido nucleico aislado de la invención operativamente ligado a un promotor expresable en plantas o el gen quimérico de la invención en el genoma de una planta.

En una forma de realización alternativa, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD u obtener una planta tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD que comprende introducir el ácido nucleico aislado de la invención, en la que dicho ácido nucleico codifica una proteína de HPPD mutada que es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, operativamente ligado a un promotor expresable en plantas o el gen quimérico de la invención que comprende un ácido nucleico de la invención, en donde dicho ácido nucleico codifica una proteína de HPPD mutada que es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, en el genoma de una planta.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de control de malas hierbas que comprende pulverizar al menos un herbicida que actúa sobre HPPD en o alrededor de una planta de cultivo, en la que dicha planta de cultivo comprende el ácido nucleico de la presente invención, en la que dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD, operativamente ligado a un promotor expresable en plantas o el gen quimérico de la invención que comprende el ácido nucleico de la invención, en la que dicha proteína de HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD. En una forma de realización alternativa del procedimiento de control de malas hierbas, se aumenta la tolerancia de dicha planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD.

Además, la presente invención se refiere al uso de un gen quimérico de la invención o el ácido nucleico de la invención operativamente ligado a un promotor expresable en plantas para modular la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD.

En una forma de realización alternativa, la presente invención se refiere al uso de un gen quimérico de la invención o el ácido nucleico de la invención operativamente ligado a un promotor expresable en plantas para incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD. En esta forma de realización de la invención, el gen quimérico usado comprende el ácido nucleico de la invención, en la que la proteína de HPPD mutada codificada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD. De modo alternativo, si se usa un ácido nucleico operativamente ligado a un promotor expresable en plantas, se selecciona dicho ácido nucleico de modo tal que la proteína de HPPD mutada codificada sea capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre HPPD.

La presente invención también se refiere a la célula vegetal de la invención y la planta de la invención que puede comprender otro rasgo útil tal como se describe más adelante.

Si bien una cantidad de plantas de cultivos tolerantes a herbicidas son asequibles en comercios en la actualidad, un tema que surgió para muchos herbicidas comerciales y combinaciones de herbicida/cultivo es que los herbicidas individuales tienen un espectro incompleto de actividad contra especies de malas hierbas comunes. Para la mayoría de los herbicidas individuales que se usaron durante algún tiempo, poblaciones de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas y biotipos se han vuelto más prevalentes (ver, por ejemplo, Tranel y Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen y Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Se han descrito plantas transgénicas que son resistentes a más de un herbicida (ver, por ejemplo, documento WO 2005/012515). Sin embargo, hay una demanda continua de mejoras en todo aspecto de la producción de cultivos, opciones de control de malas hierbas, extensión del control de malas hierbas residual y mejora en el rendimiento de cultivos.

La proteína o gen de HPPD de la invención se combina ventajosamente en plantas con otros genes que codifican proteínas o ARN que confieren propiedades agronómicas útiles a estas plantas. Entre los genes que codifican proteínas o ARN que confieren propiedades agronómicas útiles en plantas transformadas, se pueden mencionar secuencias de ADN que codifican proteínas que confieren tolerancia a uno o varios herbicidas que, de acuerdo con su estructura química, difieren de los herbicidas inhibidores de HPPD y otros que confieren tolerancia a ciertos insectos, aquellos que confieren tolerancia a ciertas enfermedades, ADN que codifican ARN que proporcionan un control de nematodos o insectos, etc.

Estos genes se describen en particular en las solicitudes de patentes PCT publicadas WO 91/02071 y WO 95/06128.

- Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas que confieren tolerancia a ciertos herbicidas en células vegetales transformadas y plantas, se pueden mencionar un gen bar o PAT o el gen de *Streptomyces coelicolor* descrito en el documento WO 2009/152359 que confiere tolerancia a herbicidas de glufosinato, un gen que codifica un EPSPS apropiado que confiere tolerancia a herbicidas que tienen EPSPS como un blanco, como glifosato y sus sales (documentos US 4.535.060, US 4.769.061, US 5.094.945, US 4.940.835, US 5.188.642, US 4.971.908, US 5.145.783, US 5.310.667, US 5.312.910, US 5.627.061, US 5.633.435), o un gen que codifica glifosato oxidoreductasa (documento US 5.463.175).
- Entre las secuencias de ADN que codifican un EPSPS apropiado que confieren tolerancia a los herbicidas que tienen EPSPS como un blanco, se mencionará en particular el gen que codifica un EPSPS de planta, en particular EPSPS de maíz, en particular un EPSPS de maíz que comprende dos mutaciones, en particular una mutación en la posición de aminoácido 102 y una mutación en la posición de aminoácido 106 (documento WO 2004/074443) y que se describe en la solicitud de patente US 6566587, en adelante mencionado EPSPS de maíz doble mutante o 2mEPSPS, o el gen que codifica un EPSPS aislado de *Agrobacterium* y que se describe por la secuencia ID N.º: 2 y la secuencia ID N.º: 3 de la patente US 5.633.435, también denominado CP4.
- Entre las secuencias de ADN que codifican un EPSPS apropiado que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen EPSPS como un blanco, se mencionará más en particular el gen que codifica un EPSPS GRG23 de *Arthrobacter globiformis*, pero también los mutantes GRG23 ACE1, GRG23 ACE2, o GRG23 ACE3, en particular los mutantes o variantes de GRG23 tal como se describen en el documento WO 2008/100353, como GRG23(ace3)R173K de la SEC ID N.º: 29 en el documento WO 2008/100353.
- En el caso de las secuencias de ADN que codifican EPSPS y más en particular que codifican los genes anteriores, la secuencia que codifica estas enzimas está precedida ventajosamente por una secuencia que codifica un péptido de tránsito, en particular el "péptido de tránsito optimizado" descrito en la patente US 5.510.471 o 5.633.448.
- En el documento WO 2007/024782, se divulgan plantas tolerantes a glifosato y al menos un inhibidor de ALS (acetolactato sintasa). Más específicamente se divulgan plantas que contienen genes que codifican un polipéptido de GAT (glifosato-N-acetiltransferasa) y un polipéptido que confiere resistencia a inhibidores de ALS.
- En el documento US 6855533, se divulgaron plantas de tabaco transgénicas con genes ALS/AHAS de *Arabidopsis* mutados.
- En el documento US 6.153.401, se divulgan plantas que contienen genes que codifican 2,4-D-monooxigenasas que confieren tolerancia a 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) por metabolización.
- En el documento US 2008/0119361 y el documento US 2008/0120739, se divulgan plantas que contienen genes que codifican dicamba monooxigenasas que confieren tolerancia a dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) por metabolización.
- Todos los rasgos de tolerancia a herbicidas antes mencionados se pueden combinar con aquellos que tienen tolerancia a HPPD que son materia objeto de esta invención.
- Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas que se refieren a las propiedades de tolerancia a insectos, se mencionarán más en particular las proteínas Bt ampliamente descritas en la bibliografía y bien conocidas por los expertos en la técnica. También se hará mención de las proteínas extraídas de bacterias tales como *Photorhabdus* (documento WO 97/17432 y documento WO 98/08932).
- Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas de interés que confieren nuevas propiedades de tolerancia a insectos, se hará mención más en particular de las proteínas Bt ampliamente descritas en la bibliografía y bien conocidas por los expertos en la técnica. Se hará mención de proteínas extraídas de bacterias tales como *Photorhabdus* (documentos WO 97/17432 y WO 95/09932).
- Entre tales secuencias de ADN que codifican proteínas de interés que se refieren a propiedades de tolerancia a insectos, se hará mención más en particular a las proteínas Bt Cry o VIP descritas ampliamente en la bibliografía y bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Éstas incluyen la proteína Cry1F o híbridos derivados de una proteína Cry1F (por ejemplo, las proteínas híbridas Cry1A-Cry1F descritas en los documentos US 6.326.169; US 6.281.016; US 6.218.188, o sus fragmentos tóxicos), las proteínas de tipo Cry1A o sus fragmentos tóxicos, con preferencia la proteína Cry1Ac o híbridos derivados de la proteína Cry1Ac (por ejemplo, la proteína híbrida Cry1Ab-Cry1Ac descrita en el documento US 5.880.275) o la proteína Cry1Ab o Bt2 o sus fragmentos insecticidas tal como se describen en el documento EP451878, las proteínas Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag tal como se describen en el documento WO 02/057664 o sus fragmentos tóxicos, la proteína Cry1A.105 descrita en el documento WO 2007/140256 (SEC ID N.º: 7) o uno de sus fragmentos tóxicos, la proteína VIP3Aa19 de N.º de acceso de NCBI ABG20428, la proteína VIP3Aa20 de N.º de acceso de NCBI ABG20429 (SEC ID N.º: 2 en el documento WO 2007/142840), las proteínas VIP3A producidas en los eventos de algodón COT202 o COT203 (documentos WO 2005/054479 y WO 2005/054480, respectivamente), las proteínas Cry tal como se describen en el documento WO 01/47952, la proteína VIP3Aa o uno de sus fragmentos tóxicos tal como se describe en Estruch et al. (1996), Proc

5 Natl Acad Sci U S A. 28; 93(11):5389-94 y US 6.291.156, las proteínas insecticidas de *Xenorhabdus* (tal como se describe en el documento WO 98/50427), *Serratia* (en particular de *S. entomophila*) o cepas de especies de *Photorhabdus*, como proteínas Tc de *Photorhabdus* tal como se describen en el documento WO 98/08932 (por ejemplo, Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11): 5017-24; French-Constant y Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5): 828-33). También se incluyen en el presente documento cualquier variante o mutante de cualquiera de estas proteínas que difieren en algunos (1-10, con preferencia, 1-5) aminoácidos de cualquiera de las secuencias anteriores, en particular la secuencia de su fragmento tóxico, o que se fusionan con un péptido de tránsito, como un péptido de tránsito de plástido u otra proteína o péptido.

Las FIGURAS muestran:

10 FIGURA 1: Superposición de la estructura de rayos X de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (gris oscuro) y (a) *Pseudomonas fluorescens* (gris claro), (b) *Streptomyces avermitilis*, (c) *Homo sapiens*, (d) *Rattus norvegicus*. Las estructuras se muestran como gráfico de cintas.

15 FIGURA 2: Aminoácidos que forman el sitio de unión de (a) *Arabidopsis thaliana*, (b) *Pseudomonas fluorescens* (c) *Streptomyces avermitilis* (d) *Homo sapiens* y (e) *Rattus norvegicus* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD se muestra como traza de  $C_{\alpha}$  y el hierro está marcado.

FIGURA 3: Color de ensayo marrón en *Escherichia coli*

#### Listado de secuencias

- SEC ID N.º: 1: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Arabidopsis thaliana*  
 SEC ID N.º: 2: proteína codificada por SEC ID N.º: 1
- 20 SEC ID N.º: 3: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Oryza sativa*  
 SEC ID N.º: 4: proteína codificada por SEC ID N.º: 3  
 SEC ID N.º: 5: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Zea mays*  
 SEC ID N.º: 6: proteína codificada por SEC ID N.º: 5  
 SEC ID N.º: 7: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Avena sativa*
- 25 SEC ID N.º: 8: proteína codificada por SEC ID N.º: 7  
 SEC ID N.º: 9: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Pseudomonas fluorescens*  
 SEC ID N.º: 10: proteína codificada por SEC ID N.º: 9  
 SEC ID N.º: 13: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Synechococcus* sp.  
 SEC ID N.º: 14: proteína codificada por SEC ID N.º: 13
- 30 SEC ID N.º: 15: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Blepharisma japonicum*  
 SEC ID N.º: 16: proteína codificada por SEC ID N.º: 15  
 SEC ID N.º: 17: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD ro0341 aislada de *Rhodococcus* RHA1  
 SEC ID N.º: 18: proteína codificada por SEC ID N.º: 17  
 SEC ID N.º: 19: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Picrophilus torridus*
- 35 SEC ID N.º: 20: proteína codificada por SEC ID N.º: 19  
 SEC ID N.º: 21: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Kordia algicida*  
 SEC ID N.º: 22: proteína codificada por SEC ID N.º: 21  
 SEC ID N.º: 23: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Sorghum bicolor*  
 SEC ID N.º: 24: proteína codificada por SEC ID N.º: 23
- 40 SEC ID N.º: 25: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Triticum aestivum*  
 SEC ID N.º: 26: proteína codificada por SEC ID N.º: 25

SEC ID N.º: 27: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD de *Hordeum vulgare*

SEC ID N.º: 28: proteína codificada por SEC ID N.º: 27

SEC ID N.º: 29: secuencia de ácidos nucleicos que codifica HPPD ro0240 aislado de *Rhodococcus RHA1*

SEC ID N.º: 30: proteína codificada por SEC ID N.º: 29

- 5 SEC ID N.º: 31: secuencia de ácidos nucleicos que codifica polipéptido de HPPD de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana*, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 32: proteína codificada por SEC ID N.º: 31

- 10 SEC ID N.º: 33: secuencia de ácidos nucleicos que codifica polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 34: proteína codificada por SEC ID N.º: 33,

SEC ID N.º: 35: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 36: proteína codificada por SEC ID N.º: 35,

- 15 SEC ID N.º: 37: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 38: proteína codificada por SEC ID N.º: 37,

SEC ID N.º: 39: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

- 20 SEC ID N.º: 40: proteína codificada por SEC ID N.º: 39,

SEC ID N.º: 41: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 42: proteína codificada por SEC ID N.º: 41,

- 25 SEC ID N.º: 43: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 44: proteína codificada por SEC ID N.º: 43,

SEC ID N.º: 45: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 46: proteína codificada por SEC ID N.º: 45

- 30 SEC ID N.º: 47: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

SEC ID N.º: 48: proteína codificada por SEC ID N.º: 47

SEC ID N.º: 49: secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de HPPD mutante, que también contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una alanina y 6 aminoácidos de histidina

- 35 SEC ID N.º: 50: proteína codificada por SEC ID N.º: 49.

Los ejemplos ilustran la invención.

#### **Ejemplo 1:**

Una mutación de aminoácidos estrictamente conservados lleva a una proteína inactiva.

- 40 Los mutantes puntuales S267A (SEC ID N.º: 34) en *A. thaliana* y N282A (SEC ID N.º: 36) en *A. thaliana* son inactivos. Las posiciones de aminoácido dadas se refieren a la posición de la SEC ID N.º: 2.

Los polipéptidos de HPPD mutantes de la presente invención tienen cambios de aminoácidos en una o más posiciones respecto de la secuencia inicial de tipo silvestre de la que se derivan.

La secuencia de ADN SEC ID N.º: 2 que codifica la proteína de HPPD de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* (1335 pares de bases; Genebank AF047834; documento WO 96/38567) se clonó en el vector pSE420(RI)NX (modificado del vector de clonación y expresión pSE420(RI)NX (5261 pares de bases) se basa en el plásmido pSE420 por Invitrogen (Karlsruhe, Alemania)). En el extremo 5', se insertó directamente corriente abajo de ATG una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un aminoácido de alanina y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un HIS6-Tag N-terminal (6x HIS, codificado por: cat cat cat cac cat cat). La secuencia resultante se presenta como SEC ID N.º: 31. Corriente arriba de ATG, se añadieron dos pares de bases de cisteína adicionales a fin de obtener una secuencia correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI y corriente abajo del codón de detención se añadieron las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI. El plásmido resultante se usó luego para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) con 50 µg/ml de kanamicina o 100 µg/ml de selección de carbenicilina tal como se describe en las solicitudes de patentes europeas EP09015984.9; EP09015985.6; EP 09015986.4, EP 09015987.2; y EP09015988.0, todas presentadas el 23 de diciembre de 2009.

Ensayo rápido de la actividad de la proteína de HPPD: producción de color marrón

#### Ensayo de control colorimétrico para enzimas activas de HPPD

Un medio de cultivo de tipo caldo de YT con el 1 % de agarosa, 5 mM de L-tirosina y 42 mM de succinato, que contiene el agente de selección para el vector pSE420 se vierte en placas de pocillos profundos. El cultivo de *E. coli* en la fase de crecimiento exponencial que contiene el vector pSE420-HPPDx (cualquier gen que codifica una enzima / proteína de HPPD teórica) se aplica a cada pocillo. Después de 16 horas a 37 °C, los pocillos que no contienen el medio de cultivo, aquellos que habían sido sembrados con un cultivo de *E. coli* con el vector vacío pSE420, son transparentes, o aquellos que habían sido sembrados con un cultivo de *E. coli* con un vector pSE420 que contiene un gen que codifica una HPPD inactiva, son transparentes, mientras que los pocillos sembrados con un cultivo de *E. coli* con el vector pSE420-HPPD que codifica la HPPD activa son marrones. Previamente se había demostrado que este ensayo refleja la actividad de HPPD, no importa cuál sea el origen de esta actividad y permite la identificación de actividades de la HPPD (documento US 6.768.044). Como puede verse en la Figura 3, el cultivo de bacterias que contiene el gen que codifica la HPPD mutante no desarrolló un color marrón mientras que uno que contiene el gen que codifica la HPPD de tipo silvestre desarrolló un color marrón fuerte que reflejaba la actividad de las enzimas de HPPD. Se puede concluir que los dos mutantes de HPPD no son capaces de convertir HPP en homogentisato. Los dos mutantes de HPPD son inactivos. Se puede concluir que las posiciones de aminoácido 267 y 282 (referidas a la posición en la SEC ID N.º: 2) son esenciales para la actividad de HPPD.

La expresión de la proteína de HPPD se realizó de la siguiente manera.

Se usaron cultivos durante la noche cultivados a 37 °C para inocular el medio LB en una relación 1:100. Se dejaron crecer las células hasta que la DO alcanzara 0,5, luego se inició la expresión a partir del promotor *trp-lac* (*trc*) por inducción con 1 mM de IPTG que se une con el represor *lac* y causa su disociación del operón *lac*. La expresión se llevó a cabo durante 15 h a 28 °C.

