

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 279**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2010** E 12197965 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** EP 2573183

54 Título: **Polipéptidos de Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa mutantes y métodos de uso**

30 Prioridad:

22.01.2009 US 146513 P
10.07.2009 US 224661 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2017

73 Titular/es:

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG. (100.0%)
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

HAWKES, TIMOTHY ROBERT;
LANGFORD, MICHAEL, PHILLIP;
VINER, RUSSELL COLIN;
VERNOOIJ, BERNARDUS, THEODORUS, MARIA
y
DALE, RICHARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 619 279 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

Polipéptidos de Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa mutantes y métodos de uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) mutantes que confieren resistencia o tolerancia a herbicidas a plantas, y a las secuencia de ácidos nucleicos que los codifican. Los métodos de la invención se refieren a la producción y uso de plantas que expresan estos polipéptidos de HPPD mutantes, y que son resistentes a herbicidas de HPPD.

Antecedentes de la invención

10 Las hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD) son enzimas que catalizan la reacción en la que para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esta reacción tiene lugar en presencia de hierro enlazado a enzima (Fe^{2+}) y oxígeno. Los herbicidas que actúan inhibiendo HPPD son bien conocidos, e incluyen isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas, y pirazolinatos (Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD) – The Herbicide Target". In *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220). La inhibición de HPPD bloquea la biosíntesis de plastoquinona (PQ) a partir de

15 tirosina. PQ es un cofactor esencial en la biosíntesis de pigmentos carotenoides que son esenciales para la fotoprotección de los centros fotosintéticos. Los herbicidas que inhiben la HPPD son blanqueadores móviles en el floema que provocan que los nuevos meristemas y hojas expuestos a la luz salgan blancos. En ausencia de carotenoides, la clorofila es fotodestruida y se convierte ella misma en un agente de fotodestrucción *vía* la fotogeneración de oxígeno singlete.

20 También se conocen métodos para proporcionar plantas que sean tolerantes a los herbicidas de HPPD y estos han incluido: 1) sobreexpresar la enzima HPPD para producir cantidades de enzima HPPD en la planta que sean suficientes con relación a un herbicida dado a fin de tener suficiente enzima funcional disponible a pesar de la presencia de su inhibidor; y 2) mutar la enzima HPPD diana en una HPPD funcional que sea menos sensible a los herbicidas. Respecto a las HPPD mutantes, mientras que una enzima HPPD mutante dada puede proporcionar un

25 nivel útil de tolerancia a ciertos herbicidas inhibidores de HPPD, la misma HPPD mutante puede ser bastante inadecuada para proporcionar niveles comerciales de tolerancia a un herbicida diferente, más deseable, inhibidor de HPPD (véase, *por ejemplo*, Pub. Sol. de U.S. n° 2004/0058427; y Pub. Sol. PCT n°s WO 98/20144 y WO 02/46387; véase también la Pub. Sol. de U.S. n° 2005/0246800 que se refiere a la identificación y al marcaje de variedades de haba de soja como relativamente tolerantes a HPPD). Por ejemplo, los herbicidas inhibidores de HPPD pueden

30 diferir en lo que se refiere al espectro de malezas que controlan, su coste de producción y sus beneficios medioambientales.

En consecuencia, se necesitan nuevos métodos y composiciones para conferir tolerancia a herbicidas de HPPD en diversos cultivos y variedades de cultivos.

Breve resumen de la invención

35 Se proporcionan composiciones y métodos para conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD). Las composiciones incluyen secuencias nucleotídicas y de aminoácidos para polipéptidos de HPPD mutantes. Los polipéptidos de la invención son HPPD mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD y que confieren resistencia o tolerancia en las plantas a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. En una realización, un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD que tiene actividad

40 enzimática de HPPD, donde dicho polinucleótido deriva de una planta y donde dicho polipéptido de HPPD codificado por dicho polinucleótido tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 27 y comprende la secuencia de aminoácidos G(I,V)LVD(R,K)D (SEC ID NO: 30), donde L se sustituye por M.

45 En un aspecto, las composiciones de la divulgación comprenden un polipéptido de HPPD mutante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 27, donde el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD, y donde el polipéptido contiene una o más adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

1) R(K,A,R)SQI(Q,E)T (SEC ID NO: 28), donde la primera Q se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por A, G, M, T, S, C, R, F y más particularmente por P;

50 2) R(K,A,R)SQI(Q,E)T (SEC ID NO: 28), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por V, S, A, P, T, L o G;

3) (P,A,S)G(V,L)QH(I,L,M) (SEC ID NO: 29), donde la Q se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por N, R, G, A, S, T, E o C, y más particularmente por A o H;