Para preparar el cultivo de prearranque, se inocularon 2 ml de medio TB (100 µg\*ml<sup>-1</sup> de carbenicilina) con 50 µl de una solución madre de K-12 BL21 glicerol de *E. coli*. El cultivo de prearranque se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm durante 15 h. Se usaron 200 µl del cultivo de prearranque para iniciar el cultivo de inicio (5 ml de suplemento de TB con 100 µg\*ml<sup>-1</sup>), que se incubó durante 3 h a 37 °C.

Para preparar el cultivo principal, se inocularon 400 ml de medio TB (100 µg\*ml<sup>-1</sup> de carbenicilina) con 4 ml del cultivo de inicio. Este cultivo de inicio se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm hasta que se alcanzó la DO<sub>600</sub> de 0,5. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante con 400 µl de 1 M de solución IPTG. Las células se dejaron en cultivo durante una hora adicional en estas condiciones, luego la temperatura se redujo a 28 °C y el cultivo se agitó a 140 rpm durante 15 h. Las células se cultivaron por centrifugación a 6000 x g durante 15 min a 4 °C. Luego se almacenaron los sedimentos celulares a -80 °C.

#### 45 Aislamiento y purificación de His<sub>6</sub>-AtHPPD en forma nativa

##### Lisis de células

Se lisaron células usando lisozima, una enzima que escinde las ligaciones 1,4-β entre el ácido N-acetilmurámico y residuos de N-acetil-D-glucosamina en peptidoglicano que forma la pared celular bacteriana. Las membranas celulares se desbarataron luego por la presión interna de la célula bacteriana. Además, el tampón de lisis contenía Benzonase® Nucleasa, una endonucleasa que hidroliza todas las formas de ADN y ARN sin dañar las proteínas y así reduce ampliamente la viscosidad del lisado celular. La lisis en condiciones nativas se llevó a cabo en hielo.

Para la purificación de proteínas rotuladas con His<sub>6</sub>, se usó el kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit según la instrucción del manual del usuario.

#### 55 Purificación de proteínas rotuladas con His<sub>6</sub> por cromatografía por afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC)

El lisado celular clarificado (10 ml) obtenido después de la centrifugación de la reacción de lisis se cargó en una columna Ni-NTA Fast Start Column con el kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y la purificación se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones. La proteína rotulada con His<sub>6</sub> se eluyó con 2,5 ml de tampón de elución.

**5 Desalinización de soluciones de HPPD por filtración en gel**

Se aplicaron soluciones de HPPD eluidas de una columna Ni-NTA Fast Start con 2,5 ml de tampón de elución a una columna Sephadex G-25 PD-10 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del manual del usuario. Después de que toda la muestra entrara en el lecho de gel, se realizó la elución con 3,5 ml de tampón de almacenamiento.

10 Las soluciones de HPPD eluidas de la columna de desalinización se congelaron a -80 °C en alícuotas de 1 ml.

**Determinación de la concentración de proteína de HPPD usando el ensayo de proteína de Bradford**

La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de Bradford estándar (Bradford, (1976), Anal Biochem 72: 248-254).

**Determinación de la pureza de soluciones de HPPD usando SDS-PAGE**

15 La integridad de \*\*\*la proteína eluida se controló por medio de electroforesis en gel de proteína SDS-PAGE usando NuPAGE® Novex 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), se cargaron aproximadamente 10 µg de proteína. Se añadieron 10 µl de tampón de muestra de Laemmli a 1-10 µl de solución de proteína y la mezcla se incubó a 90 °C durante 10 min. Después de una corta etapa de centrifugación, toda la mezcla se cargó en una ranura de un gel SDS previamente fijado en una cámara de gel XCell SureLock™ Novex Mini-Cell rellena con  
20 tampón de corrida NuPAGE® MOPS SDS (diluido de la solución 20 x con ddH<sub>2</sub>O). Luego se aplicó un voltaje de 150 a la cámara de gel durante 1 h. Para la tinción de las bandas de proteína, el gel se sumergió en solución de tinción azul brillante de Coomassie R-250. Para desteñir el gel de poliacrilamida, se sumergió en solución para desteñir azul brillante de Coomassie R-250 hasta que las bandas de proteína aparecieron azules en un gel blanco.

25 La actividad de HPPD se controló por medio de un ensayo espectrofotométrico estándar (procedimiento descrito extensivamente en el documento WO 2009/144079).

En este contexto, el valor de pI<sub>50</sub> implica el valor de log de la concentración de inhibidor necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática en concentración molar.

30 Los valores de pI<sub>50</sub> para inhibidores de HPPD se determinaron a partir de los gráficos de dosis-respuesta de la actividad de HPPD frente a la concentración de inhibidor usando el ensayo extensivamente descrito en el documento WO 2009/144079 a 2 mM de concentración de HPP fijo y 3 minutos de tiempo de incubación fijo usando el ID Business Solutions Ltd. XLfit software suite.

35 Tabla 7: Determinación de los pI<sub>50</sub> de las enzimas de HPPD (HPPD de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* "SEC ID N.º: 32", los mutantes S267A (SEC ID N.º: 34) y N282A (SEC ID N.º: 36)" y la tolerancia a los diversos inhibidores de HPPD enumerados más abajo tembotriona, dicetonitrilo, mesotriona, biclopirona, pirasulfotol, sulcotriona, pirazolato, tefuiltriona y benzofenap. El símbolo ">" significa que el valor era mucho mayor que el indicado, pero no se podía calcular de forma precisa dentro del rango de concentración del inhibidor ensayado (2,5 x 10<sup>-6</sup>, 5,0 x 10<sup>-6</sup>, 1,0 x 10<sup>-5</sup>, 2,5 x 10<sup>-5</sup>, 6,3 x 10<sup>-5</sup> y 2,5 x 10<sup>-4</sup> M).

	Biclopirona	Benzofenap	Dicetonitrilo	Mesotriona	
WT (SEC ID N.º: 32)	5,2	> 5,6	> 5,6	> 5,6	
S267A (SEC ID N.º: 34)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	
N282A (SEC ID N.º: 36)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	
	Pirasulfotol	Pirazolato	Sulcotriona	Tefuiltriona	Tembotriona
WT (SEC ID N.º: 32)	5,4	5,4	> 5,6	> 5,6	> 5,6
S267A (SEC ID N.º: 34)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)
N282A (SEC ID N.º: 36)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)	nd - la (P)

40 Tal como se demostró previamente, los 2 mutantes de proteínas no son capaces de convertir HPP en homogentisato, lo que confirma que las 2 proteínas mutantes son inactivas. Esto confirma la hipótesis de que la posición 267 y 282 (haciendo referencia a la posición SEC ID N.º: 2) son absolutamente esenciales para obtener una HPPD activa.

**Ejemplo 2: mutantes de punto simple revelaban mayor tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD:****Caracterización cinética y evaluación de tolerancia a inhibidores de HPPD de la enzima de HPPD “SEC ID N.º: 32”.**

5 La actividad de HPPD se controló por medio del ensayo espectrofotométrico estándar (procedimiento extensivamente descrito en el documento WO 2009/144079).

**Determinación de las propiedades cinéticas in vitro de HPPD**

10 Los valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$  para diferentes preparaciones enzimáticas de HPPD y  $K_i$ ,  $K_1 = K_{on}$  y  $K_{-1} = K_{off}$  para diferentes inhibidores de HPPD se determinaron usando un ensayo de HPLC para las mediciones de la actividad de HPPD. Las mezclas de ensayo contenían en un volumen de 1 ml 150 mM de tampón de Tris-HCl a pH 7,8, 10 mM de ascorbato de sodio, 650 unidades de catalasa bovina (Sigma C30 (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania), 34 mg de proteína/ml, 23.000 unidades/mg) y cantidades apropiadas de HPP, enzima de HPPD purificada e inhibidores de HPPD. Para la determinación del valor de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$ , las concentraciones de HPP en la mezcla de ensayo se variaron entre 10 y 400  $\mu$ M. Para la determinación del valor  $K_i$ ,  $K_1 = K_{on}$  y  $K_{-1} = K_{off}$ , se usaron 2 mM de HPP. Todos los ensayos se iniciaron por adición de la enzima de HPPD a la mezcla de ensayo y se detuvieron en una serie de 15 tiempos de entre 0 y 240 s por adición de 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción a los tubos de ensayo de reacción que contienen 20  $\mu$ l de ácido perclórico al 10 %. La proteína precipitada se sedimentó por una centrifugación de 5 minutos a 10.000 g. 100  $\mu$ l del sobrenadante se cargaron en una columna 250 x 4 mm Knauer (Berlín, Alemania) Eurospher 100-5 C18 equilibrada con 10 % de metanol, 0,1 % de ácido trifluoroacético (tampón A). La columna se eluyó, también a 1,5 ml/min, usando un lavado de 4 minutos con tampón A, seguido de un lavado de 3 min con 95 % 20 de metanol y con un lavado adicional de 2 minutos con tampón A. La elución de HGA (ácido homogentísico) y HPP (hidroxifenilpiruvato) se controló a 292 nm. HGA se eluye a aproximadamente 5 minutos y HPP se eluye más tarde. Un grupo estándar de concentraciones de HGA se usaron para proporcionar una curva estándar a fin de calibrar la absorbancia de 292 nm del pico de HGA frente a la concentración de HGA.

25 Para las determinaciones del valor  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  las tasas iniciales de la reacción de HPPD a diferentes concentraciones de sustrato se determinaron a partir de gráficos de HGA formados frente al tiempo y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para enzimas no reaccionadas usando el paquete de software XLfit de ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com). Para la determinación de los valores  $K_i$ ,  $K_1 = K_{on}$  y  $K_{-1} = K_{off}$  se ajustaron los cursos en el tiempo de la reacción de HPPD a diferentes concentraciones de inhibidor a las ecuaciones para el Mecanismo A, inhibición competitiva, para inhibidores de ligación estrecha (Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitors – I. Kinetic behaviour. 30 Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185) usando el paquete de software XLfit de ID Business Solutions Ltd.

**Tabla 8**

SEC ID N.º: 32 de proteína consiste en la SEC ID N.º: 2 de proteína con una inserción de un aminoácido Ala y seis aminoácidos His directamente detrás de la primera metionina.

35 Caracterización cinética de enzimas de HPPD (“SEC ID N.º: 32” de Arabidopsis thaliana y la respectiva tolerancia de los inhibidores de la HPPD tembotriona y dicetonitrilo). En la siguiente tabla dada más abajo, “ $K_m$ ” (constante de Michaelis-Menten) significa el parámetro cinético que se usa para caracterizar una enzima y se define como la concentración de sustrato que permite la tasa máxima media de la reacción.  $K_m$  también se define como la concentración de sustrato a la que la tasa de reacción alcanza la mitad de su valor máximo ( $V_{m\acute{a}x}/2$ ) donde  $V_{m\acute{a}x}$  tiene el significado de ser la velocidad máxima de la reacción.  $K_{on} = K_1$  es igual a la constante de tasa de asociación de la unión de enzima-sustrato y  $K_{off} = K_{-1}$  es igual a la constante de tasa de la disociación del complejo de enzima-inhibidor.  $K_i$  define la constante de inhibición.

	HPP		Tembotriona			Dicetonitrilo		
	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu$ M)	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu$ M)	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu$ M)
SEC ID N.º: 32	6,3	1,2	2,3E+05	3,5E-03	0,015	6,1E+05	1,1E-02	0,018

45 Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la planta HPPD “SEC ID N.º: 32” resumidos en la Tabla 8 están en el intervalo de las actividades específicas medidas de la HPPD de planta purificada como por ejemplo para la HPPD de zanahoria (García et al. 2000, Biochemistry, 39, 7501-7507). La HPPD de Arabidopsis thaliana también es sensible en el rango similar a la HPPD de zanahoria a dicetonitrilo. Es la primera vez que se midió el parámetro cinético de la HPPD de Arabidopsis thaliana en presencia de tembotriona y está en un rango comparable al medido en presencia del inhibidor de HPPD dicetonitrilo.

**Determinación de la actividad de HPPD en presencia de varios inhibidores de HPPD**



En este contexto, el valor de  $pl_{50}$  significa el valor de log de la concentración de inhibidor necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática en la concentración molar.

5 Los valores de  $pl_{50}$  para los inhibidores de HPPD se determinaron a partir de gráficos de dosis-respuesta de la actividad de HPPD frente a la concentración de inhibidor usando el ensayo extensivamente descrito en el documento WO 2009/144079 a 2 mM de concentración de HPP fija y 3 minutos de tiempo de incubación fijo usando el paquete de software XLfit de ID Business Solutions Ltd.

**Listado de secuencias**

- <110> Bayer CropScience AG
- 10 <120> Variantes de HPPD y procedimientos de uso
- <130> BCS 10-1029
- <160> 48
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1335
- 20 <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

	atggggccacc aaaacgccgc cgtttcagag aatcaaaaacc atgatgacgg cgctgcgctcg	60
	tcgcccgggat tcaagctcgt cggatthttcc aagttcgtaa gaaagaatcc aaagtctgat	120
	aaattcaagg ttaagcgtt ccatcacatc gagttctggt gggcgacgc aaccaacgtc	180
	gctcgtcgt tctcctgggg tctggggatg agattctccg ccaaatccga tctttccacc	240
	ggaaacatgg ttacgcctc ttacctactc acctccggtg acctccgatt ccttttcaact	300
	gctccttact ctccgtctct ctccgcggga gagattaaac cgacaaccac agcttctatc	360
	ccaagtttgc atcacggctc ttgtcgttcc ttcttctctt cacatggtct cgggtgtaga	420
	gcccgttgcca ttgaagtaga agacgcagag tcagctttct ccatcagtgt agctaattggc	480
	gctattcctt cgtcgcctcc tatcgtcctc aatgaagcag ttacgatcgc tgaggttaaa	540
	ctatacggcg atgttgttct ccgatatggt agttacaaag cagaagatac cgaaaaatcc	600
	gaattcttgc caggggttcga gctgttagag gatgcgctgt cgttccatt ggattatggt	660
	atccggcggc ttgaccacgc cgtgggaaac gttcctgagc ttggtcoggc tttaaacttat	720
	gtagcggggt tcaactggtt tcaccaatc gcagagttca cagcagacga cgttggaaacc	780
	gccgagagcg gtttaaattc agcggctctg gctagcaatg atgaaatggt tcttctaccg	840
	attaacgagc cagtgcacgg aacaaagagg aagagtcaga ttcagacgta tttggaacat	900
	aacgaaggcg cagggctaca acatctggct ctgatgagtg aagacatatt caggaccctg	960
	agagagatga ggaagaggag cagtattgga ggattcagact tcatgccttc tctccgcct	1020
	acttactacc agaattctcaa gaaacgggtc ggcgacgtgc tcagcgatga tcagatcaag	1080
	gagtgtgagg aattagggat tctttagac agagatgatc aaggacggt gcttcaaacc	1140
	ttcaciaaac cactaggtga caggccgacg atatttatag agataatcca gagagtagga	1200
	tgcatgatga aagatgagga agggaaggct taccagagtg gaggatgtgg tggttttggc	1260
	aaaggcaatt tctctgagct cttcaagtcc attgaagaat acgaaaagac tcttgaagcc	1320
25	aaacagttag tggga	1335

- <210> 2
- <211> 445
- <212> PRT
- 30 <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 2

# ES 2 588 918 T3

Met	Gly	His	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gln	Asn	His	Asp	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Lys	Phe
			20					25					30		
Val	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Lys	Val	Lys	Arg	Phe	His
		35					40					45			
His	Ile	Glu	Phe	Trp	Cys	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Met	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr
65					70					75					80
Gly	Asn	Met	Val	His	Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Arg
				85					90					95	
Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile
			100					105					110		
Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Asp	His	Gly	Ser	Cys
		115					120					125			
Arg	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	His	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Ile
	130					135					140				
Glu	Val	Glu	Asp	Ala	Glu	Ser	Ala	Phe	Ser	Ile	Ser	Val	Ala	Asn	Gly
145					150					155					160

# ES 2 588 918 T3

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile  
165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr  
180 185 190

Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg  
195 200 205

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu  
210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr  
225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp  
245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser  
260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr  
275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala  
290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu  
305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro  
325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp  
340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu  
355 360 365

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

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly  
385 390 395 400

Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys  
405 410 415

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu  
420 425 430

ES 2 588 918 T3

Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly  
 435 440 445

<210> 3  
 <211> 1341  
 5 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa*