ES 2 619 279 T3

- 4) G(I,V) LVD(R,K)D (SEC ID NO: 30), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por M o A;
- 5) ESGLN(S,G) (SEC ID NO: 31), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por M, H, G, F, C o I, y más particularmente por M;
- 5 6) F(A,S)EF(T,V) (SEC ID NO: 32), donde (A,S) se sustituye por cualquier aminoácido, particularmente por W, G, M, F, Y o H;
- 7) G(I,V) LVD(R,K)D (SEC ID NO: 30) y ESGLN(S,G) (SEC ID NO: 31), donde la L en ambas secuencias se sustituye por M;
- 10 8) EVELYGDVV (SEC ID NO: 37), donde la Y se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por D, V, E, K o A;
- 9) RFDHVVGNV (SEC ID NO: 38), donde la primera V se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como I, A, M o C;
- 10) DHVVGNVPE (SEC ID NO: 39), donde la G se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como H o C;
- 11) HVVGNVPEM (SEC ID NO: 40), donde la N se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como C;
- 15 12) NVPEMAPVI (SEC ID NO: 41), donde la M se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como L;
- 13) GFHEFAEFT (SEC ID NO: 42), donde la F se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como M, I o L;
- 14) GTTESGLNS (SEC ID NO: 43), donde la S se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como T;
- 15) TTESGLNSV (SEC ID NO: 44), donde la G se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como R, S o A;
- 20 16) ESGLNSVVL (SEC ID NO: 45), donde la N se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como R o M;
- 17) GLNSVVLAN (SEC ID NO: 46), donde la primera V se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como M, I, A o K;
- 18) LNSVVLANN (SEC ID NO: 47), donde la V se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como I;
- 19) SEAVLLPLN (SEC ID NO: 48), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como V o K;
- 25 20) EAVLLPLNE (SEC ID NO: 49), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como M o F;
- 21) VLLPLNEPV (SEC ID NO: 50), donde la tercera L se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como I, M o V;
- 22) LLPLNEPVH (SEC ID NO: 51), donde la N se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como A;
- 23) HGTKRRSQI (SEC ID NO: 52), donde la R se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como G;
- 30 24) SGIQTYLEY (SEC ID NO: 53), donde la T se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como E;
- 25) QIQTYLEYH (SEC ID NO: 54), donde la Y se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como F;
- 26) GVQHIALAS (SEC ID NO: 55), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como M, L o V;
- 27) GFEFMAPPQ (SEC ID NO: 57), donde la M se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como Q o L;

ES 2 619 279 T3

- 28) FEFMAPPQA (SEC ID NO: 58), donde la primera A se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como S, P, D, R, N, Y, K o H;
- 29) FMAPPQAKY (SEC ID NO: 59), donde la P se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como A o R;
- 5 30) QAKYYEGVR (SEC ID NO: 60), donde la Y se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como K, R, D, Q o E;
- 31) GVRRIAGDV (SEC ID NO: 61), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como R o L;
- 32) VLLQIFTKP (SEC ID NO: 62), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como V;
- 33) LLQIFTKPV (SEC ID NO: 63), donde la F se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como L;
- 10 34) LQIFTKPVG (SEC ID NO: 64), donde la T se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como S, P, D, R, N, Y o H;
- 35) IFTKPVGDR (SEC ID NO: 65), donde la P se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como N;
- 36) RPTFFLEMI (SEC ID NO: 66), donde la F se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como L;
- 37) FLEMIQRIG (SEC ID NO: 67), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como V o C;
- 15 38) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la cuarta G se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como A, S o T;
- 39) GGFGKGNFS (SEC ID NO: 69), donde la K se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como L, A, E o V;
- 40) GFGKGNFSE (SEC ID NO: 70), donde la G se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como I;
- 41) FGKGNFSEL (SEC ID NO: 71), donde la N se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como I;
- 20 42) KGNFSELFK (SEC ID NO: 72), donde la S se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como N, G, K o Q;
- 43) GNFSELFKS (SEC ID NO: 73), donde la E se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como Q;
- 44) ELFKSIEDY (SEC ID NO: 74), donde la S se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como A;
- 45) LFKSIEDYE (SEC ID NO: 75), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido; tal como L o F;
- 25 46) HVVGNVPEM (SEC ID NO: 40), donde la N se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una C, y la secuencia de aminoácidos ELGVLVDRD (SEC ID NO:76), donde la segunda L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una M;
- 30 47) LNSVVLANN (SEC ID NO: 47), donde la segunda V se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una I, y la secuencia de aminoácidos ELGVLVDRD (SEC ID NO:76), donde la segunda L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una M;
- 48) VLLPLNEPV (SEC ID NO: 50), donde la tercera L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una M, y la secuencia de aminoácidos VLLQIFTKP (SEC ID NO:62), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una V;
- 35 49) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la cuarta G se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una T, y la secuencia de aminoácidos ELGVLVDRD (SEC ID NO:76), donde la segunda L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente una M;

- 50) FHEFAEFTAED (SEC ID NO: 76), donde la primera A, la segunda E, y la segunda F se sustituyen por cualquier otro aminoácido, particularmente donde la A se sustituye por una S o una W, la E se sustituye por una T y/o la F se sustituye por una A o una V;
- 5 51) HGTKRRSQQ (SEC ID NO: 77), donde la primera R se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por una K, y la segunda R se suprime;
- 52) GTKRRSQQ (SEC ID NO: 78), donde la segunda R se suprime;
- 53) FMAPPQAKY (SEC ID NO: 59), donde la segunda P se suprime;
- 54) GNFSELFKS (SEC ID NO: 73), donde la E se suprime;
- 55) GVRRIAGDV (SEC ID NO: 61), donde la I se suprime;
- 10 56) DQGVLLQIFTKP (SEC ID NO: 79), donde la primera L y la I se sustituyen por cualquier otro aminoácido, particularmente donde la A se sustituye por una M y/o la I se sustituye por una L;
- 57) GKGNFSELFK (SEC ID NO: 80), donde la F y la S se sustituyen por cualquier otro aminoácido, particularmente donde la F se sustituye por una G y/o la S se sustituye por una A;
- 15 58) KGNFSELFKS (SEC ID NO: 56), donde la primera S y la E se sustituyen por cualquier otro aminoácido, particularmente donde la S se sustituye por una N, G o K y/o la E se sustituye por una S o una A;
- 59) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68) donde la K se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como T, S, Q, L, A, I, H, E, G, M, C o V, preferiblemente T;
- 60) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la sexta G se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como R, E, D, H, M, F, W, N o C, preferiblemente H o C;
- 20 61) ESGLN(S,G) (SEC ID NO: 31), donde la primera G se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por R, S o A; y
- 62) VLLPLNEPV (SEC ID NO: 50), donde la segunda L se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como M, F o V.
- 25 En otro aspecto, las composiciones de la divulgación comprenden un polipéptido de HPPD mutante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO:14 o con SEC ID NO:27, donde el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD, y donde el polipéptido contiene una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
- 1) R(K,A,R)SQI(Q,E)T (SEC ID NO: 28), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por V, S, A, P, T, L o G;
- 30 2) (P,A,S)G(V,L)QH(I,L,M) (SEC ID NO: 29), donde la Q se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por N, R, G, A, S, T, E o C, y más particularmente por A o H;
- 3) G(I,V) LVD(R,K)D (SEC ID NO: 30), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por M o A;
- 35 4) ESGLN(S,G) (SEC ID NO: 31), donde la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente por M, H, G, F, C o I, y más particularmente por M;
- 5) F(A,S)EF(T,V) (SEC ID NO: 32), donde la (A,S) se sustituye por cualquier aminoácido, particularmente por W, G, M, F, Y o H;
- 6) RFDHVVGNV (SEC ID NO:38), donde la primera V se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como I, A, M o C;
- 40 7) GLNSVVLAN (SEC ID NO: 46), donde la primera V se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como M, I, A o K;
- 8) VLLPLNEPV (SEC ID NO: 50), donde la tercera L se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como I, M o V;