<400> 3  
 atgcctccca ctcccacccc caccgccacc accgggcgcg tctcggccgc tgcggcggcg 60  
 ggggagaaacg cgggggttcgg cctcgtcggg caccgccgct tcgtccgcgc caaccgcggg 120  
 agcgaccggt tccaggcgcct cgcgttccac cacgtcgcgc tctggtgcgc cgacgccggg 180  
 tccgccgcgg gccggttcgc cttcgcacctg ggcgcgccgc tcgccgccag gtccgacctc 240  
 tccacgggga actccgcgca cgctccctc ctctccgct ccgctccgt cgcgttctc 300  
 ttcaccgccc cctaccggcg cgaccacggc gtccggcgcg accgggccac caccgcctcc 360  
 atcccttct tctcccagg cgcgcgcgg aggttcgccc cggaccacgg cctcgcggtg 420  
 caccgcgtgg cgtcgcgct cgcgcgcgg gccgcgcct tcgccgccag cgtcgcggcc 480  
 ggtgcgcgcc cggcgttcca gcccgccgac ctccggcgtg gcttcggcct cgcggagggtg 540  
 gagctctacg gcgacgtcgt gctccgcttc gtcagccacc cggacggcgc cgacgcgccc 600  
 ttctcccggt gtttcgaggg cgtcagcaac ccgggcgccc tggactacgg cctccgcggg 660  
 ttgaccacg tcgtcggcaa cgtgcgggag ctccgctccg tagccgcgta catctccggg 720  
 ttcaccgggt tccacgagtt cgcgcggtc accgcgcagg acgtgggcac cgccgagagc 780  
 ggctcaact cggcgtgct cgcacaac gccgagacc tgctgctgcc gctcaacgag 840  
 ccggtgcacg gcaccaagcg gcggagccag atacagacgt acctggacca ccacggcggc 900  
 ccgggggtgc agcacatcgc gctggccagc gacgacgtgc tcgggacgct gagggagatg 960  
 cgggcgcgct ccgccatggg cggcttcgag ttcttggcgc cgcgcgcccc caactactac 1020  
 gacggcgtgc ggcggcgcgc cggggacgtg ctctcggagg agcagatcaa cgagtgccag 1080  
 gagctcgggg tgctcgtgga caggatgac cagggggtgt tgctccagat cttaccaag 1140  
 ccagtaggag acaggccaac cttttcttg gagatgatac aaaggattgg gtgcatggag 1200  
 aaggatgaga gtgggcagga gtaccagaag ggcggctgcg gcgggtttgg gaagggcaac 1260  
 ttctcggagc tgttcaagtc cattgaggag tatgagaaat cccttgaagc caagcaagcc 1320  
 cctacagttc aaggatccta g 1341

10 <210> 4  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

15 <400> 4  
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ala Thr Thr Gly Ala Val Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ala Ala Gly Glu Asn Ala Gly Phe Arg Leu Val Gly His Arg  
 20 25 30  
 Arg Phe Val Arg Ala Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe Gln Ala Leu Ala  
 35 40 45  
 Phe His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Ala Phe Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu



ES 2 588 918 T3

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

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

Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu  
 385 390 395 400

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

Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu  
 420 425 430

Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ala Pro Thr Val Gln Gly Ser  
 435 440 445

- <210> 5
- <211> 1281
- 5 <212> ADN
- <213> Zea mays

<400> 5

```

atgcccccca cccccacagc cgcgcagcc ggcgcgcgcg tggcggcggc atcagcagcg      60
gagcaggcgg cgttcgcgct cgtgggccac cgcaacttcg tccgcttcaa cccgcgctcc      120
gaccgcttcc acaogctcgc gttccaccac gtggagctct ggtgcgcca cgcggcctcc      180
gcccggggcc gcttctcctt cggcctgggc gcgccgctcg ccgcacgctc cgacctctcc      240
acgggcaact ccgcgcacgc gtccctgetg ctccgctccg gctccctctc cttctctctc      300
acggcgccct acgcgcacgg cgcgcagcct gccaccgccc cgtgcctctc cttctccgcc      360
gcccgcgcgc ggcgcttcgc agccgaccac ggctcgcggg tgcgcgcggt cgcgctccgc      420
gtcgcgcagc ccgaggacgc ctccgcgggc ttccgcctcg ccgaggtcga gctctacggc      480
gacgtcgtgc tccggtacgt gagctaccgc gacggcgcgc cgggcgagcc cttcctgccg      540
gggttcgagg gcgtggccag ccccggggcg gccgactacg ggctgagcag gttcgaccac      600
atcgtcggca acgtgcggga gctggegcgc gccgcgcgct acttcgcccg cttcacgggg      660
ttccacgagt tcgcccagtt cacgacggag gacgtgggca ccgcggagag cggcctcaac      720
tccatggtgc tcgccaacaa ctoggagaac gtgctgctcc cgtcaacga gccgggtgcac      780
ggcaccaaag cccgcagcca gatacaaacg ttcttgacc accacggcgg ccccggcgtg      840
cagcacatgg cgtggtccag cgacgacgtg ctcaggacgc tgagggagat gcaggcgcgc      900
tcggccatgg gcggttcoga gttcatggcg cctccacat ccgactacta tgacggcgtg      960
aggcggcgcg ccggggacgt gctcacggaa gcacagatta aggagtgccg ggagctaggg     1020
gtgctggtgg acagggatga ccaggcgtg ctgctccaaa tottcaccaa gccagtgggg     1080
gacaggccaa cgtgttctt ggaaatcctc caaaggatcg ggtgcatgga gaaggatgag     1140
aaggggcaag aatacaaaa ggggtgctgc ggcgggttcg gcaagggaaa cttctcgcag     1200
ctgttcaagt ccatcgagga ttatgagaag tcccttgaag ccaagcaagc tgctgcagca     1260
gctgcagctc agggatccta g                                     1281
    
```

- 10 <210> 6
- <211> 426
- <212> PRT
- <213> Zea mays

15 <400> 6

# ES 2 588 918 T3

Met	Pro	Pro	Thr	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	1	5	10	15
Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Phe	Arg	Leu	Val	Gly	His	Arg	Asn	20	25	30	
Phe	Val	Arg	Phe	Asn	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	His	Thr	Leu	Ala	Phe	35	40	45	
His	His	Val	Glu	Leu	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	50	55	60	
Phe	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	65	70	75	80
Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	85	90	95	
Ser	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ala	His	Gly	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	100	105	110	
Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Ala	Ala	115	120	125	
Asp	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	130	135	140	
Glu	Asp	Ala	Phe	Arg	Gly	Phe	Arg	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	145	150	155	160
Asp	Val	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ala	Ala	Gly	Glu	165	170	175	
Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly	Val	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala	Ala	Asp	180	185	190	
Tyr	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Asp	His	Ile	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	195	200	205	
Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	210	215	220	
Ala	Glu	Phe	Thr	Thr	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	225	230	235	240
Ser	Met	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	245	250	255	
Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	260	265	270	

ES 2 588 918 T3

Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser Asp  
 275 280 285

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly  
 290 295 300

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Thr Ser Asp Tyr Tyr Asp Gly Val  
 305 310 315 320

Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys  
 325 330 335

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 340 345 350

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

Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln Glu  
 370 375 380

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln  
 385 390 395 400

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln  
 405 410 415

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Ser  
 420 425

<210> 7  
 <211> 1323  
 5 <212> ADN  
 <213> Avena sativa

<400> 7

atgccgccca	cccccgccac	cgccaccggc	gcgcgcgcgg	ccgccgtgac	tccagagcac	60
gcggcccgga	gctttccccg	agtgggtccg	gtcaaccocg	gcagcgaccg	cttccccgtg	120
ctctccttcc	accacgtcga	gctctggtgc	gocgacgocg	cctcagcggc	cggacgcttc	180
tccttcgcgc	tcggcgcgcc	gctcgcgcgc	cggctccgacc	tctccacggg	gaactccgcg	240
cacgcctccc	tcctgctccg	ctcggggcgc	ctcgccttcc	tcttcacggc	gccttacgcg	300
ccgccgcggc	aggaggccgc	cacggccgca	gccaccgcct	ccatcccctc	cttctccgcc	360
gacgcgcgcg	ggacgttcgc	cgccgcccac	ggcctcgcgg	tgcgctccgt	cgggggtccgc	420
gtcgtgacg	ccgccgaggc	cttccgcgtc	agcgtagccg	gcggcgctcg	cccggccttc	480
gccccagccg	acctcggcca	tggcttcggc	ctcgcgcgag	tcgagctcta	cggcgacgtc	540
gtgctacgct	tcgtcagcta	cccggacgag	acagacctgc	cattcctgcc	agggttcagag	600
cgcgtgagca	gccccggcgc	cgtggactac	ggcctcacgc	ggttcgacca	cgtcgtgggc	660
aacgtcccgg	agatggcccc	ggtcatagac	tacatgaaag	gcttcttggg	gttccacgag	720
ttcgcgcgag	tcaccgcccga	ggacgtgggc	acgaccgaga	gcgggctcaa	ctcggtggtg	780
ctcgcacaaca	actccgaggc	cgtgctgctg	ccgctcaacg	agcccgtgca	cggcacaaga	840
cgacggagcc	agatacagac	gtacctggag	tatcacggcg	ggcccggcgt	gcagcacatc	900



ES 2 588 918 T3

```

gcgctcgcca gcaacgacgt gctcaggacg ctcagggaga tgcggggcgcg cacgcccattg 960
ggcggttcg agttcatggc gccaccgcag gcgaaatact atgaaggcgt gcggcgcate 1020
gcaggtgacg tgctctcggg agagcagatc aaggaatgcc aggagctggg ggtgctagtc 1080
gacagggatg atcaaggggt gttgctccaa atcttcacca agccagtagg ggacaggcca 1140
acgtttttcc tggagatgat ccaaagaatc ggggtgcatgg agaaggacga ggtcgggcaa 1200
gagtaccaga aggggtggctg cggcgggttt ggcaagggca atttctccga gctgttcaag 1260
tccattgagg actatgagaa atcccttgag gtcaagcaat ctgttgtagc tcagaaatcc 1320
tag 1323

```

<210> 8

<211> 440

5 <212> PRT

<213> Avena sativa

<400> 8

```

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

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

```

ES 2 588 918 T3

	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		
			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> 9

<211> 1077

5 <212> ADN

<213> Pseudomonas fluorescens

ES 2 588 918 T3

<400> 9

```

atggcagatc tatacgaaaa cccaatgggc ctgatgggct ttgaattcat cgaattcgcg      60
tcgccgacgc cgggtaccct ggagccgato ttcgagatca tgggcttcac caaagtcgcg      120
accacacggt ccaagaacgt gcacctgtac cggcagggcg agatcaacct gatcctcaac      180
aacgagccca acagcatcgc ctctactttt ggggcccgaac acggcccgtc ggtgtgcggc      240
atggcgttcc gcgtgaagga ctcgcaaaag gcctacaacc gcgccctgga actcggcgcc      300
cagccgatcc atattgacac cgggcccgatg gaattgaacc tgcccggcgat caagggcac      360
ggcggcgcgc cgttgtacct gatcgaccgt ttccggcgaag gcagctcgat ctacgacatc      420
gacttcgtgt acctcgaagg tgtggagcgc aatccggtcg gtgcaggtct caaagtcac      480
gaccacctga ccacaacgt ctatcgccgc cgcattgtct actgggcca cttctacgag      540
aaattgttca acttccgtga agcgcgttac ttcgatatca agggcgagta caccggcctg      600
acttccaagg ccatgagtgc gccggacggc atgatccgca tcccgtgaa cgaagagtcg      660
tccaagggcg cggggcagat cgaagagttc ctgatgcagt tcaacggcga aggcacccag      720
cacgtggcgt tcctcaccga cgacctggtc aagacctggg acgcgttgaa gaaaatcggc      780
atgcgcttca tgaccgcgcc gccagacact tattacgaaa tgctcgaagg ccgcctgcct      840
gaccagggcg agccgggtga tcaactgcag gcacgcggta tctgctgga cggatcttcc      900
gtggaaggcg acaaacgcct gctgctgcag atcttctcgg aaacctgat gggcccggtg      960
ttcttcgaat tcatccagcg caagggcgac gatgggtttg gcgagggcaa cttcaaggcg     1020
ctgttcgagt ccatcgaacg tgaccaggtg cgtcgtggtg tattgaccgc cgattaa     1077

```

<210> 10

5 <211> 358

<212> PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 10

```

Met Ala Asp Leu 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 Glu Pro Asn
          50           55           60

Ser Ile 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 Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
          85           90           95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp 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

```

10

ES 2 588 918 T3

Leu Glu Gly Val Glu 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 Val 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

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 Asp 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 Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln  
 275 280 285

Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val 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 Ala Asp  
 355

<210> 13

<211> 1053

5 <212> ADN

<213> Synechococcus sp.

<400> 13

ES 2 588 918 T3

```

atgaaccggt ccattcgaat tgtccaaggg atccaccacc tgcacttcta cctttgggat      60
ctgccccggt ggccggaaca cttttgtcgg gtttggggct tccgggtggc aagcgacgcc      120
ggcaacacc tggagctgga gcagggatcc ctgcgcttgc gcctgtctca gccggcacgg      180
gcgggggacg aggtggaccg ccatttgcag cggcatgggc cgggggtggt ggatgtggcc      240
ttggcggtgg gagagcagga gctaccggcc ttggcggagc tgttgccggg ccgagggccc      300
caactggcgt ggatcccggc agcagcggcg ctctgcctcc acacccccta cgggatccgg      360
cattctctga tccctggccc cttggatgcc gccctgccg aagcgggect gttttcccac      420
tgggatcacg tgggtgtttaa cgtggagcag ggatccctgc aggcggcagc cgaactggtat      480
gggcccgtgc tgggctggcg gcggctgtac cgctacagca tcggcaccgc cacctccggc      540
ctggaaagcg tgggtggtggg ggatccggaa gcggggatcc aatgggcat caacgagccc      600
acctgtgccg cttcccagat tcaggagttt ttgcatgccc atggcgggccc gggcattcag      660
cacgcggcgc tgcacagctc agacattggt gccagcctgc gccggttgcg gcagggggga      720
gtggactttt tgcaagtggc gccgcagtac tacaccagcc tggaaaggga gctgggggttg      780
gcgctccggt ctgcccttgg gcagggcacc tccctggcaag acctggtgga gcagcagatc      840
cttctggatg ctaccctgcc cgcttctgat ggccaggatc gcccccttct gctgcagacc      900
tttaccacgc cctcttttgg tcggcccacc tttttctttg aagtcattca acggctaggg      960
ggggccacgg gctttggcga ggccaatttt caggctttgt tcgaggccct ggaacggcaa     1020
cagcgacagc gacaccaggc gctgaccctc tag                                     1053

```

<210> 14

<211> 350

5 <212> PRT

<213> *Synechococcus* sp.

<400> 14

```

Met Asn Pro Ser Ile Arg Ile Val Gln Gly Ile His His Leu His Phe
1                               5                               10                               15

```

```

Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu His Phe Cys Arg Val Trp
                               20                               25                               30

```

```

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

```

```

Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala Arg Ala Gly Asp Glu
50                               55                               60

```

```

Val Asp Arg His Leu Gln Arg His Gly Pro Gly Val Val Asp Val Ala
65                               70                               75                               80

```

```

Leu Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Pro Ala Leu Ala Glu Leu Leu Arg
                               85                               90                               95

```

```

Gly Arg Gly Ala Gln Leu Ala Trp Ile Pro Ala Ala Ala Ala Leu Cys
100                               105                               110

```

```

Leu His Thr Pro Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu Ile Pro Gly Pro Leu

```

ES 2 588 918 T3

	115						120						125			
Asp	Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Ala	Gly	Leu	Phe	Ser	His	Trp	Asp	His	Val	
	130						135						140			
Val	Leu	Asn	Val	Glu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Trp	Tyr	
145					150					155					160	
Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Trp	Arg	Arg	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Ile	Gly	Thr	
				165					170					175		
Ala	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Val	Gly	Asp	Pro	Glu	Ala	Gly	
			180					185					190			
Ile	Gln	Trp	Ala	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gln	Ile	Gln	
		195					200					205				
Glu	Phe	Leu	His	Ala	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	His	Ala	Ala	Leu	
	210					215					220					
His	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Gln	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Val	Ala	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Arg	
				245					250					255		
Glu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Ile	Ser	Trp	
			260					265					270			
Gln	Asp	Leu	Val	Glu	Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Asp	Ala	Thr	Leu	Pro	Ala	
		275					280					285				
Ser	Asp	Gly	Gln	Asp	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Gln	Thr	Phe	Thr	Gln	Pro	
	290					295					300					
Leu	Phe	Gly	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Phe	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	
305					310					315					320	
Gly	Ala	Thr	Gly	Phe	Gly	Glu	Ala	Asn	Phe	Gln	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	
				325					330					335		
Leu	Glu	Arg	Gln	Gln	Arg	Gln	Arg	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Pro			
			340					345					350			

<210> 15

<211> 1149

5 <212> ADN

<213> *Blepharisma japonicum*

<400> 15

atgacttatt	acgacaagca	agaaacgogt	ccagatcttg	gcgaattcta	tggtttccat	60
cacggttcggt	tttacgtctc	caactcagag	caagccgctt	cgttctacac	atctcgcttt	120

ES 2 588 918 T3

```

gggttttctc cggttgccta tgaaggattg gaaacaggaa accaaaaatt ctgtaccaat 180
gtcgtccgaa gcaaccatgt agtcatecgt tttacctcag ctctcactcc tgaagacaat 240
gaagtgaacc gtcacgttgg caagcatagt gatggagttc aagacattgc ctttagtgta 300
agtgacgcaa gagggatgta tgagaaagcg atagctaaag gctgtaaaag cttccgtgag 360
ccacaggttt tacaagatca atttggatct gttataatag cgtctctcca gacttatgga 420
gacactgttc acacattagt ccaaaatgtc gactatacag gacccttttt gcctggcttc 480
agagcaatca caaaagatga tccattaaac tctgcctttc ctcaggtaaa ttatgacatt 540
attgatcatg ttgtaggaaa tcagcctggg ggcgatatga ctctacagt agaatgggat 600
gagaaatata tagaatttca tcgatattgg tctgctgatg agtctgtaat ccataccgat 660
tattcagcat taaggtctgt tgtggttgct gattgggatg aagtgatcaa aatgcctatt 720
aatgagcctg ctgatggact tagaaaaagt caaatccaag aatatgtcga atattatggg 780
ggagcaggcg tacaacatat tgccttaaaa gtcaatgata ttatttcagt aataagcacc 840
ttaagggcta gaggtgtgga attcttagaa gttcctccta aatattatga tagcttaaga 900
aaaagacttg cgcattctgc ggtacaaatt gaagaagact taaaaagaat tgaagacctt 960
catattttgg ttgactttga cgaccgtggg tatttacttc agattttcac aaaaccagta 1020
gaagacagac ctactctgtt ttatgaaatt attcaaagac ataataacaa tggattcggga 1080
attggaaatt ttaaagccct atttgaatca ttggaacaag agcaagaaag aagaggtaat 1140
ttgatctaa 1149