9) GFEFMAPPQ (SEC ID NO: 57), donde la M se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como Q o L;

10) FEFMAPPQA (SEC ID NO: 58), donde la primera A se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como S, P, D, R, N, Y, K o H;

5 11) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la cuarta G se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como A, S o T;

12) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68) donde la K se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como T, S, Q, L, A, I, H, E, G, M, C o V, preferiblemente T;

13) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la sexta G se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como R, E, D, H, M, F, W, N o C, preferiblemente H o C;

10 14) ESGLN(S,G) (SEC ID NO: 31), donde la primera G se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente R, S o A; y

15) VLLPLNEPV (SEC ID NO: 50), donde la segunda L se sustituye por cualquier otro aminoácido, tal como M, F o V.

15 Los polipéptidos de HPPD mutantes ejemplares según la divulgación corresponden a las secuencia de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs: 14-26 y variantes y fragmentos de las mismas. Además, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican los polipéptidos de HPPD mutantes, *por ejemplo*, SEC ID NOs: 1-13. Las composiciones también incluyen casetes de expresión que comprenden un promotor enlazado de forma operable a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de HPPD mutante de la invención, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. También se proporcionan plantas, células vegetales y semillas transformadas que comprenden un casete de expresión de la invención.

20 Las composiciones de la invención son útiles en métodos dirigidos a conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas, particularmente resistencia o tolerancia a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. En realizaciones particulares, los métodos comprenden introducir en una planta al menos un casete de expresión que comprende un promotor enlazado de forma operable a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de HPPD mutante de la invención. Como resultado, el polipéptido de HPPD mutante se expresa en la planta, y la HPPD mutante es menos sensible a herbicidas que inhiben HPPD, lo que conduce a una resistencia o tolerancia a herbicidas que inhiben HPPD.

25 En otros aspectos, también se proporcionan métodos para el ensayo, caracterización, identificación y selección de las HPPD mutantes de la actual invención.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los valores de K_m y V_{max} del polipéptido de HPPD derivado de *Avena* correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 14.

35 Las Figuras 2A-2B muestran las determinaciones de la velocidad de asociación (Fig. 2A) y la velocidad de disociación (Fig. 2B) para un complejo de estructura B con el polipéptido de HPPD que corresponde a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 14.

La Figura 3 muestra una determinación de la velocidad de disociación para un complejo de estructura D con el polipéptido de HPPD correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 14.

40 Las Figuras 4A-4C muestran las determinaciones de la velocidad de disociación a temperaturas del hielo para los complejos de estructura B con los polipéptidos de HPPD que corresponden a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 14 (Fig. 4A), 24 (Fig. 4B) y 26 (Fig. 4C).

45 La Figura 5 muestra la inhibición por mesotrión de la formación de piomelanina por parte de *E. coli* BL21 que expresa diferentes variantes de HPPD. Barra de la izquierda = (intervalo de error para n=3) A 430 nm promedio sin mesotrión presente en el medio y la barra de la derecha = (n=3) A 430 nm promedio con 12.5 ppm presentes en el medio. El control es el vector pET24 vacío donde no se expresa HPPD.

La Figura 6 muestra una representación del vector binario 17146 para la transformación de haba de soja, que confiere resistencia a HPPD con un gen de HPPD de avena optimizado con un codón de haba de soja que codifica SEC ID NO: 24. Este vector binario también contiene marcadores seleccionables PAT dobles para la selección de glufosinato.

50 La Figura 7 muestra una representación del vector binario 17147 para la transformación de haba de soja que confiere resistencia a HPPD con un gen de HPPD de avena optimizado con un codón de haba de soja que codifica SEC ID NO: 24, y que también confiere tolerancia a glifosato (marcador seleccionable).

La Figura 8 muestra una representación del vector binario 15764 que contiene un gen de HPPD de avena optimizado en los codones para haba de soja (que codifica SEC ID NO: 14) impulsado por el potenciador TMV omega y una caja TATA.

5 La Figura 9 muestra una representación del vector binario 17149 para la transformación de habas de soja que confiere tolerancia a herbicidas de HPPD y a glufosinato, que contiene un casete de expresión que expresa una variante de HPPD (SEC ID NO: 26) junto con dos casetes del gen PAT.

Las Figuras 10A-10D representan la dependencia respecto al tiempo de la inhibición de un mutante de HPPD (G408A) por parte de los compuestos herbicidas B (Figs. 10A-10B) y C (Figs. 10C-10D).

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona composiciones y métodos dirigidos a conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD). Las composiciones incluyen secuencia de aminoácidos para polipéptidos de HPPD mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD, y sus variantes y fragmentos. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de HPPD mutantes de la invención. Se proporcionan además métodos para conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas,
15 particularmente resistencia o tolerancia a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. También se divulgan métodos para controlar de forma selectiva malas hierbas en un campo en un lugar de cosecha, y para el ensayo, caracterización, identificación y selección de las HPPD mutantes de la actual invención que proporcionan tolerancia a herbicidas.