```

<210> 16

<211> 382

5 <212> PRT

<213> *Blepharisma japonicum*

<400> 16

```

Met Thr Tyr Tyr Asp Lys Gln Glu Thr Arg Pro Asp Leu Gly Glu Phe
1                    5                      10                      15

Tyr Gly Phe His His Val Arg Phe Tyr Val Ser Asn Ser Glu Gln Ala
                20                      25                      30

Ala Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Phe Gly Phe Ser Pro Val Ala Tyr Glu
                35                      40                      45

Gly Leu Glu Thr Gly Asn Gln Lys Phe Cys Thr Asn Val Val Arg Ser
50                      55                      60

Asn His Val Val Ile Ala Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Glu Asp Asn
65                      70                      75                      80

Glu Val Asn Arg His Val Gly Lys His Ser Asp Gly Val Gln Asp Ile
                85                      90                      95

Ala Phe Ser Val Ser Asp Ala Arg Gly Met Tyr Glu Lys Ala Ile Ala
                100                      105                      110

Lys Gly Cys Lys Ser Phe Arg Glu Pro Gln Val Leu Gln Asp Gln Phe
                115                      120                      125

Gly Ser Val Ile Ile Ala Ser Leu Gln Thr Tyr Gly Asp Thr Val His
130                      135                      140

```

ES 2 588 918 T3

Thr Leu Val Gln Asn Val Asp Tyr Thr Gly Pro Phe Leu Pro Gly Phe  
 145 150 155 160

Arg Ala Ile Thr Lys Asp Asp Pro Leu Asn Ser Ala Phe Pro Gln Val  
 165 170 175

Asn Tyr Asp Ile Ile Asp His Val Val Gly Asn Gln Pro Gly Gly Asp  
 180 185 190

Met Thr Pro Thr Val Glu Trp Tyr Glu Lys Tyr Leu Glu Phe His Arg  
 195 200 205

Tyr Trp Ser Ala Asp Glu Ser Val Ile His Thr Asp Tyr Ser Ala Leu  
 210 215 220

Arg Ser Val Val Val Ala Asp Trp Asp Glu Val Ile Lys Met Pro Ile  
 225 230 235 240

Asn Glu Pro Ala Asp Gly Leu Arg Lys Ser Gln Ile Gln Glu Tyr Val  
 245 250 255

Glu Tyr Tyr Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Leu Lys Val Asn  
 260 265 270

Asp Ile Ile Ser Val Ile Ser Thr Leu Arg Ala Arg Gly Val Glu Phe  
 275 280 285

Leu Glu Val Pro Pro Lys Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg Lys Arg Leu Ala  
 290 295 300

His Ser Ala Val Gln Ile Glu Glu Asp Leu Lys Arg Ile Glu Asp Leu  
 305 310 315 320

His Ile Leu Val Asp Phe Asp Asp Arg Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe  
 325 330 335

Thr Lys Pro Val Glu Asp Arg Pro Thr Leu Phe Tyr Glu Ile Ile Gln  
 340 345 350

Arg His Asn Asn Asn Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe  
 355 360 365

Glu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Arg Gly Asn Leu Ile  
 370 375 380

<210> 17  
 <211> 1206  
 <212> ADN  
 <213> Rhodococcus sp.

5

<400> 17

atgacgatcg agcagactct caccgacaag gaacgcctgg caggtctcga cctcggccag

60



ES 2 588 918 T3

```

ctcgagcagt tggctggggt cgtcgagtac gacggcacc cgcaccggt ccgggtcagc 120
ggctgggatg ccgtcgtctg ggtggctggc aacgccacc agaccgcca ctacttccag 180
tccgcgttcg ggatgacct cgtcgacctac tccggacca ccaccggcaa ccgggaccac 240
cacagcttcg tctcgaatc cggggccgtc cgttcgtca tcaaaggcgc cgtgaacccg 300
gacagcccc tgatcgacca ccaccgcacc cacggcgacg gcgtcgtcga catcgccctc 360
gcctgcccc acgtcgacaa gtgcatcgcc cacgcccgcg ccagggcgc caccgtcctc 420
gacgaacccc acgacgtgac cgacgaccac ggcaccgtcc gcctcgccg gatcgccacc 480
tacggcgaca cccgccacac cctcgtcgac cgcagccact acaccggccc ctacctgcc 540
ggctacaccg cccgcacctc cggccacacc aaacgggacg gggcacccaa ggcctgttc 600
caggccctcg accacgtcgt cggcaacgtc gaactcggca agatggacca ctgggtcgc 660
ttctacaacc gggtcatggg ctttacgaac atggccgagt tcgtcggcga ggacatcgcc 720
accgactact ccgcgctgat gagcaaggtc gtctccaacg gcaaccaccg ggtcaagttc 780
cccctcaacg aaccgcctt cggcaagaaa cgctcgcaga tcgacgaata cctcgacttc 840
taccgcgccc ccggcgccc gcacctggcc ctggccacca atgacatcct caccgccgtc 900
gaccagctga ccgcgaggg cgtcgagttc ctggccacc ccgactccta ctacgaggac 960
cccgaaactgc gggcccggat cggcaacgtc cgcgccccca tcgccgaact gcagaaacgc 1020
ggcatcctcg tcgaccgcga cgaagacggc tacctgctgc agatcttcac caaacccctc 1080
gtcgaccggc ccaccgtggt cttcgaactc atcgaacgcc acggctcct cggttcggc 1140
atcggcaact tcaaagcct cttcagggcc atcgaacgcg aacaagccg ccgcggaaac 1200
ttctga 1206

```

<210> 18

<211> 401

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 18

```

Met Thr Ile Glu Gln Thr Leu Thr Asp Lys Glu Arg Leu Ala Gly Leu
1          5          10          15

Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Leu Val Gly Leu Val Glu Tyr Asp Gly
20          25          30

Thr Arg Asp Pro Phe Pro Val Ser Gly Trp Asp Ala Val Val Trp Val
35          40          45

Val Gly Asn Ala Thr Gln Thr Ala His Tyr Phe Gln Ser Ala Phe Gly
50          55          60

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

His Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ala Val Arg Phe Val Ile Lys Gly
85          90          95

Ala Val Asn Pro Asp Ser Pro Leu Ile Asp His His Arg Thr His Gly
100         105         110

Asp Gly Val Val Asp Ile Ala Leu Ala Val Pro Asp Val Asp Lys Cys
115        120        125

Ile Ala His Ala Arg Ala Gln Gly Ala Thr Val Leu Asp Glu Pro His

```

ES 2 588 918 T3

130																
Asp	Val	Thr	Asp	Asp	His	Gly	Thr	Val	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Thr	
145					150					155					160	
Tyr	Gly	Asp	Thr	Arg	His	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Gly	
				165					170					175		
Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Ala	Arg	Thr	Ser	Gly	His	Thr	Lys	Arg	
			180					185					190			
Asp	Gly	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Phe	Gln	Ala	Leu	Asp	His	Val	Val	Gly	
		195					200					205				
Asn	Val	Glu	Leu	Gly	Lys	Met	Asp	His	Trp	Val	Asp	Phe	Tyr	Asn	Arg	
	210					215					220					
Val	Met	Gly	Phe	Thr	Asn	Met	Ala	Glu	Phe	Val	Gly	Glu	Asp	Ile	Ala	
225					230					235					240	
Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Val	Ser	Asn	Gly	Asn	His	
				245					250					255		
Arg	Val	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Arg	Ser	
			260					265						270		
Gln	Ile	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Gln	His	
		275					280					285				
Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Ala	Val	Asp	Gln	Leu	Thr	
	290					295					300					
Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Asp	
305					310					315					320	
Pro	Glu	Leu	Arg	Ala	Arg	Ile	Gly	Asn	Val	Arg	Ala	Pro	Ile	Ala	Glu	
				325					330					335		
Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Tyr	Leu	
			340					345					350			
Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Phe	
		355					360					365				
Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	His	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly	Ile	Gly	Asn	Phe	
	370					375					380					
Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Ala	Arg	Gly	Asn	
385					390					395					400	
Phe																

ES 2 588 918 T3

<210> 19  
 <211> 1107  
 <212> ADN  
 <213> *Picrophilus torridus*

5

<400> 19  
 atgtatggca aaaatttaat ctcagaacta agggaaaagg agatctttaa acgattacat 60  
 cacgtggaat tttacgttag cagtgccaaa acatgggtcat atttcatgaa caggggtctt 120  
 ggatttaaaa cagtggcata tgccgggtcca gaaaccggga taagggacaa gatatcctat 180  
 gttatgtccc agggcactgc aaggatatct tttacatcat caatgaatga tgatagctat 240  
 atatcgaaatc atgttaaaaa acacggggat ggcgtaaagg atatagcact tgaggtcgat 300  
 gatctggacg aggcaaaaag cctgatagaa aagtatggaa caaaggtttc aaaaataaat 360  
 gaaaataaagg atggaaatgg aaagataaga actgcagaga taaaaacgta cgggtgaaacc 420  
 gttcatacat taatagaaac cggggattac aatggcgtat tcatgcccgg ttatgaggaa 480  
 tctgaaataa attcaaaaaa cactgggata aaaaagatcg atcatatagt tggaaatgtc 540  
 tatgagggcg agatggatag ctgggttaat ttttacatag aaaaacttgg ctttgagcat 600  
 ttaataacct ttgatgataa agatataaga actgattaca ggcattaag atcaaaggtt 660  
 gtaaaaataca atgacgatat cgtatttcca ataatgagc ctgcaaaggg cttaagaaaa 720  
 tcacagatag aggaatatct tgactattac aggtctgagg gcgttcagca catagcactg 780  
 ttaactgatg atataataaa aactgtatcc atgatggagg aaaacggcat agaattttta 840  
 aaaacaccag gatcactacta tgaatcccta tcatcaagga taggctcaat agacgaggat 900  
 ttaaataaaa tagagaaaca taacatactt gtggatcgtg atgagaacgg atacctatta 960  
 cagatcttca caaagcctgt tactgacagg ccaacgttct tctttgaggt catacagaga 1020  
 aaggggtgcaa ggtcattcgg caacggtaac ttaaggcac tttttgaggg gatagaaagg 1080  
 gagcaggcaa agagaggaaa cctatga 1107

<210> 20  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> *Picrophilus torridus*

10

<400> 20  
 Met Tyr Gly Lys Asn Leu Ile Ser Glu Leu Arg Glu Lys Glu Ile Phe  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Leu His His Val Glu Phe Tyr Val Ser Ser Ala Lys Thr Trp  
 20 25 30  
 Ser Tyr Phe Met Asn Arg Gly Leu Gly Phe Lys Thr Val Ala Tyr Ala  
 35 40 45  
 Gly Pro Glu Thr Gly Ile Arg Asp Lys Ile Ser Tyr Val Met Ser Gln  
 50 55 60  
 Gly Thr Ala Arg Ile Ser Phe Thr Ser Ser Met Asn Asp Asp Ser Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Asn His Val Lys Lys His Gly Asp Gly Val Lys Asp Ile Ala  
 85 90 95  
 Leu Glu Val Asp Asp Leu Asp Glu Ala Lys Ser Leu Ile Glu Lys Tyr

15

ES 2 588 918 T3

			100						105						110			
Gly	Thr	Lys	Val	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Ile	Lys	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys			
		115					120					125						
Ile	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Val	His	Thr	Leu			
	130					135					140							
Ile	Glu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Asn	Gly	Val	Phe	Met	Pro	Gly	Tyr	Glu	Glu			
145					150					155					160			
Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	His	Ile			
			165						170					175				
Val	Gly	Asn	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Asn	Phe	Tyr			
			180					185					190					
Ile	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Glu	His	Leu	Ile	Thr	Phe	Asp	Asp	Lys	Asp			
		195					200					205						
Ile	Arg	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Tyr	Asn			
	210					215					220							
Asp	Asp	Ile	Val	Phe	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Leu	Arg	Lys			
225					230					235					240			
Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Glu	Gly	Val	Gln			
				245					250					255				
His	Ile	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Ile	Lys	Thr	Val	Ser	Met	Met			
			260					265					270					
Glu	Glu	Asn	Gly	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Thr	Pro	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Glu			
		275					280					285						
Ser	Leu	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Ser	Ile	Asp	Glu	Asp	Leu	Asn	Glu	Ile			
	290					295					300							
Glu	Lys	His	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu			
305					310					315					320			
Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Thr	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Phe	Glu			
				325					330						335			
Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Lys			
			340					345					350					
Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Arg	Gly	Asn	Leu			
		355					360						365					

<210> 21  
 <211> 1164

ES 2 588 918 T3

<212> ADN

<213> Kordia algicida

<400> 21

```

atggcagcag aaataaaaaa cttaaaagat ttacaaaata cagaatcagg actcaaaaaa    60
ttatttgacg aagcagaaga ctttcttcca cttttaggaa cagactacgt agaattatac    120
gtcgggaacg ccaaacaatc ggcacatttc tacaaaacgg cttttggttt tcaatcagaa    180
gcttacgcag gattggaaac aggattaacc gacagagttt catacgtatt aaaacaagat    240
aaaattcgct tggctttaac aacaccatta ggaaaagggt gcgaaatcaa tgagcatatc    300
gatttacacg gcgatggcgt aaaagtagta gcactttggg tagaagatgc taaaaaagcc    360
tttgaagaaa cgacccaaaag aggcgcaaaa ccgtacatgg aaccaacaaa agaagaagat    420
gaaaacggat atgtaattcg ctcaggaatc tatacgtacg gagaacgggt tcatgttttt    480
gtagaacgta aaaactataa cggagtcctt ttaccaggat atcaaagatg ggaatctcac    540
tacaatccgg agccagttgg cttaaaaattc atcgatcaca tggtaggaaa tgtaggttgg    600
ggagaaatga aagaatggtg tgaattctac gcgaaagtaa tgggatttgc gcaattatc    660
tcctttacag atgatgatat ttctaccgat ttactgcgt tgatgagtaa agtaatgagt    720
aatggaaatg gtagaatcaa atttccaatc aatgaaccgg cagaaggaaa aaagaaatcg    780
caaattgaag aatatctaga cttttacaat ggttcaggag tacaacatat tgcggttgct    840
acagacaata ttattgatac ggtttcgcaa atgcgcgaac gtggagtata attcttatac    900
gttccagata catattatga tgacttgta gaacgtgttg gcgacatcga tgaagatgta    960
gaagaactca aaaaacacgg aatcttaatt gatcgtgatg aagaaggata cttattgcag   1020
ttatttacca aaaccattgt agacagacca acaatgttct ttgaagtcac tcagcgtaaa   1080
ggcgcacaat catttggagt aggaaacttt aaagctttat ttgaagcgat agaaagagaa   1140
caagctgctc gcggaacatt gtaa                                           1164

```

5

<210> 22

<211> 387

<212> PRT

10 <213> Kordia algicida

<400> 22

```

Met Ala Ala Glu Ile Lys Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asn Thr Glu Tyr
1           5           10           15

Gly Leu Lys Lys Leu Phe Asp Glu Ala Glu Asp Phe Leu Pro Leu Leu
20          25          30

Gly Thr Asp Tyr Val Glu Leu Tyr Val Gly Asn Ala Lys Gln Ser Ala
35          40          45

His Phe Tyr Lys Thr Ala Phe Gly Phe Gln Ser Glu Ala Tyr Ala Gly
50          55          60

Leu Glu Thr Gly Leu Thr Asp Arg Val Ser Tyr Val Leu Lys Gln Asp
65          70          75          80

Lys Ile Arg Leu Val Leu Thr Thr Pro Leu Gly Lys Gly Gly Glu Ile
85          90          95

Asn Glu His Ile Asp Leu His Gly Asp Gly Val Lys Val Val Ala Leu
100         105         110

```

ES 2 588 918 T3

Trp Val Glu Asp Ala Thr Lys Ala Phe Glu Glu Thr Thr Lys Arg Gly  
 115 120 125

Ala Lys Pro Tyr Met Glu Pro Thr Lys Glu Glu Asp Glu Asn Gly Tyr  
 130 135 140

Val Ile Arg Ser Gly Ile Tyr Thr Tyr Gly Glu Thr Val His Val Phe  
 145 150 155 160

Val Glu Arg Lys Asn Tyr Asn Gly Val Phe Leu Pro Gly Tyr Gln Arg  
 165 170 175

Trp Glu Ser His Tyr Asn Pro Glu Pro Val Gly Leu Lys Phe Ile Asp  
 180 185 190

His Met Val Gly Asn Val Gly Trp Gly Glu Met Lys Glu Trp Cys Glu  
 195 200 205

Phe Tyr Ala Lys Val Met Gly Phe Ala Gln Ile Ile Ser Phe Thr Asp  
 210 215 220

Asp Asp Ile Ser Thr Asp Phe Thr Ala Leu Met Ser Lys Val Met Ser  
 225 230 235 240

Asn Gly Asn Gly Arg Ile Lys Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Glu Gly  
 245 250 255

Lys Lys Lys Ser Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Asn Gly Ser  
 260 265 270

Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Thr Asp Asn Ile Ile Asp Thr Val  
 275 280 285

Ser Gln Met Arg Glu Arg Gly Val Glu Phe Leu Tyr Val Pro Asp Thr  
 290 295 300

Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Glu Arg Val Gly Asp Ile Asp Glu Asp Val  
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Lys Lys His Gly Ile Leu Ile Asp Arg Asp Glu Glu Gly  
 325 330 335

Tyr Leu Leu Gln Leu Phe Thr Lys Thr Ile Val Asp Arg Pro Thr Met  
 340 345 350

Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Gln Ser Phe Gly Val Gly  
 355 360 365

Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg  
 370 375 380

Gly Thr Leu  
 385

ES 2 588 918 T3

<210> 23  
 <211> 1323  
 <212> ADN  
 5 <213> Sorghum bicolor

<400> 23  
 atgccccga cccccaccac agccgcgcga accgggcgcg ccgtggcggc ggcatacagc 60  
 gagcaggcgg cgttccgcct cgtggggccac cgcaacttcg tccgcgtgaa cccgcgcctc 120  
 gaccgcttcc acacgctcgc gttccaccac gtggagctct ggtgcgccga cgcggcctcc 180  
 gccgcggggc gcttctcctt cgggctcggc gcgcgcctcg ccgcgcggtc cgacctctcc 240  
 acggggaaca ccgcgcacgc gtcctctgtg ctccgctcgg gcgcctcgc gttcctcttc 300  
 acggcgcctt acgcgcacgg ccgcgcacgc gccacggcct cgtctgcctc cttctccgcc 360  
 gccgaggcgc ggcgcttcgc ggccgaccac ggctctcggg tgcgcgcctc cgcgcctcgc 420  
 gtggccgacg cggaggacgc ctccgcgcgc agcgtcgcgg ccggcgcgcg cccggcgctc 480  
 gagcccgtcg agctcggcct cggcttccgc ctgcgcgaag tcgagctcta cggcgacgctc 540  
 gtgctccggg acgtgagcta cccggacgac gcggacgcgt ccttctcgcg ggggttcgtg 600  
 ggctgaccca gccccggcgc ggccgactac gggctgagga ggttcgacca catcgtcggc 660  
 aacgtgccgg agctggcgcg ggccggccgc tacttcgctg gcttcacggg gttccacgag 720  
 ttcgccgagt tcacggcggg ggacgtgggc accacggaga gcgggctcaa ctgatgggtg 780  
 ctgcccaaca acgcggagaa cgtgctgctc ccaactcaac agccggtgca cggcaccaag 840  
 cgcgcagacc agatacagac gtacttgac caccacggcg gcccggcgt gcagcacatg 900  
 gcgctggcca gcgacgacgt gctcaggacg ctgagggaga tgcaagcgcg ctccggccatg 960  
 ggccgcttcg agttcatggc gctcggcgcg cccgaatact atgacggcgt gaggcggcgc 1020  
 gccggggacg tgctcacgga ggacagatt aaggagtgtc aggaactagg ggtgctgggtg 1080  
 gacagagatg accaggcgtg gctgctccag atcttcacca agccagtggg ggacaggcca 1140  
 acgttgcttct tggagatcat tcaaaggatc ggggtgcatg agaaggatga gaaggggcaa 1200  
 gaataccaga aggggtggctg tggcggggtt ggcaagggaa acttctccca gctgttcaaa 1260  
 tccattgagg attatgagaa gtccttgaa gctaagcaag ctgcagcagc tcagggatcc 1320  
 tag 1323

10 <210> 24  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Sorghum bicolor

15 <400> 24  
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Val Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ser Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His Arg Asn  
 20 25 30  
 Phe Val Arg Val Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe  
 35 40 45  
 His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser  
 65 70 75 80

ES 2 588 918 T3

Thr Gly Asn Thr Ala His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu  
 85 90 95  
 Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala His Gly Ala Asp Ala Ala Thr  
 100 105 110  
 Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Ala Glu Ala Arg Arg Phe Ala Ala  
 115 120 125  
 Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala  
 130 135 140  
 Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe  
 145 150 155 160  
 Glu Pro Val Glu Leu Gly Leu Gly Phe Arg Leu Ala Glu Val Glu Leu  
 165 170 175  
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro Asp Asp Ala Asp  
 180 185 190  
 Ala Ser Phe Leu Pro Gly Phe Val Gly Val Thr Ser Pro Gly Ala Ala  
 195 200 205  
 Asp Tyr Gly Leu Arg Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu  
 210 215 220  
 Leu Ala Pro Ala Ala Ala Tyr Phe Ala Gly Phe Thr 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 Met Val Leu Ala Asn Asn Ala Glu Asn 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 Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser  
 290 295 300  
 Asp Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Tyr Asp Gly  
 325 330 335  
 Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu  
 340 345 350



ES 2 588 918 T3

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 Leu Phe Leu  
 370 375 380

Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys 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

Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys  
 420 425 430

Gln Ala Ala Ala Ala Gln Gly Ser  
 435 440

- <210> 25
- <211> 1311
- <212> ADN

5 <213> Triticum aestivum

<400> 25

```

atgccgccca cccccaccac ccccgccagcc accggcgccg gcgctgccgc cgcggtgacg      60
ccggagcacc cgcggcccgcg ccgaatggtc cgcttcaacc cgcgcagcga ccgcttccac      120
acgctctcct tccaccacgt cgagttctgg tgcgcggacg ccgcctccgc cgcggcccg      180
ttgccttcg cgctcggcgc gccgctcggc gccaggctcg acctctccac ggggaactcc      240
gtgcacgcct ccagctgct ccgctcgggc aacctcgcct tcctcttccac cgcgccctac      300
gccaacggct ggcagcgcgc caccgcctcc ctgccctcct tctccgccga cgcgcgcgc      360
cggttctccg cggaccacgg gctcgcagtg cgtccatag cactgcgcgt cgcagacgcc      420
gcagaggcct tccgcgccag cgtcgcagga ggcgcgcgcc cggccttcag ccccgctggac      480
ctcggcccgcg gcttcggctt cgcggaggtc gagctctacg gcgacgtcgt gctccgcttc      540
gtcagtcacc cggatgacac ggacgtgcc ttcttgccgg ggttcgaggg cgtgagcaac      600
ccggatgccg tggactacgg cctgacgcgg ttgcaccacg tcgtcggcaa cgtcccgag      660
cttgcccccg ccgcgcgata cgtcgcgggg ttgcgggggt tccacgagtt cgcgcgagtt      720
acgacggagg acgtgggcac ggccgagagc gggctcaact cgatggtgct cgcacaacac      780
tcggagggcg tgctgctgcc gctcaacgag ccggtgcacg gcaccaagcg ccggagccag      840
atacagacgt tcctggaaca ccacggcggc tcgggcgtgc agcacatcgc ggtggccagc      900
agcgacgtgc tcaggacgct caggagatg cgtgcgcgct ccgccatggg cggcttcgac      960
ttcctgccac ccgctgcgc aaagtaactac gaaggcgtgc ggcgcacgc cggggatgtg      1020
ctctcggagg cgcagatcaa ggaatgccag gagctggggg tgctcgtcga cagggacgac      1080
caaggggtgt tgctacaaat cttcacaag ccagtggggg acaggccaac gctgttctctg      1140
gagatgatcc aaaggatcgg gtgcacggag aaggacgaga gagggaaga gtaccagaag      1200
ggtggctcgc gcgggttcgg caaaggcaac ttctccgagc tgttcaagtc cattgaagat      1260
tacgagaagt cccttgaagc caagcaatct gctgcagttc agggatcata g      1311
    
```

- 10 <210> 26
- <211> 436
- <212> PRT
- <213> Triticum aestivum

15 <400> 26

# ES 2 588 918 T3

Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro Arg Arg Met Val Arg Phe  
 20 25 30  
 Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu  
 35 40 45  
 Phe Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala  
 50 55 60  
 Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Val His Ala Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Asn Leu Ala Phe Leu Phe  
 85 90 95  
 Thr Ala Pro Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Leu  
 115 120 125  
 Ala Val Arg Ser Ile Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala Ala Glu Ala Phe  
 130 135 140  
 Arg Ala Ser Val Asp Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ser Pro Val Asp  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Arg Gly Phe Gly Phe Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val  
 165 170 175  
 Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Asp Thr Asp Val Pro Phe Leu  
 180 185 190  
 Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Asn Pro Asp Ala Val Asp Tyr Gly Leu  
 195 200 205  
 Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Tyr Val Ala Gly Phe Ala Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Met Val  
 245 250 255  
 Leu Ala Asn Asn Ser Glu Gly Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val  
 260 265 270

ES 2 588 918 T3

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

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

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

Phe Leu Pro Pro Arg Cys Arg Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile  
 325 330 335

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

Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe  
 355 360 365

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

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

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

Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala  
 420 425 430

Val Gln Gly Ser  
 435

<210> 27  
 <211> 1305  
 <212> ADN

5 <213> Hordeum vulgare

<400> 27

atgccgccca cccccaccac ccccgcggct accggcgccg ccgccgcggt gacgccggag 60  
 cacgcgcgac cgcaccgaat ggtccgcttc aaccgcgcga gcgaccgctt ccacacgctc 120  
 tccttccacc acgtcgagtt ctggtgcgcg gacgccgcct ccgccgccgg ccgcttcgcg 180  
 ttgcgcctcg gcgcgcgcgt cgcgccagg tccgacctct ccacggggaa ctccgcgcac 240  
 gcctcccagc tgcctcgcctc gggtccctc gccttctctt tcaccgcgcc ctacgccaac 300  
 ggctgcgacg ccgccaccgc ctccctgccc tccttctccg ccgacgcgcg gcgccggttc 360  
 tccgccgacc acgggatcgc ggtgcgctcc gttagcctgc gcgtcgcaga cgcgccgag 420  
 gccttccgcg ccagtcgctg acggggcgcg cgcgccgctc tcgccccgt ggacctcggc 480  
 cgcggcttcg cgttcgcgga ggtcgagctc tacggcgacg tcgtgctccg cttcgtcagc 540  
 caccgggacg gcacggacgt gcccttcttg ccgggggttc agggcgtaac caaccggac 600  
 gccgtggaat acggcctgac gcggttcgac cacgtcgtcg gcaacgtccc ggagcttgcc 660  
 cccgccgcag cctacatcgc cgggttcacg gggttccacg agttcgccga gttcacggcg 720  
 gaggacgtgg gcacgaccga gacgcggctc aactcggtag tgctcgccaa caactcggag 780

ES 2 588 918 T3

```

ggcgtgctgc tgcgctcaa cgagccggtg cacggcacca agcgcgggag ccagatacag      840
acgttcctgg aacaccacgg cggccccggc gtgcagcaca tcgcggtggc cagcagtgac      900
gtgctcagga cgctcaggaa gatgcgtgcg cgctccgcca tggggggctt cgacttctg      960
ccacccccgc tgcggaagta ctacgaaggc gtgcgacgcc ttgcgggga tgtcctctcg    1020
gaggcgcaga tcaaggaatg ccaggagctg ggtgtgctcg tcgataggga cgaccaaggg    1080
gtgttgctcc aaatcttcac caagccagta ggggacagggc cgaccttgtt cctggagatg    1140
atccagagga tcgggtgcat ggagaaggac gagagagggg aagagtacca gaagggtggc    1200
tgcggcgggt tcggcaaagg caacttctcc gagctgttca agtccattga agattacgag    1260
aagtccttg aagccaagca atctgctgca gttcagggat catag                          1305

```

<210> 28

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 28

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Ile Ala Val
                115                               120                               125

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 588 918 T3

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

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

Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser

<210> 29

<211> 1209

5 <212> ADN

<213> Rhodococcus sp.

ES 2 588 918 T3

<400> 29

```

atgactaccg ccgacattcg cctgacgccc cgcgaggtgg cgcacatct ggagaccgac      60
gagctccggc agttggtcgg gctcgtcgaa cacgacgacg cgtcggatcc gtttcccgtg      120
gtcgcgatgg atgocgtggt gttcgtgtgc ggcaacgcga cgcagagcac gcagtacttc      180
gtctccacgt ggggcatgac cctcgtcgcc tacgccgggc cggagaccgg tcagcgcctg      240
cacaagtcc tgcctctcga gtcggggctg gcacggttcg tgctgcacgg cgcctcgcgt      300
ccgaagagcc cgcctcgcga ccatcaccgg gcgcacggcg acggcgtggt ggacctggcg      360
atggaagttc tcgacgtcga ccgctgcac gcgcacgcac gctcgcaggg ggccaccatt      420
ctcgaggagc cgcgcgacgt cacggatcag ttccggcaccg tcgggctcgc ggcgatcgcc      480
acgtacggca gcaccggca caccatcgtc gaccgaagcc gatacgacgg cccctacctc      540
cccggattcg tcgcgcgctc cagcggtttc gcggcgcgac cgggtaaacc cccgcgattg      600
ttccaggcgc tcgaccacgc cgtcggcaac gtcgagatgg gccggatgga tcaactgggtc      660
cggttctaca accgcgtcat gggcttcacg aacatggcgg aattcgtcgg cgacgacatc      720
gccacggagt actcggcgtc gatgtcgaag gtcgtggcga acggcaatca cccgggtgaag      780
ttcccgtcga acgaaccgcg ggtgggaaag aagaagtgcg agatcgacga atatctcgag      840
ttctacggtg agccgggctg ccagcatctg gccctcgcga cgggagacat cctcgcgacg      900
gtggacgcgt tgcgggcgca ggggtgtcga ttccctgaaca cacccgacgc gtactacgag      960
gaccacagc tgcgcgcccg gatcggcagg gtgcgggtgc cgggtggagga actgcagaag     1020
cgcggaatcc tcgtcgaccg cgacgaggac ggatacctcc tgcagatctt caccaaaccg     1080
ctcggcgacc ggcgcgaccg gttcttcgag gtgatcgaac ggacaggttc gctcgggttc     1140
ggggcgggta acttcaggc cctgttcgaa tccatcgagc gtgagcaggc ggcgcgcggc     1200
aatctgtga

```

<210> 30

5 <211> 402

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 30

```

Met Thr Thr Ala Asp Ile Arg Leu Thr Pro Arg Glu Val Ala Ala His
1           5           10           15

Leu Glu Thr Asp Glu Leu Arg Gln Leu Val Gly Leu Val Glu His Asp
          20           25           30

Asp Ala Ser Asp Pro Phe Pro Val Val Ala Met Asp Ala Val Val Phe
          35           40           45

Val Cys Gly Asn Ala Thr Gln Ser Thr Gln Tyr Phe Val Ser Thr Trp
          50           55           60

Gly Met Thr Leu Val Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Thr Gly Gln Arg Ser
65           70           75           80

His Lys Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ser Ala Arg Phe Val Leu His
          85           90           95

Gly Ala Val Asp Pro Lys Ser Pro Leu Ala Asp His His Arg Ala His
          100          105          110

Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Met Glu Val Leu Asp Val Asp Arg

```

10

ES 2 588 918 T3

	115						120							125					
Cys	Ile	Ala	His	Ala	Arg	Ser	Gln	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Glu	Pro				
	130						135							140					
Arg	Asp	Val	Thr	Asp	Gln	Phe	Gly	Thr	Val	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala				
	145						150							155					160
Thr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Ile	Val	Asp	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp				
							165							170					175
Gly	Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Phe	Ala	Ala				
							180							185					190
Arg	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Arg	Leu	Phe	Gln	Ala	Leu	Asp	His	Ala	Val				
							195							200					205
Gly	Asn	Val	Glu	Met	Gly	Arg	Met	Asp	His	Trp	Val	Arg	Phe	Tyr	Asn				
							210							215					220
Arg	Val	Met	Gly	Phe	Thr	Asn	Met	Ala	Glu	Phe	Val	Gly	Asp	Asp	Ile				
							225							230					235
Ala	Thr	Glu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Val	Ala	Asn	Gly	Asn				
							245							250					255
His	Arg	Val	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Ala	Val	Gly	Lys	Lys	Lys				
							260							265					270
Ser	Gln	Ile	Asp	Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Gly	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln				
							275							280					285
His	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Ala	Leu				
							290							295					300
Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Glu				
							305							310					315
Asp	Pro	Gln	Leu	Arg	Ala	Arg	Ile	Gly	Arg	Val	Arg	Val	Pro	Val	Glu				
							325							330					335
Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Tyr				
							340							345					350
Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	Phe				
							355							360					365
Phe	Glu	Val	Ile	Glu	Arg	His	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Gly	Asn				
							370							375					380
Phe	Gln	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Ala	Arg	Gly				
							385							390					395
																			400

ES 2 588 918 T3

Asn Leu

<210> 31  
 <211> 1353  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica HPPD de Arabidopsis y que contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica una Ala y 6 aminoácidos His  
 10  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(6)  
 15 <223> secuencia que codifica una Ala  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 20 <223> secuencia que codifica un marcador de His que contiene 6 His  
  
 <400> 31  
 atggctcacc accatcacca tcacaaaac gccgcggtt cagagaatca aaaccatgat 60  
 gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat ttccaagtt cgtaagaaaag 120  
 aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctggtgcggc 180  
 gacgcaacca acgtcgctcg togtttctcc tggggtctgg ggatgagatt ctccgccaaa 240  
 tccgatcttt ccaccggaaa catggttcac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc 300  
 cgattccttt tcaactgctc ttactctcgg tctctctcgg ccggagagat taaaccgaca 360  
 accacagctt ctatcccaag ttlogatcac ggctcttgtc gtctctctt ctcgtcacat 420  
 ggtctcggtg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480  
 agtgtagcta atggcgctat tcttctgctg cctcctatcg tctcaatga agcagttacg 540  
 atcgctgagg ttaaaactata cggcgatggt gttctccgat atgttagtta caaagcagaa 600  
 gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgctgctc 660  
 ccattggatt atggatatcg gccgcttgac caccgcgtgg gaaacgcttc tgagcttggt 720  
 ccggctttaa cttatgtagc ggggttccact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780  
 gacgacgttg gaaccgccga gacgcggtta aattcagcgg tcttggttag caatgatgaa 840  
 atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900  
 acgtatttgg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960  
 atattcagga cctgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020  
 ccttctcctc cgcctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080  
 gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140  
 acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggc cgacgatatt tatagagata 1200  
 atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaaggga aggcttacca gagtggagga 1260  
 tgtggtggtt ttggcaaagg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacga 1320  
 aagactcttg aagccaaaca gttagtgagg tga 1353  
  
 25 <210> 32  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> codificado por la SEC ID N.º: 31  
  