20 En el contexto de la presente invención, las expresiones hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (HPPD), 4-hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (4-HPPD) y p-hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (p-HPPD) son sinónimas.

“Herbicidas de HPPD” son herbicidas que son blanqueadores, y cuyo sitio principal de acción es HPPD. Muchos son bien conocidos y se describen aquí en otra parte y en la bibliografía (Hawkes “Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD) – The Herbicide Target”. En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220; Edmunds “Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)
25 Inhibitors : Triketones”. En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 221-242). Como se usa aquí, la expresión “herbicidas de HPPD” se refiere a herbicidas que actúan directa o indirectamente para inhibir HPPD, en la que los herbicidas son blanqueadores, y en la que la inhibición de HPPD es al menos parte del modo de acción del herbicida sobre las plantas.

30 Como se usa aquí, las plantas que son sustancialmente “tolerantes” a un herbicida presentan, cuando se tratan con dicho herbicida, una curva de dosis/respuesta que está desplazada a la derecha cuando se compara con la mostrada por plantas similares no tolerantes sometidas de forma similar. Tales curvas de dosis/respuesta tienen en el eje x representada gráficamente la “dosis”, y en el eje y tienen representado gráficamente el “porcentaje de exterminio o daño”, “efecto herbicida”, etc. Las plantas tolerantes necesitarán típicamente al menos dos veces tanto herbicida como las plantas similares no tolerantes, a fin de producir un efecto herbicida dado. Las plantas que son
35 sustancialmente “resistentes” al herbicida presentan pocas lesiones, si las presentan, necróticas, líticas, cloróticas u otras lesiones, o, al menos, ninguna que impacte significativamente sobre el rendimiento, cuando se someten al herbicida a concentraciones y tasas que se emplean típicamente por la comunidad agrícola para exterminar malas hierbas en el campo.

40 Como se usa aquí, “plantas similares no transgénicas” son plantas que son similares o iguales a las plantas transgénicas, pero que no contienen un transgén que confiera resistencia a herbicidas.

Como se usa aquí, el término “conferir” se refiere a proporcionar una característica o rasgo, tal como tolerancia o resistencia a herbicidas, y/u otros rasgos deseables, a una planta.

45 Como se describe aquí en otra parte, el término “heterólogo” significa procedente de otra fuente. En el contexto de ADN, “heterólogo” se refiere a cualquier ADN “no propio” extraño, incluyendo aquél procedente de otra planta de la misma especie. Por ejemplo, en la presente solicitud, un gen de HPPD de haba de soja que se expresó de forma transgénica nuevamente en una planta de haba de soja todavía se describiría como ADN “heterólogo”.

50 El artículo “un” y “una” se usan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir, hasta al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos. A lo largo de la memoria descriptiva, la palabra “que comprende”, o variaciones tales como “comprende” o “comprender”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas señalados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Una variedad de términos adicionales se definen o se caracterizan de otro modo aquí.

Secuencias de HPPD

Las composiciones de la invención incluyen polinucleótidos y polipéptidos de HPPD mutantes, aislados o sustancialmente purificados, así como células hospedantes que comprenden los polinucleótidos de HPPD mutantes. Específicamente, la presente invención proporciona polipéptidos de HPPD mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD, y que confieren resistencia o tolerancia en plantas a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD, y sus variantes y fragmentos. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de HPPD mutantes de la invención.

Los polipéptidos de HPPD mutantes de la presente invención tienen cambios de aminoácidos en una o más posiciones con relación a la secuencia de tipo salvaje de partida de la que derivan, y presentan tolerancia mejorada a uno o más herbicidas inhibidores de HPPD. Las enzimas HPPD que presentan tolerancia mejorada a un herbicida de HPPD lo pueden hacer en virtud de presentar, con relación a la enzima de partida no mutada similar:

a) un valor de K_m más bajo para el sustrato natural, 4-hidroxifenilpiruvato;

b) un valor de k_{cat} más elevado para convertir 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato;

c) un menor valor de la constante de velocidad, k_{on} , que gobierna la formación de un complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD;

d) un valor incrementado de la constante de velocidad, k_{off} , que gobierna la disociación de un complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD; y/o

e) como resultado de cambios en uno o ambos de c) y d), un valor incrementado de la constante de equilibrio K_i (también denominada K_d), que gobierna la disociación del complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD. Las secuencias de ADN que codifican tales HPPD mutadas mejoradas se usan en la provisión de plantas, cosechas, células vegetales y semillas de HPPD de la actual invención que ofrecen tolerancia o resistencia mejorada a uno o más herbicidas de HPPD en comparación con plantas similares que expresan igualmente la enzima de partida no mutada.

Los incrementos en el valor de k_{off} son de valor particular a la hora de mejorar la capacidad de HPPD para conferir resistencia a un herbicida de HPPD. Como un ejemplo, los compuestos B y C presentan valores de K_d similares con respecto a la variante de HPPD de SEC ID NO: 14, pero difieren en que el valor de k_{off} para el compuesto B es alrededor de 10 veces mayor en comparación con el valor de k_{off} para el compuesto C y las plantas que expresan SEC ID NO: 14 presentan una resistencia superior al compuesto B que al compuesto C.

Se seleccionan mutaciones dirigidas al sitio de genes que codifican las HPPD derivadas de plantas para codificar cambios de aminoácidos seleccionados de la siguiente lista, ya sea individualmente o en combinación. Los genes que codifican tales formas mutantes de las HPPD de plantas son útiles para obtener plantas de cosechas resistentes a herbicidas que inhiben HPPD. Los genes de HPPD de plantas así modificados son especialmente adecuados para uso en plantas transgénicas a fin de conferir tolerancia o resistencia a herbicidas en las plantas de las cosechas.