 <220>



ES 2 588 918 T3

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Ala

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> marcador de His constituido por 6 His

10

<400> 32

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
 1              5              10              15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
              35              40              45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
 50              55              60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
65              70              75              80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
              85              90              95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
              115              120              125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
130              135              140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
145              150              155              160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn
              165              170              175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
              180              185              190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu

```

ES 2 588 918 T3

	195						200						205			
Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Glu	Asp	Ala	Ser	Ser	Phe	Pro	Leu	Asp	Tyr	
	210						215						220			
Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Ala	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Val	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Gln	Phe	Ala	
				245					250					255		
Glu	Phe	Thr	Ala	Asp	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	
			260					265					270			
Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Asn	Asp	Glu	Met	Val	Leu	Leu	Pro	Ile	Asn	Glu	
		275					280					285				
Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	
	290					295					300					
His	Asn	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	His	Leu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Asp	
305					310					315					320	
Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Arg	Ser	Ser	Ile	Gly	Gly	
				325					330					335		
Phe	Asp	Phe	Met	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Leu	Lys	
			340					345					350			
Lys	Arg	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Glu	
		355				360						365				
Glu	Leu	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gln	
	370					375					380					
Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Ile	Phe	Ile	Glu	Ile	
385				390						395					400	
Ile	Gln	Arg	Val	Gly	Cys	Met	Met	Lys	Asp	Glu	Glu	Gly	Lys	Ala	Tyr	
				405					410					415		
Gln	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	
			420					425					430			
Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Lys	Gln	Leu	
		435					440					445				
Val	Gly															
	450															

<210> 33  
 <211> 1353

ES 2 588 918 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido HPPD mutante

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(6)  
 10 <223> secuencia que codifica Ala

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 15 <223> secuencia que codifica un marcador de His que contiene 6 His

<400> 33  
 atggctcacc accatcacca tcacccaaaac gccgcggttt cagagaaatca aaaccatgat 60  
 gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat ttccaagtt cgtaaagaaag 120  
 aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcctccatc acatcgagtt ctgggtcggc 180  
 gacgcaacca acgtcgtcgtc tcgcttctcc tggggtctgg ggatgagatt ctccgccaaa 240  
 tccgatcttt ccaccggaaa catgggtcac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc 300  
 cgattccttt tcaactgctcc ttactctcgc tctctctcgc ccggagagat taaaccgaca 360  
 accacagctt ctatcccaag ttccgatcac ggctcttctc gttccttctt ctcgtcacat 420  
 ggtctcgggtg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480  
 agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tctcaatga agcagttacg 540  
 atcgtcgagg ttaaactata cggcgatggt gttctccgat atgttagtta caaagcagaa 600  
 gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttccgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc 660  
 ccattggatt atgggtatccg gccgcttgac cacgccgtgg gaaacgttcc tgagcttggg 720  
 ccggctttaa cttatgtagc ggggttcaact ggttttcacc aattccgaga gttcacagca 780  
 gacgacgttg gaaccgccga gagcgggtta aatgccggcg tcctggctag caatgatgaa 840  
 atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900  
 acgtatcttg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960  
 atattcagga ccctgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020  
 ccttctctcc cgcctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080  
 gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140  
 acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggc cgacgatatt tatagagata 1200  
 atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaagggg aggcctacca gagtggagga 1260  
 tgtgggtggt ttggcaaagg caatctctct gagctcttca agtccattga agaatacga 1320  
 aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga 1353

20 <210> 34  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> codificado por la SEC ID N.º: 33

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (2)..(2)  
 <223> Ala

<220>

ES 2 588 918 T3

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> marcador de His constituido por 6 His

5 <400> 34

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1          5          10          15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
          35          40          45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
          50          55          60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
65          70          75          80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
          85          90          95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
          115          120          125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
130          135          140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
145          150          155          160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn
          165          170          175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
          180          185          190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu
          195          200          205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr
210          215          220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly
225          230          235          240

```

ES 2 588 918 T3

Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala  
 245 250 255

Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ala  
 260 265 270

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu  
 275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu  
 290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp  
 305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly  
 325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys  
 340 345 350

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
 355 360 365

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

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
 385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
 405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
 420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
 435 440 445

Val Gly  
 450

- <210> 35
- <211> 1353
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (4)..(6)

<223> secuencia que codifica Ala

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (7)..(24)

<223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

<400> 35

atggctc	atc	accatcacca	tcacccaaaac	gocgcggtt	cagagaaatca	aaaccatgat	60
gacggcgctg	cgctcgtcgc	gggattcaag	ctcgtcggat	ttccaagtt	cgtaagaaa		120
aatccaaagt	ctgataaatt	caaggttaag	cgcttccatc	acatcgagtt	ctgggtgcggc		180
gacgcaacca	acgtcgtcgc	tcgcttctcc	tggggctcgg	ggatgagatt	ctccgcaaaa		240
tccgatcttt	ccaccggaaa	catggttcac	gcctcttacc	tactcacctc	cggtgacctc		300
cgattccttt	tactcgtcgc	ttactctcgc	tctctctcgc	ccggagagat	taaaccgaca		360
accacagctt	ctatcccaag	tttcgatcac	ggctcttgtc	gttccttctt	ctcgtcacat		420
ggtctcgggtg	ttagagccgt	tgcgattgaa	gtagaagacg	cagagtcagc	ttctccatc		480
agtgtagcta	atggcgctat	tccttcgtcgc	cctcctatcg	tcctcaatga	agcagttacg		540
atcgtcggag	ttaaactata	cggcgatggt	gttctccgat	atgttagtta	caaagcagaa		600
gataccgaaa	aatccgaatt	cttgccaggg	ttcagcgcgtg	tagaggatgc	gtcgtcgttc		660
ccattggatt	atggtatccg	gocgcttgac	cacgcgcgtg	gaaaocgttc	tgagcttgggt		720
ccggctttaa	cttatgtagc	ggggttcact	ggttttcacc	aattcgcaga	gttcacagca		780
gacgacgttg	gaaccgcga	gagcggttta	aattcagcgc	tcctggctag	caatgatgaa		840
atggttcttc	taccgattgc	cgagccagtg	cacggaacaa	agaggaagag	tcagattcag		900
acgtatcttg	aacataacga	aggcgcaggg	ctacaacatc	tggctctgat	gagtgaagac		960
atattcagga	ccttgagaga	gatgaggaag	aggagcagta	ttggaggatt	cgacttcatg		1020
ccttctctc	cgctactta	ctaccagaat	ctcaagaaa	gggtcggoga	cgtgctcagc		1080
gatgatcaga	tcaaggagtg	tgaggaatta	gggattcttg	tagacagaga	tgatcaaggg		1140
acgttgcttc	aaatcttcac	aaaaccacta	ggtgacaggc	cgacgatatt	tatagagata		1200
atccagagag	taggatgcat	gatgaaagat	gaggaagggg	aggcttacca	gagtggagga		1260
tgtgggtggt	ttggcaaagg	caatttctct	gagctcttca	agtcattga	agaatacgaa		1320
aagactcttg	aagccaaaca	gttagtggga	tga				1353

10

<210> 36

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> codificada por la SEC ID N.º: 35

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Ala

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> marcador Tag constituido por 6 His

<400> 36

ES 2 588 918 T3

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn  
1 5 10 15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys  
35 40 45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn  
50 55 60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys  
65 70 75 80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr  
85 90 95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
115 120 125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val  
130 135 140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile  
145 150 155 160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn  
165 170 175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu  
180 185 190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu  
195 200 205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr  
210 215 220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly  
225 230 235 240

Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala  
245 250 255

Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser  
260 265 270

ES 2 588 918 T3

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Ala Glu  
 275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu  
 290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp  
 305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly  
 325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys  
 340 345 350

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
 355 360 365

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

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
 385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
 405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
 420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
 435 440 445

Val Gly  
 450

- <210> 37
- <211> 1353
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (4)..(6)
- <223> secuencia que codifica Ala
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (7)..(24)
- <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His
- 20



ES 2 588 918 T3

<400> 37

```

atggctcacc accatcacca tcacccaaac gccgccgttt cagagaatca aaaccatgat      60
gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat ttccaagtt cgtaagaaaag    120
aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtcggc    180
gacgcaacca acgtcgtcgt tcgcttctcc tggggtctgg ggatgagatt ctccgccaaa    240
tcgatcttt ccaccggaaa catggttcac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc    300
cgattccttt tcaactgctc ttactctccg tctctctccg ccggagagat taaaccgaca    360
accacagctt ctatcccaag tttcgatcac ggctcttgtc gttccttctt ctcgtcacat    420
ggctctcggg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc    480
agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg    540
atcgctgagg ttaaaactata cggcgatggt gttctccgat atgttagtta caaagcagaa    600
gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc    660
ccattggatt atggatatcc gccgcttgac cacgccgtgg gaaacgttcc tgagcttggg    720
ccggctttaa cttatgtagc ggggttcaact ggttttcacc aattcgcac tttcacagca    780
gacgacgttg gaaccgccga gacgcggtta aattcagcgg tcctggctag caatgatgaa    840
atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag    900
acgtatcttg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac    960
atattcagga ccttgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg   1020
ccttctctct cgctacttta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc   1080
gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg   1140
acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggc cgacgatatt tatagagata   1200
atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaaggga aggcttacca gagtggagga   1260
tgtgggtggt ttggcaaagg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacгаа   1320
aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga                                     1353

```

<210> 38

5 <211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> codificada por la SEC ID N.º: 37

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

15 <223> Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

20 <223> marcador Tag constituido por 6 His

<400> 38

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1           5           10           15
Gln Asn His Asp Asp Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val
20           25           30

```



ES 2 588 918 T3

```

305                310                315                320
Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly
                325                330                335
Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys
                340                345                350
Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu
                355                360                365
Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln
                370                375                380
Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile
385                390                395                400
Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr
                405                410                415
Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu
                420                425                430
Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu
                435                440                445
Val Gly
                450

```

```

5 <210> 39
  <211> 1353
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante

  <220>
  <221> misc_feature
  <222> (4)..(6)
  <223> secuencia que codifica Ala

15 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (7)..(24)
  <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

20 <400> 39
  atggctcatc accatcacca tcaccaaaac gccgcggttt cagagaatca aaaccatgat      60
  gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat ttccaagtt cgtaagaaag      120
  aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtgcggc      180
  gacgcaacca acgtcgtctg tcgcttctcc tggggctctgg ggatgagatt ctccgccaaa      240

```

# ES 2 588 918 T3

```

tccgatcttt ccaccgaaa catggttcac gccctttacc tactcacctc cggtgacctc 300
cgattccttt tcaactgctcc ttactctccg tctctctccg cggagagat taaaccgaca 360
accacagctt ctatcccaag ttccgatcac ggctcttgtc gttccttctt ctcgtcacat 420
ggctctcggg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480
agtgtagcta atggcgctat tccttcgctg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg 540
atcgctgagg ttaaaactata cggcgatggt gttctccgat atgttagtta caaagcagaa 600
gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc 660
ccattggatt atggtatccg gccgcttgac cacgccgtgg gaaacgttcc tgagcctggg 720
ccggctttaa cttatgtagc ggggttcaact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780
gacgacgttg gaaccgccga gagcgggtta aattcagcgg cgtcggctag caatgatgaa 840
atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900
acgtatttgg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggtctgat gagtgaagac 960
atattcagga ccctgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020
ccttctctc cgctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080
gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140
acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggg cgacgatatt tatagagata 1200
atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaagggg aggcctacca gagtggagga 1260
tgtggtgggt ttggcaaagg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacгаа 1320
aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga 1353

```

<210> 40

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> codificada por la SEC ID N.º: 39

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

15 <223> Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

20 <223> marcador Tag constituido por 6 His

<400> 40

```

Met Ala His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1           5           10           15

```

```

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

```

```

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
                35           40           45

```

```

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
                50           55           60

```

```

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys

```



# ES 2 588 918 T3

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
 355 360 365  
 Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln  
 370 375 380  
 Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
 385 390 395 400  
 Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
 405 410 415  
 Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
 420 425 430  
 Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
 435 440 445  
 Val Gly  
 450

- <210> 41
  - <211> 1353
  - 5 <212> ADN
  - <213> Secuencia artificial
  - <220>
  - <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante
  
  - 10 <220>
  - <221> misc\_feature
  - <222> (4)..(6)
  - <223> secuencia que codifica Ala
  
  - 15 <220>
  - <221> misc\_feature
  - <222> (7)..(24)
  - <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His
  
  - 20 <400> 41
- ```

atggetcatc accatcacca tcaccaaac gccgcggtt cagagaatca aaaccatgat 60
gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat tttccaagtt cgtaagaaag 120
aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtcggc 180
gacgcaacca acgtcgtcgtc tcgcttctcc tggggctctgg ggatgagatt ctccgcaaaa 240
tccgatcttt ccaccggaaa catggttcac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc 300
cgattccttt tcaactgctcc ttactctcgg tctctctcgg ccggagagat taaaccgaca 360
accacagctt ctatcccaag tttcgatcac ggctcttgtc gttccttctt ctcgtcacat 420
ggctctcggg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480
agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg 540
atcgtgagg ttaaactata cggcgatggt gttctccgat atgtagtta caaagcagaa 600
gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc 660
ccattggatt atggtatccg gcggcttgac cagcccgtag gaaacgttcc tgagcttggt 720
  
```

ES 2 588 918 T3

```

ccggctttaa cttatgtagc ggggttcact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780
gacgacggtg gaaccgccga gagcggttta aattcagcgg tcttggctag caatgatgaa 840
atggttcttc tagcgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900
acgtatttgg aacataacga agggcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960
atattcagga ccttgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020
ccttctcctc cgcctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080
gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140
acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggc cgacgatatt tatagagata 1200
atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaagggg aggcctacca gagtggagga 1260
tgtggtggtt ttggcaaagg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacgaa 1320
aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga 1353

```

- <210> 42
- <211> 450
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> codificada por la SEC ID N.º: 41
  
- 10 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (2)..(2)
- <223> Ala
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(8)
- <223> marcador Tag constituido por 6 His
  
- 20 <400> 42

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1                    5                    10                    15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
                35                    40                    45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
                50                    55                    60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
65                    70                    75                    80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
                85                    90                    95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe

```

ES 2 588 918 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
| Asp | His | Gly | Ser | Cys | Arg | Ser | Phe | Phe | Ser | Ser | His | Gly | Leu | Gly | Val |  |
|     | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Arg | Ala | Val | Ala | Ile | Glu | Val | Glu | Asp | Ala | Glu | Ser | Ala | Phe | Ser | Ile |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Ser | Val | Ala | Asn | Gly | Ala | Ile | Pro | Ser | Ser | Pro | Pro | Ile | Val | Leu | Asn |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Glu | Ala | Val | Thr | Ile | Ala | Glu | Val | Lys | Leu | Tyr | Gly | Asp | Val | Val | Leu |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Arg | Tyr | Val | Ser | Tyr | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Glu | Lys | Ser | Glu | Phe | Leu |  |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Pro | Gly | Phe | Glu | Arg | Val | Glu | Asp | Ala | Ser | Ser | Phe | Pro | Leu | Asp | Tyr |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Gly | Ile | Arg | Arg | Leu | Asp | His | Ala | Val | Gly | Asn | Val | Pro | Glu | Leu | Gly |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Pro | Ala | Leu | Thr | Tyr | Val | Ala | Gly | Phe | Thr | Gly | Phe | His | Gln | Phe | Ala |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Glu | Phe | Thr | Ala | Asp | Asp | Val | Gly | Thr | Ala | Glu | Ser | Gly | Leu | Asn | Ser |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Ala | Val | Leu | Ala | Ser | Asn | Asp | Glu | Met | Val | Leu | Leu | Ala | Ile | Asn | Glu |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Pro | Val | His | Gly | Thr | Lys | Arg | Lys | Ser | Gln | Ile | Gln | Thr | Tyr | Leu | Glu |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| His | Asn | Glu | Gly | Ala | Gly | Leu | Gln | His | Leu | Ala | Leu | Met | Ser | Glu | Asp |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |  |
| Ile | Phe | Arg | Thr | Leu | Arg | Glu | Met | Arg | Lys | Arg | Ser | Ser | Ile | Gly | Gly |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Phe | Asp | Phe | Met | Pro | Ser | Pro | Pro | Pro | Thr | Tyr | Tyr | Gln | Asn | Leu | Lys |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Lys | Arg | Val | Gly | Asp | Val | Leu | Ser | Asp | Asp | Gln | Ile | Lys | Glu | Cys | Glu |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Glu | Leu | Gly | Ile | Leu | Val | Asp | Arg | Asp | Asp | Gln | Gly | Thr | Leu | Leu | Gln |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Ile | Phe | Thr | Lys | Pro | Leu | Gly | Asp | Arg | Pro | Thr | Ile | Phe | Ile | Glu | Ile |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |



# ES 2 588 918 T3

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
435 440 445

Val Gly  
450

<210> 43  
<211> 1353  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(6)  
15 <223> secuencia que codifica Ala

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(24)  
20 <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

<400> 43  
atggctcatc accatcacca tcacccaaaac gccgcggttt cagagaatca aaaccatgat 60  
gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat tttccaagtt cgtaagaaag 120  
aatccaaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtcggc 180  
gacgcaacca acgtcgcctg tcgcttctcc tggggtctgg ggatgagatt ctccgccaaa 240  
tccgatcttt ccaccggaaa catggttac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc 300  
cgattccttt tcaactgctc ttactctcgg tctctctcgg ccggagagat taaaccgaca 360  
accacagctt ctatcccaag tttcgatcac ggctcttgtc gttccttctt ctcgtcacat 420  
gggtctcggg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480  
agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg 540  
atcgcgtgagg ttaaactata cggcgatggt gttctccgat atgtagtta caaagcagaa 600  
gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcagagcgtg tagaggatgc gtcgctcgttc 660  
ccattggatt atggtatccg gggccttgac cagccggtgg gaaacgttcc tgagcttggg 720  
ccggctttaa cttatgtagc ggggttcact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780  
gacgacggtg gaaccgccga gagcggttta aattcagcgg tcctggctag caatgatgaa 840  
atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900  
acgtatttgg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960  
atattcagga ccctgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020  
ccttctctc cgctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggctcggcga cgtgctcagc 1080  
gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattatgg tagacagaga tgatcaaggg 1140  
acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggg cgacgatatt tatagagata 1200