En la técnica se conocen muchas secuencias de HPPD, y se pueden usar para generar secuencias mutantes de HPPD haciendo las correspondientes sustituciones, supresiones y adiciones de aminoácidos descritas aquí. La secuencia de aminoácidos de *Avena sativa* se expone en SEC ID NO: 27. Una variante con una única supresión de la HPPD de *Avena sativa* se expone en SEC. ID NO: 14. Por lo tanto, una secuencia conocida o sospechosa de HPPD se puede alinear con, por ejemplo, SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 27, usando herramientas de alineamiento de secuencias estándar y se pueden realizar las correspondientes sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos descritas aquí con respecto a SEC ID NO: 14 o a SEC ID NO: 27 en la secuencia de referencia.

En una realización, las composiciones de la invención comprenden un polipéptido de HPPD mutante que tiene una identidad secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con SEC ID NO: 27 (la secuencia de aminoácidos de HPPD de *Avena sativa*) o donde la secuencia de aminoácidos de HPPD deriva de una planta, donde el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD y donde el polipéptido contiene una o más adiciones, sustituciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos enumeradas en la columna 1 de la Tabla 1, combinadas además opcionalmente con mutaciones conocidas (véase, *por ejemplo*, WO2009/144079). En varias realizaciones, un aminoácido en una o más posiciones enumeradas en la columna 1 de la Tabla 1 se sustituye por cualquier otro aminoácido. En otra realización, el polipéptido comprende una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que corresponden a las sustituciones o adiciones de aminoácidos enumeradas en la columna 2 de la Tabla 1. En otra realización más, el polipéptido comprende una o más sustituciones que corresponden a una variante conservativa de los aminoácidos enumerados en la columna 2 de la Tabla 1. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 217 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 218 de SEC ID NO: 27), donde ese aminoácido se sustituye por alanina o una sustitución conservativa de la alanina; o el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 241 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 242 de SEC ID NO: 27), donde ese aminoácido se sustituye por triptófano o una sustitución conservativa del triptófano; o el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde al aminoácido de la posición 408 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 409 de SEC ID NO: 27), donde ese aminoácido se sustituye por alanina o una sustitución conservativa de la alanina. En aspectos particulares, la secuencia de

ES 2 619 279 T3

aminoácidos del polipéptido de HPPD mutante se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

Tabla 1. Mutaciones ejemplares de HPPD

Posición de aminoácido mutable con relación a SEC ID NO: 14	Sustitución, adición o supresión*
172	D, V, E, K o A
217	I, A, M o C
219	H o C
220	C
224	L
240	M, I o L
241	S, W, G, M, F, Y o H
244	V
253	T
254	R, S o A
255	M, H, G, F, C o I
256	R o M
257	G
258	M, I, A o K
259	I
268	V o K
269	M, F o V
271	I, M o V
272	A
280	G o K
281	Suprimir R
281-282	Insertar K, A o R entre R282 y S283
284	V, S, A, P, T, L o G
286	E
287	F
294	A o S
296	L
297	N, R, G, A, H, S, T, E o C
299	L o M
299	M, L o V
325	Q o L
326	K, S, P, D, R, N, Y o H
328	A o R
328	Eliminar P
333	K, R, D, Q o E
336	Eliminar E
339	R o L

Posición de aminoácido mutable con relación a SEC ID NO: 14	Sustitución, adición o supresión*
339	Eliminar I
357	I
358	L
358	M o A
361	K
367	M
370	V o L
371	L
372	S, P, D, R, N, Y o H
374	N
382	L
386	V o C
408	A, S o T
410	T, S, L, A, I, V, Q, H, E, G, M, C, V o T
411	I
413	I
414	G
415	A, N, G, K o Q
416	S, A o Q
420	A

*A menos que se indique de otra manera, los aminoácidos enumerados en esta columna representan las sustituciones posibles en la posición indicada.

5 En otra realización, las composiciones de la invención comprenden un polipéptido de HPPD mutante que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con SEC ID NO: 27 (la secuencia de aminoácidos de HPPD de *Avena sativa*) o en el que la secuencia de aminoácidos de HPPD deriva de una planta, donde el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD y donde el polipéptido contiene una o más sustituciones en la secuencia de aminoácidos que corresponden a las posiciones de los aminoácidos enumeradas en la columna 1 de la Tabla 2, opcionalmente combinadas además con mutaciones conocidas (véase, *por ejemplo*, WO2009/144079). En diversas realizaciones, un aminoácido en una o más posiciones enumeradas en la columna 1 de la Tabla 2 se sustituye por cualquier otro aminoácido. En otra realización, el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos que corresponden a las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la columna 2 de la Tabla 2. En otra realización más, el polipéptido comprende una o más sustituciones que corresponden a una variante conservativa de los aminoácidos enumerados en la columna 2 de la Tabla 2. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 217 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 218 de SEC ID NO: 27), en la que el aminoácido se sustituye por alanina o una sustitución conservativa de la alanina; o el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 241 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 242 de SEC ID NO: 27), en la que el aminoácido se sustituye por triptófano o una sustitución conservativa del triptófano; o el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 408 de SEC ID NO: 14 (posición del aminoácido 409 de SEC ID NO: 27), en la que el aminoácido se sustituye por alanina o una sustitución conservativa de alanina. En aspectos particulares, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de HPPD mutante se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

Tabla 2. Mutaciones de HPPD ejemplares

Posición de aminoácido (con relación a SEC ID NO: 14)	Sustitución
217	I, A, M o C
241	S, W, G, M, F, Y o H

Posición de aminoácido (con relación a SEC ID NO: 14)	Sustitución
254	R, S o A
255	M, H, G, F, C o I
258	M, I, A o K
269	M, F o V
271	M, I o V
284	V, S, A, P, T, L o G
297	N, R, G, S, T, E, C, A o H
325	Q o L
326	K, S, P, D, R, N, Y o H
358	M o A
408	A, S o T
411	T, S, L, A, I, Q, H, E, G, M, C, V o T

Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína” se usan aquí de forma intercambiable para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los polipéptidos de la invención se pueden producir a partir de un ácido nucleico descrito aquí, o mediante el uso de técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, se puede producir una proteína truncada de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante de la invención en una célula hospedante apropiada, o, como alternativa, mediante una combinación de procedimientos *ex vivo*, tal como digestión con proteasas y purificación.