# ES 2 588 918 T3

```

atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaaggga aggcttacca gagtggagga 1260
tgtggtgggtt ttggcaaagc caattttctct gagctcttca agtccattga agaatacгаа 1320
aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga 1353

```

```

<210> 44
<211> 450
5 <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> codificada por la SEC ID N.º: 43
10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Ala
15
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(8)
<223> marcador Tag constituido por 6 His
20
<400> 44
    Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
    1                5                10                15

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

    Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
                35                40                45

    Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
    50                55                60

    Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
    65                70                75                80

    Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
                85                90                95

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

    Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
                115                120                125

    Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
    130                135                140

    Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
    145                150                155                160

```

ES 2 588 918 T3

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn  
165 170 175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu  
180 185 190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu  
195 200 205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr  
210 215 220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly  
225 230 235 240

Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala  
245 250 255

Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser  
260 265 270

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu  
275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu  
290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp  
305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly  
325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys  
340 345 350

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
355 360 365

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

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
420 425 430

ES 2 588 918 T3

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
 435 440 445

Val Gly  
 450

<210> 45  
 <211> 1353  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(6)  
 <223> secuencia que codifica Ala

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

20 <400> 45  
 atggctcatc accatcacca tcaccaaaac ggcgcggtt cagagaatca aaacctgat 60  
 gacggcgctg cgtcgtcggc gggattcaag ctcgtcggat tttccaagtt cgtaagaaag 120  
 aatccaaagt ctgataaatt caaggtaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtgcggc 180  
 gacgcaacca acgtcgtctg tcgcttctcc tggggctctgg ggatgagatt ctccgccaaa 240  
 tccgatcttt ccaccggaaa catggttcac gcctcttacc tactcacctc cggtgacctc 300  
 cgattccttt tcactgctcc ttactctcgg tctctctcgg ccggagagat taaaccgaca 360  
 accacagctt ctatcccaag tttcgatcac ggctcttgtc gttccttctt ctcgtcacat 420  
 ggtctcgggtg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480  
 agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg 540  
 atcgtcaggg ttaaactata cggcgatggt gttctccgat atgtagtta caaagcagaa 600  
 gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc 660  
 ccatcggatt atggtatccg gcggcctgac cacgcctggg gaaacgttcc tgagcttggg 720  
 ccggctttaa cttatgtagc ggggttcaact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780  
 gacgacggtg gaaccgccga gagcggttta aattcagcgg tcctggctag caatgatgaa 840  
 atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900  
 acgtatcggg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960  
 atattcagga ccctgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020  
 ccttctcctc cgctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080  
 gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140  
 acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacaggc cgacgatatt tatagagata 1200  
 atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaaggga aggcctacca gagtggagga 1260  
 tgtggtggtt ttggcattgg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacгаа 1320  
 aagactcttg aagccaaaaca gttagtggga tga 1353

<210> 46  
 25 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 588 918 T3

<220>

<223> codificada por la SEC ID N.º: 45

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Ala

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> marcador Tag constituido por 6 His

<400> 46

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1                               5                               10           15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
                35                               40           45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
                50                               55           60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
65                               70                               75           80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
                85                               90           95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
                115                              120           125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
                130                              135           140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
145                              150           155           160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn
                165                              170           175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
                180                              185           190

```

15

ES 2 588 918 T3

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu  
 195 200 205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr  
 210 215 220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly  
 225 230 235 240

Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala  
 245 250 255

Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser  
 260 265 270

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu  
 275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu  
 290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp  
 305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly  
 325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys  
 340 345 350

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
 355 360 365

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

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
 385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
 405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
 420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
 435 440 445

Val Gly  
 450

ES 2 588 918 T3

<211> 1353  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante

<220>  
 <221> misc\_feature

10 <222> (4)..(6)  
 <223> secuencia que codifica Ala

<220>  
 <221> misc\_feature

15 <222> (7)..(24)  
 <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

<400> 47

|             |            |             |            |            |            |      |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| atgggtcctc  | accatcacca | tcacccaaaac | gcccgcggtt | cagagaatca | aaaccatgat | 60   |
| gacggcgctg  | cgtcgtcgcc | gggattcaag  | ctcgtcggat | ttccaagtt  | cgtaagaaag | 120  |
| aatccaaaagt | ctgataaatt | caaggttaag  | cgcttccatc | acatcgagtt | ctgggtcggc | 180  |
| gacgcaacca  | acgtcgcctg | tcgcttctcc  | tggggctctg | ggatgagatt | ctccgccaaa | 240  |
| tccgatcttt  | ccaccggaaa | catggttcac  | gcctcttacc | tactcacctc | cggtgacctc | 300  |
| cgattccttt  | tcactgctcc | ttactctccg  | tctctctccg | ccggagagat | taaaccgaca | 360  |
| accacagctt  | ctatcccaag | tttcgatcac  | ggctcttgtc | gttccttctt | ctcgtcacat | 420  |
| ggctctcggg  | ttagagccgt | tgcgattgaa  | gtagaagacg | cagagtcagc | tttctccatc | 480  |
| agtgtagcta  | atggcgctat | tccttcgctg  | ctccttatcg | tcctcaatga | agcagttacg | 540  |
| atcgtcgagg  | ttaaactata | cggcgatggt  | gttctccgat | atgtagtta  | caaagcagaa | 600  |
| gataccgaaa  | aatccgaatt | cttgccaggg  | ttcgagcgtg | tagaggatgc | gtcgtcgttc | 660  |
| ccattggatt  | atggtatccg | gcggcttgac  | cacgccgtgg | gaaacgttcc | tgagcttggg | 720  |
| ccggctttaa  | cttatgtagc | ggggttcact  | ggttttcacc | aattcgcaga | gttcacagca | 780  |
| gacgacgttg  | gaaccgcca  | gagcggttta  | aattcagcgg | tcctggctag | caatgatgaa | 840  |
| atggttcttc  | taccgattaa | cgagccagtg  | cacggaacaa | agaggaagag | tcagattcag | 900  |
| acgtatttgg  | aacataacga | aggcgcaggg  | ctacaacatc | tggctctgat | gagtgaagac | 960  |
| atattcagga  | ccctgagaga | gatgaggaag  | aggagcagta | ttggaggatt | cgacttcatg | 1020 |
| ccttctcctc  | cgcctactta | ctaccagaat  | ctcaagaaac | gggtcggcga | cgtgctcagc | 1080 |
| gatgatcaga  | tcaaggagtg | tgaggaatta  | gggattcttg | tagacagaga | tgatcaaggg | 1140 |
| acgttgcttc  | aaatcttcac | aaaaccacta  | ggtgacaggg | cgacgatatt | tatagagata | 1200 |
| atccagagag  | taggatgcat | gatgaaagat  | gaggaagggg | aggcttacca | gagtggagga | 1260 |
| tgtggtggtt  | ttggccaggg | caatttctct  | gagctcttca | agtccattga | agaatacga  | 1320 |
| aagactcttg  | aagccaaaca | gttagtggga  | tga        |            |            | 1353 |

20 <210> 48  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> codificada por la SEC ID N.º: 47

<220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ala

ES 2 588 918 T3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> marcador Tag constituido por 6 His

5

<400> 48

```

Met Ala His His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn
1          5          10          15

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

Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys
          35          40          45

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
          50          55          60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
65          70          75          80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
          85          90          95

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

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
          115          120          125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
          130          135          140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
145          150          155          160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn
          165          170          175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
          180          185          190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu
          195          200          205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr
          210          215          220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly

```



ES 2 588 918 T3