En consecuencia, la presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos de HPPD mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD, y que confieren resistencia o tolerancia en plantas a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD, y sus variantes y fragmentos. En general, la invención incluye cualquier secuencias polinucleotídica que codifique cualquiera de los polipéptidos de HPPD mutantes descritos aquí, así como cualquier secuencias polinucleotídica que codifique polipéptidos de HPPD que tienen una o más sustituciones conservativas de aminoácidos con relación a los polipéptidos de HPPD mutantes descritos aquí. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los cinco grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: Alifático: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); Aromático: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C); Básico: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácido: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q).

En una realización, la presente invención proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con SEC ID NO: 27 o en la que la secuencia de aminoácidos de HPPD deriva de una planta, en la que el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD, y en la que el polipéptido contiene una o más sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos tal como se describe en la presente. En aspectos particulares, la secuencia polinucleotídica codifica un polipéptido de HPPD mutante que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Como se usa aquí, “ácido nucleico” incluye la referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma mono- o bicatenaria, y, excepto que se limite de otro modo, engloba análogos conocidos (*por ejemplo*, ácidos nucleicos peptídicos) que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales por cuanto se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios de manera similar a oligonucleótidos de origen natural.

Como se usan aquí, los términos “que codifica” o “codificado”, cuando se usan en el contexto de un ácido nucleico específico, significa que el ácido nucleico comprende la información necesaria para dirigir la traducción de la secuencia nucleotídica en una proteína específica. La información mediante la cual una proteína es codificada se especifica mediante el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (*por ejemplo*, intrones) con regiones traducidas del ácido nucleico, o puede carecer de tales secuencias no traducidas que intervienen (*por ejemplo*, como en ADNc).

La invención engloba composiciones de polinucleótidos o de proteínas aislados o sustancialmente purificados. Un polinucleótido o proteína "aislado" o "purificado", o una porción biológicamente activa de los mismos, está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su entorno de origen natural. De este modo, un polinucleótido o proteína aislado o purificado está esencialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. De forma óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (óptimamente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural el polinucleótido (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del que deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el polinucleótido aislado puede contener menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencia nucleotídica que flanquea de forma natural el polinucleótido en ADN genómico de la célula de la que deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de actividades enzimáticas que interfieren, y que es capaz de ser caracterizada con respecto a sus propiedades catalíticas, cinéticas y moleculares, incluye preparaciones bastante brutas de proteína (por ejemplo producidas recombinantemente en extractos celulares) que tienen menos de alrededor de un 98%, 95%, 90%, 80%, 70 %, 60% o 50% (en peso seco) de proteína contaminante, así como preparaciones purificadas adicionalmente por métodos conocidos en la técnica para que tengan 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% (en peso seco) de proteína contaminante.

Las proteínas de la invención se pueden alterar de diversas maneras, incluyendo sustituciones, supresiones, truncamiento, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes y fragmentos de secuencias de aminoácidos de las proteínas de HPPD de mutantes mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones polinucleotídicas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; patente U.S. nº 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York), y las referencias citadas allí. En el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) se puede encontrar una guía en cuanto a sustituciones apropiadas de aminoácidos que a menudo no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés. Pueden ser óptimas las sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

Los polinucleótidos de la invención también se pueden usar para aislar secuencias correspondientes procedentes de otros organismos, particularmente otras plantas. De esta manera, se pueden usar métodos tales como PCR, hibridación, y similares, para identificar tales secuencias basándose en su homología de secuencia con las secuencias expuestas aquí.

En un enfoque de PCR, se pueden diseñar cebadores oligonucleotídicos para uso en reacciones de PCR para amplificar las secuencias de ADN correspondientes a partir de ADNc o ADN genómico extraído de cualquier planta de interés. Los métodos para diseñar cebadores de PCR y clonar mediante PCR son generalmente conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véanse también Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York).

En técnicas de hibridación todo o parte de un polinucleótido conocido se usa como una sonda que se hibrida de forma selectiva a otros polinucleótidos correspondientes presentes en una población de fragmentos de ADN genómico o fragmentos de ADNc clonados (es decir, librerías genómicas o de ADNc) procedentes de un organismo escogido. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y se pueden marcar con un grupo detectable, tal como ³²P, o cualquier otro marcador detectable. Los métodos para la preparación de sondas para hibridación y para construcción de librerías de ADNc y genómicas son generalmente conocidos en la técnica, y se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Por "que se hibrida a" o "que se hibrida específicamente a" se refiere a la unión, formación de dúplex, o hibridación de una molécula sólo a una secuencia nucleotídica particular en condiciones restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total). "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana, y abarca desemparejamientos menores que se pueden arreglar reduciendo la restricción del medio de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

"Condiciones restrictivas de hibridación" y "condiciones de de hibridación y lavado restrictivas", en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridaciones Southern y Northern, dependen de las secuencias, y son diferentes bajo parámetros medioambientales diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. En Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York, se encuentra una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las condiciones de hibridación y de lavado muy restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de un 5°C menores que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza

iónica y pH definidos. Típicamente, en “condiciones restrictivas” una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, pero no a otras secuencias.

La T_m es la temperatura (en fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy restrictivas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, llevándose a cabo la hibridación toda la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es 0,1 NaCl 5M a 72°C durante alrededor de un 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con 0,2X SSC a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *más abajo*, para una descripción del tampón de SSC). A menudo, un lavado muy restrictivo va precedido por un lavado menos restrictivo, para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de restricción media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1X SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja restricción para un dúplex de, *por ejemplo*, más de 100 nucleótidos, es 4-6X SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, alrededor de un 10 a 50 nucleótidos), las condiciones restrictivas implican típicamente concentraciones de sal menores que alrededor de un 1,0 M de ion Na, típicamente alrededor de un 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente al menos alrededor de un 30°C. Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizadores, tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2X (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada, en el ensayo de hibridación particular, indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones restrictivas todavía son sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto se produce, *por ejemplo*, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración máxima del codón permitida por el código genético.

Lo siguiente son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que se pueden usar para clonar secuencias nucleotídicas que son homólogos de secuencias nucleotídicas de referencia de la presente invención: una secuencia nucleotídica de referencia se hibrida preferiblemente a la secuencia nucleotídica de referencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 2X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, de forma más deseable en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, todavía de forma más deseable en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,5X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, preferiblemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más preferiblemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 65°C.

También se divulgan fragmentos y variantes de las secuencias nucleotídicas descritas y proteínas codificadas consiguientemente. “Fragmento” quiere decir una porción de la secuencia nucleotídica o una porción de la secuencia de aminoácidos, y por tanto proteína codificada consiguientemente. Los fragmentos de una secuencia nucleotídica pueden codificar fragmentos proteicos que retienen la actividad biológica de la proteína de HPPD mutante, y por tanto tienen actividad enzimática de HPPD. Como alternativa, los fragmentos de una secuencia nucleotídica que son útiles como sondas de hibridación o en reacciones de mutagénesis y barajado, para generar todavía más variantes de HPPD, generalmente no codifican proteínas de fragmentos que retienen actividad biológica. De este modo, los fragmentos de una secuencia nucleotídica pueden oscilar desde alrededor de un 20 nucleótidos, alrededor de un 50 nucleótidos, alrededor de un 100 nucleótidos, y hasta la secuencia nucleotídica de longitud completa que codifica los polipéptidos de la invención.

Un fragmento de una secuencia nucleotídica que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de HPPD mutante codificará al menos 15, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 180, 200, 250, 300, o 350 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en un polipéptido de HPPD mutante de longitud completa. Los fragmentos en una secuencia nucleotídica que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR generalmente no necesitan codificar una porción biológicamente activa de una proteína de HPPD.

Como se usa aquí, “secuencia de longitud completa”, en referencia a un polinucleótido específico, significa que tiene toda la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de HPPD nativa o mutada. “Secuencia nativa” quiere decir una secuencia endógena, *es decir*, una secuencia no manipulada mediante ingeniería, encontrada en un genoma del organismo.

De este modo, un fragmento de una secuencia nucleotídica de la invención puede codificar una porción biológicamente activa de un polipéptido de HPPD mutante, o puede ser un fragmento que se puede usar como una sonda de hibridación, etc., o cebador de PCR, usando métodos descritos más abajo. Una porción biológicamente activa de un polipéptido de HPPD mutante se puede preparar aislando una porción de una de las secuencias nucleotídicas de la invención, expresando la porción codificada de la proteína de HPPD mutante (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*), y evaluando la actividad de la porción codificada de la proteína de HPPD mutante. Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia nucleotídica de la invención comprenden al menos 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, ó 1300

nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia nucleotídica de longitud completa descrita aquí.

“Variantes” quiere decir secuencias sustancialmente similares. Para polinucleótidos, una variante comprende una supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos con referencia al polinucleótido, y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido de HPPD mutante. Como se usa aquí, un polinucleótido o polipéptido “de referencia” comprende una secuencia nucleotídica o secuencia de aminoácidos de HPPD mutante, respectivamente. Como se usa aquí, un polinucleótido o polipéptido “nativo” comprende una secuencia nucleotídica o secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. La persona experta en la técnica reconocerá que se pueden construir variantes de los ácidos nucleicos de la invención de manera que se mantenga el marco de lectura abierto. Para polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de HPPD mutantes de la invención. Las variantes alélicas de origen natural, tales como estas, se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se explica más abajo. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótido derivado sintéticamente, tales como aquellos generados, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio, pero que todavía codifican una proteína de HPPD mutante de la invención. Generalmente, las variantes de un polinucleótido particular de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con aquel polinucleótido particular según se determina mediante programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos aquí en otra parte.

Las variantes de un polinucleótido particular de la invención (es decir, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar comparando el porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. De este modo, por ejemplo, se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido con un porcentaje de identidad de secuencia dado con los polipéptidos SEC ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o 26. El porcentaje de identidad de secuencia entre cualesquiera dos polipéptidos se puede calcular usando programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos aquí en otra parte. Cuando cualquier par dado de polinucleótidos de la invención se evalúa mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia compartido por los dos polipéptidos que ellos codifican, el porcentaje de identidad de secuencia entre los dos polipéptidos codificados es al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a lo largo de la totalidad de las secuencias de HPPD descritas aquí es decir, cuando se comparan con las secuencias de HPPD de longitud completa descritas aquí.