```

225                230                235                240
Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala
                245                250                255
Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser
                260                265                270
Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu
                275                280                285
Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu
                290                295                300
His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp
305                310                315                320
Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly
                325                330                335
Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys
                340                345                350
Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu
                355                360                365
Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln
                370                375                380
Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile
385                390                395                400
Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr
                405                410                415
Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Gln Gly Asn Phe Ser Glu Leu
                420                425                430
Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu
                435                440                445
Val Gly
                450

```

<210> 49  
 <211> 1353  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido HPPD mutante

10 <220>

ES 2 588 918 T3

<221> misc\_feature  
 <222> (4)..(6)  
 <223> secuencia que codifica Ala

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 <223> secuencia que codifica un marcador Tag que contiene 6 His

10 <400> 49  
 atggctcacc accatcaacca tcaccaaaaac gccgcggttt cagagaaatca aaaccatgat 60  
 gacggcgctg cgtcgtcgcc gggattcaag ctcgtcggat ttccaagtt cgtaagaaaag 120  
 aatccaaagt ctgataaatt caaggttaag cgcttccatc acatcgagtt ctgggtgcggc 180  
 gacgcaacca acgtcgtcgtc tcgcttctcc tggggtctgg ggatgagatt ctccgccaaa 240  
 tccgatcttt ccaccggaaa catggttcac gccctttacc tactcacctc cggtgacctc 300  
 cgattccttt tcaactgctcc ttactctccg tctctctccg ccggagagat taaaccgaca 360  
 accacagctt ctatcccaag tttagatcac ggctcttgct gtctctctt ctcgtcacat 420  
 ggtctcgggtg ttagagccgt tgcgattgaa gtagaagacg cagagtcagc tttctccatc 480  
 agtgtagcta atggcgctat tccttcgtcg cctcctatcg tcctcaatga agcagttacg 540  
 atcgctgagg ttaaaactata cggcgatggt gttctccgat atgttagtta caaagcagaa 600  
 gataccgaaa aatccgaatt cttgccaggg ttcgagcgtg tagaggatgc gtcgtcgttc 660  
 ccattggatt atgggtatccg gccggttgac cacgccgtgg gaaacgttcc tgagcttggg 720  
 ccggctttaa cttatgtagc ggggttcaact ggttttcacc aattcgcaga gttcacagca 780  
 gacgacgttg gaaccgcga gagcggttta aattcagcgg tcctggctag caatgatgaa 840  
 atggttcttc taccgattaa cgagccagtg cacggaacaa agaggaagag tcagattcag 900  
 acgtatttg aacataacga aggcgcaggg ctacaacatc tggctctgat gagtgaagac 960  
 atattcagga ccttgagaga gatgaggaag aggagcagta ttggaggatt cgacttcatg 1020  
 ccttctctc cgctactta ctaccagaat ctcaagaaac gggtcggcga cgtgctcagc 1080  
 gatgatcaga tcaaggagtg tgaggaatta gggattcttg tagacagaga tgatcaaggg 1140  
 acgttgcttc aaatcttcac aaaaccacta ggtgacagggc cgacgatatt tatagagata 1200  
 atccagagag taggatgcat gatgaaagat gaggaaggga aggcttacca gagtggagga 1260  
 tgtgggtggt ttggcgtggg caatttctct gagctcttca agtccattga agaatacga 1320  
 aagactcttg aagccaaaca gttagtggga tga 1353

<210> 50  
 <211> 450  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> codificada por la SEC ID N.º: 49

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ala

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> marcador Tag constituido por 6 His

30 <400> 50

# ES 2 588 918 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | His | His | His | His | His | His | Gln | Asn | Ala | Ala | Val | Ser | Glu | Asn |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gln | Asn | His | Asp | Asp | Gly | Ala | Ala | Ser | Ser | Pro | Gly | Phe | Lys | Leu | Val |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Phe | Ser | Lys | Phe | Val | Arg | Lys | Asn | Pro | Lys | Ser | Asp | Lys | Phe | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Val | Lys | Arg | Phe | His | His | Ile | Glu | Phe | Trp | Cys | Gly | Asp | Ala | Thr | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Val | Ala | Arg | Arg | Phe | Ser | Trp | Gly | Leu | Gly | Met | Arg | Phe | Ser | Ala | Lys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ser | Asp | Leu | Ser | Thr | Gly | Asn | Met | Val | His | Ala | Ser | Tyr | Leu | Leu | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Gly | Asp | Leu | Arg | Phe | Leu | Phe | Thr | Ala | Pro | Tyr | Ser | Pro | Ser | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ser | Ala | Gly | Glu | Ile | Lys | Pro | Thr | Thr | Thr | Ala | Ser | Ile | Pro | Ser | Phe |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Asp | His | Gly | Ser | Cys | Arg | Ser | Phe | Phe | Ser | Ser | His | Gly | Leu | Gly | Val |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Arg | Ala | Val | Ala | Ile | Glu | Val | Glu | Asp | Ala | Glu | Ser | Ala | Phe | Ser | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Val | Ala | Asn | Gly | Ala | Ile | Pro | Ser | Ser | Pro | Pro | Ile | Val | Leu | Asn |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Glu | Ala | Val | Thr | Ile | Ala | Glu | Val | Lys | Leu | Tyr | Gly | Asp | Val | Val | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | Tyr | Val | Ser | Tyr | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Glu | Lys | Ser | Glu | Phe | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | Gly | Phe | Glu | Arg | Val | Glu | Asp | Ala | Ser | Ser | Phe | Pro | Leu | Asp | Tyr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Gly | Ile | Arg | Arg | Leu | Asp | His | Ala | Val | Gly | Asn | Val | Pro | Glu | Leu | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Ala | Leu | Thr | Tyr | Val | Ala | Gly | Phe | Thr | Gly | Phe | His | Gln | Phe | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Phe | Thr | Ala | Asp | Asp | Val | Gly | Thr | Ala | Glu | Ser | Gly | Leu | Asn | Ser |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |

# ES 2 588 918 T3

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu  
275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu  
290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp  
305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly  
325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys  
340 345 350

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu  
355 360 365

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

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile  
385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr  
405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Val Gly Asn Phe Ser Glu Leu  
420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu  
435 440 445

Val Gly  
450

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de HPPD mutada, en donde dicha proteína de HPPD mutada tiene actividad de HPPD y en donde en dicha proteína de HPPD mutada el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2 ha sido reemplazado de tal modo que la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición correspondiente a la posición 250 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2:
- 5
2. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD se deriva de *Streptomyces avermitilis* (Genebank SAV11864), *Daucus carota* (Genebank DCU 87257), *Arabidopsis thaliana* (Genebank AF047834), *Mycosphaerella graminicola* (Genebank AF038152), *Oryza sativa* / arroz [BAD26248], *Zea mays* / maíz [ACN36372], *Avena sativa* [ABZ23427], *Pseudomonas fluorescens* [ABF50055], *Synechococcus* sp. [YP\_473959], *Blepharisma japonicum* [BAF91881], *Rhodococcus* RHA1 sp. ro0240 [YP\_702005], *Rhodococcus* RHA1 sp. ro0341 [YP\_703002], *Picrophilus torridus* [YP\_024147], *Kordia algicida* [ZP\_02161490], *Sorghum bicolor* [XP\_002453359], *Triticum aestivum* / trigo [AAZ67144],
- 10
- u *Hordeum vulgare* / cebada [O48604].
3. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 4 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr, en la posición 247 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 4 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 20
4. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 6 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 224 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 6 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 25
5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 30
6. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 10 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Phe, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 188 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 10 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 35
7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 14 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 169 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 14 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 40
8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 16 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr o Val en la posición 209 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 16 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 45
9. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 18 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 231 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 18 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 50
10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 30 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 232 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 30 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 55
11. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 20 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 201 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 20 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 22 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 219 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 22 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).

13. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 24 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 24 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 5 14. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 26 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 237 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 26 (que corresponde a la posición 250 de la SEC ID N.º: 2).
- 10 15. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha proteína HPPD comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2 y en donde la secuencia de aminoácidos resultante comprende un aminoácido seleccionado de Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en la posición 250 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.
16. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicha proteína HPPD es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD.
- 15 17. Una proteína codificada por el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
18. Un gen quimérico que comprende una secuencia codificada que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 unido operativamente a un promotor expresable en plantas y opcionalmente una terminación de transcripción y una región de poliadenilación.
- 20 19. Un procedimiento de obtención de una proteína HPPD mutada capaz de modular la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD, en donde dicha proteína HPPD mutada tiene actividad HPPD, comprendiendo el procedimiento
- i) proporcionar una proteína HPPD;
- ii) reemplazar un aminoácido en dicha proteína HPPD de tal forma que la secuencia de aminoácidos resultante comprende uno seleccionado de Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr en una posición en una proteína HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 250 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2;
- 25 iii) determinar la inhibición de la proteína HPPD resultante por al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD, en donde una inhibición de la proteína resultante de menos o más que la observada con una proteína de HPPD de referencia es indicativa de que la proteína resultante es capaz de modular la tolerancia de una planta a dicho herbicida.
- 30 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha proteína HPPD mutada es capaz de incrementar la tolerancia de una planta a al menos un herbicida inhibidor de la HPPD.
21. El ácido nucleico de la reivindicación 16 o el procedimiento de la reivindicación 20, en donde el herbicida que actúa sobre la HPPD es tembrotriona.
- 35 22. Un procedimiento de producción de una planta transgénica que comprende introducir dentro de dicha planta el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o un ácido nucleico que codifica la enzima HPPD identificada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, ambos unidos operativamente a un promotor expresable en plantas o el gen quimérico de la reivindicación 19.
- 40 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el ácido nucleico de la reivindicación 16 o un ácido nucleico identificado por el procedimiento de las reivindicaciones 19 o 20, ambos unidos operativamente a un promotor expresable en plantas, o el gen quimérico de la reivindicación 18 que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, se introducen en dicha planta.
24. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23, en donde dicha proteína HPPD comprende:
- 45 a) una His en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 226 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;
- b) una Ser en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;
- c) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 282 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;
- 50 d) una His en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 308 de la

secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

e) una Tyr en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 342 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

5 f) una Glu en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 394 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

g) una Gly en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 420 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2;

h) una Asn en una posición en una proteína de HPPD, correspondiendo dicha posición a la posición 423 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2.

10 25. Una célula vegetal que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 del gen quimérico de la reivindicación 19 en su información genética.

26. Una planta, una parte de la misma o un tejido vegetal que consisten esencialmente en las células vegetales de la reivindicación 25.

27. Una planta obtenible a partir del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23.

15 28. La planta de las reivindicaciones 25 o 26 que se selecciona de trigo, algodón, colza, arroz, maíz, soja y sorgo.

29. Una semilla de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o el gen quimérico de la reivindicación 18 en su información genética.

20 30. Progenie de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28 o la semilla de la reivindicación 29, que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o el gen quimérico de la reivindicación 18 en su información genética.

25 31. Un procedimiento de modulación de la tolerancia de una planta a al menos un herbicida que actúa sobre la HPPD o de obtención de una planta tolerante a un herbicida inhibidor de la HPPD que comprende introducir el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 unido operativamente a un promotor expresable en plantas o el gen quimérico de la reivindicación 18, dentro del genoma de una planta.

32. Uso de un gen quimérico de la reivindicación 18 o del ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 unido operativamente a un promotor expresable en plantas para modular la tolerancia de una planta a al menos un herbicida inhibidor de la HPPD aplicado para controlar malas hierbas.

30 33. El procedimiento de las reivindicaciones 19, 22, 31 o el uso de la reivindicación 32, en los que se incrementa la tolerancia de una planta a al menos un herbicida inhibidor de la HPPD.

Figura 1a: superposición de la estructura de rayos X de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (gris oscuro) y *Pseudomonas fluorescens* (gris claro). La estructura se muestra como gráfico de cintas.

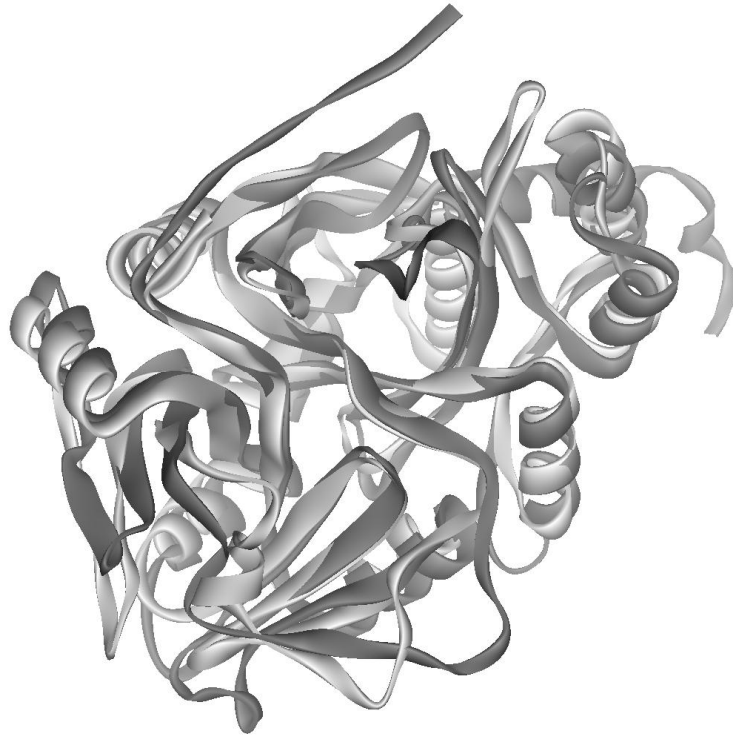




Figura 1b: superposición de la estructura de rayos X de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (gris oscuro) y *Streptomyces avermitilis* (gris claro). La estructura se muestra como gráfico de cintas.

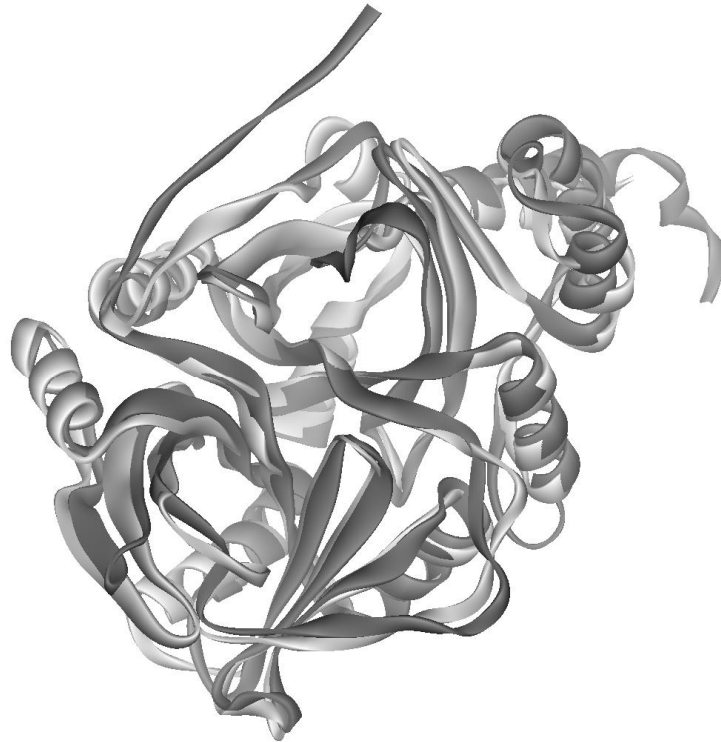


Figura 1c: superposición de la estructura de rayos X de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (gris oscuro) y *Homo sapiens* (gris claro). La estructura se muestra como gráfico de cintas.

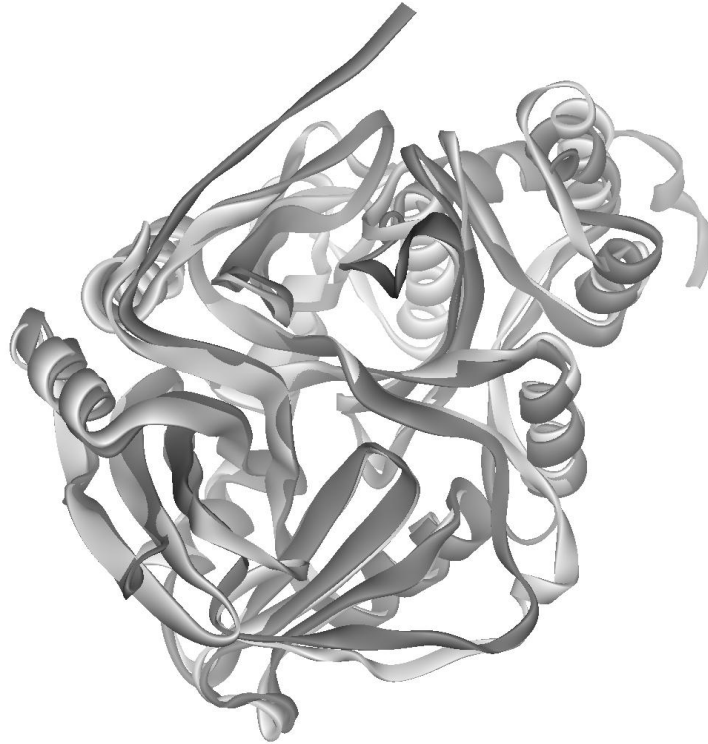


Figura 1d: superposición de la estructura de rayos X de HPPD de *Arabidopsis thaliana* (gris oscuro) y *Rattus norvegicus* (gris claro). La estructura se muestra como gráfico de cintas.

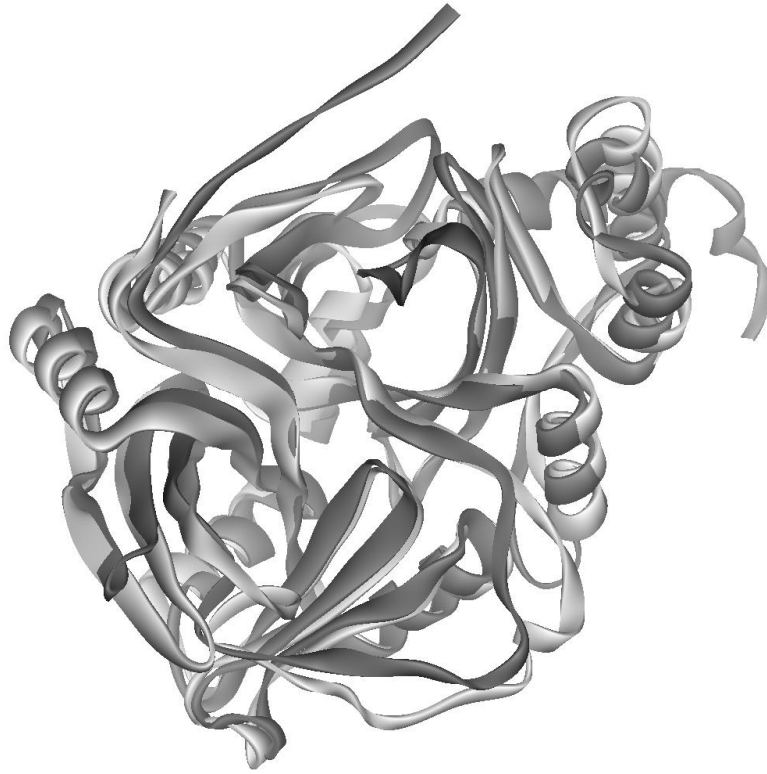


Figura 2a: aminoácidos que forman el sitio de unión de *Arabidopsis thaliana* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD de *Arabidopsis thaliana* se muestra como traza de  $C_{\alpha}$  y el hierro está marcado.



Figura 2b: aminoácidos que forman el sitio de unión de *Pseudomonas fluorescens* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* se muestra como traza de C<sub>alfa</sub> y el hierro está marcado.

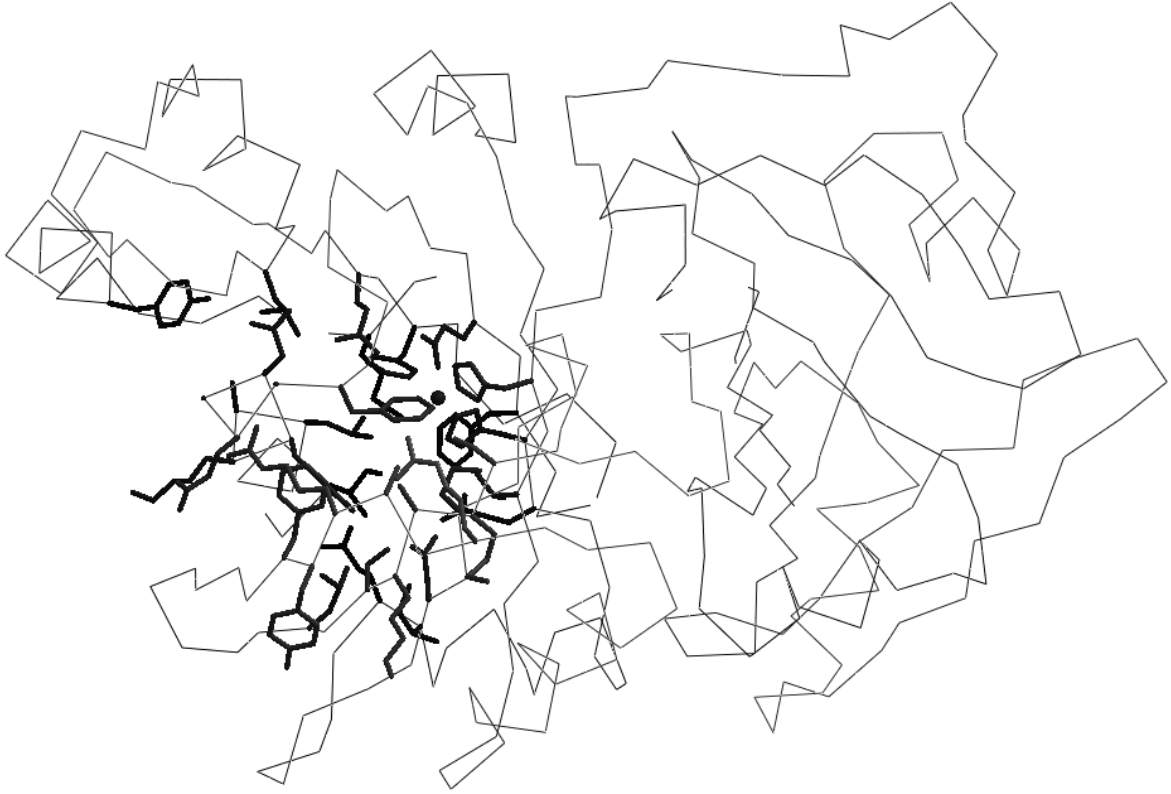


Figura 2c: aminoácidos que forman el sitio de unión de *Streptomyces avermitilis* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD de *Streptomyces avermitilis* se muestra como traza de  $C_{\alpha}$  y el hierro está marcado.

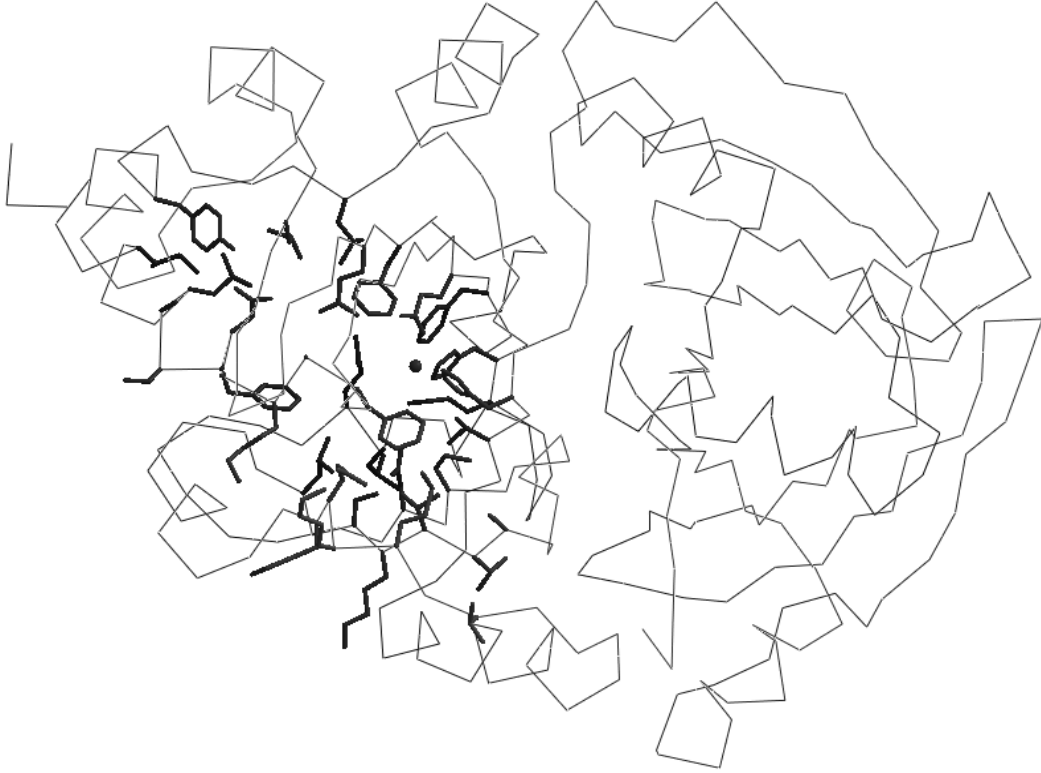


Figura 2d: aminoácidos que forman el sitio de unión de *Homo sapiens* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD de *Homo sapiens* se muestra como traza de C<sub>alfa</sub> y el hierro está marcado.

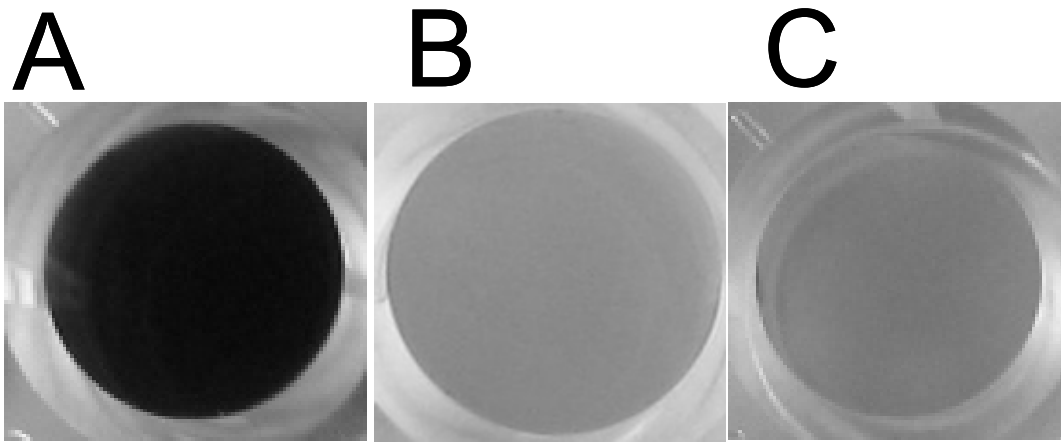


Figura 2e: aminoácidos que forman el sitio de unión de *Rattus norvegicus* (representado por líneas en negrita). El núcleo de la proteína de HPPD de *Rattus norvegicus* se muestra como traza de  $C_{\alpha}$  y el hierro está marcado.





FIGURA 3: color de ensayo marrón



A: WT, B: N282A, C: S267A