Proteína “variante” quiere decir una proteína derivada de una proteína de referencia mediante supresión o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína de HPPD mutante, y/o mediante sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína de HPPD mutante. Las proteínas variantes son biológicamente activas, esto es, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína de HPPD mutante, esto es, actividad enzimática de HPPD y/o tolerancia a herbicidas como se describe aquí. Tales variantes pueden resultar de, por ejemplo, polimorfismo genético, o de manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una proteína de HPPD mutante de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos alrededor de un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más a lo largo de la totalidad de la secuencia de aminoácidos para la proteína de HPPD mutante, según se determina mediante programas de alineamiento de secuencias, y parámetros descritos aquí en otra parte. Una variante biológicamente activa de una proteína de la invención puede diferir de esa proteína en tan pocos como 1-15 restos de aminoácidos, tan pocos como 1-10, tales 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso un resto de aminoácido.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica, y se pueden lograr usando algoritmos matemáticos tales como el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; el algoritmo de alineamiento local de Smith *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; y el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia, se pueden utilizar implementaciones computerizadas de estos algoritmos matemáticos. Tales implementaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible de Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA).

Apilamiento de genes

En ciertos aspectos, los polinucleótidos de la divulgación que codifican polipéptidos de HPPD mutantes, o sus variantes, que retienen actividad enzimática de HPPD (*por ejemplo*, una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26) se pueden apilar con cualquier combinación de secuencias polinucleotídicas de interés, a fin de crear plantas con un rasgo deseado. Un rasgo, como se usa aquí, se refiere al fenotipo derivado de una secuencia particular o grupos de secuencias. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de HPPD mutante o una variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD, se pueden apilar con cualesquiera otros

polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren un rasgo deseable, incluyendo, pero sin limitarse a, resistencia a enfermedades, insectos, y herbicidas, tolerancia al calor y a la sequía, tiempo reducido para la madurez de la cosecha, procesamiento industrial mejorado, tal como para la conversión de almidón o biomasa en azúcares fermentables, y calidad agronómica mejorada, tal como contenido elevado de aceite y contenido proteico elevado.

5 Los polinucleótidos ejemplares que se pueden apilar con polinucleótidos de la invención que codifican un polipéptido de HPPD mutante, o una variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren resistencia a plagas/patógenos, tales como virus, nemátodos, insectos u hongos, y similares. Los polinucleótidos ejemplares que se pueden apilar con polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos que codifican: polipéptidos que tienen actividad plaguicida y/o insecticida, tales como otras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descritas en las patentes U.S. n^{os} 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; y Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109), lectinas (Van Damme *et al.* (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825, pentina (descrita en la patente U.S. n^o 5.981.722), y similares; rasgos deseables para resistencia a enfermedades o a herbicidas (*por ejemplo*, genes de detoxificación de fumonixina (patente U.S. n^o 5.792.931); genes de avirulencia y de resistencia a enfermedades (Jones *et al.* (1994) *Science* 266:789; Martin *et al.* (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos *et al.* (1994) *Cell* 78:1089); mutantes de acetolactato sintasa (ALS), que conducen a resistencia a herbicidas, tales como las mutaciones S4 y/o Hra; resistencia a glifosato (*por ejemplo*, gen de 5-enol-pirovil-chiquimato-3-fosfato-sintasa (EPSPS), descrito en las in Patentes U.S. n^{os} 4.940.935 y 5.188.642; o el gen de glifosato N-acetiltransferasa (GAT), descrito en Castle *et al.* (2004) *Science*, 304:1151-1154; y en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes U.S. n^{os} 20070004912, 20050246798, y20050060767)); resistencia a glufosinato (*por ejemplo*, genes de fosfinotricin acetil transferasa PAT y BAR, descritos en las Patentes U.S. n^{os} 5.561.236 y 5.276.268); resistencia a herbicidas que incluyen los herbicidas sulfonilurea, DHT (2,4D) y PPO (*por ejemplo*, glifosato acetiltransferasa, ariloxialcanoato dioxigenasa, acetolactato sintasa y protoporfirinógeno oxidasa); un citocromo P450 o una variante del mismo, que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas, *entre otros*, a herbicidas de HPPD (Solicitud de Patente U.S. n^o de serie 12/156.247; Patentes U.S. n^{os} 6.380.465; 6.121.512; 5.349.127; 6.649.814; y 6.300.544; y Publicación Solicitud de Patente PCT n^o WO 2007000077); y rasgos deseables para el procesamiento o procesar productos tales como aceite elevado (*por ejemplo*, patente U.S. n^o 6.232.529); aceites modificados (*por ejemplo*, genes de ácido graso desaturasa (patente U.S. n^o 5.952.544; WO 94/11516)); almidones modificados (*por ejemplo*, ADPG pirofosforilasas (AGPasa), almidón sintasas (SS), enzimas de ramificación de almidones (SBE), y enzimas de desramificación de almidones (SDBE)); y polímeros o bioplásticos (*por ejemplo*, patente U.S. n^o 5.602.321; beta-cetotiolasa, polihidroxibutirato sintasa, y acetoacetil-CoA reductasa (Schubert *et al.* (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) que facilita la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA)).

De este modo, en un aspecto, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de HPPD mutante, o variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD, se apilan con uno o más polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren resistencia o tolerancia a un herbicida. En un aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a un inhibidor de HPPD. En otro aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a glifosato. En otro aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a glufosinato.

Estas combinaciones apiladas se pueden crear por cualquier método, incluyendo, pero sin limitarse a, reproducción cruzada de plantas mediante cualquier metodología convencional o TopCross, o transformación genética. Si las secuencias se apilan transformando genéticamente las plantas, las secuencias polinucleotídicas de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados se puede usar como la diana para introducir rasgos adicionales mediante transformación subsiguiente. Los rasgos se pueden introducir simultáneamente en un protocolo de cotransformación con los polinucleótidos de interés proporcionados por cualquier combinación de casetes de transformación. Por ejemplo, si se introdujeran dos secuencias, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación (trans) separados, o pueden estar contenidas en el mismo casete de transformación (cis). La expresión de las secuencias se puede llevar a cabo por el mismo promotor, o por promotores diferentes. En ciertos casos, puede ser deseable introducir un casete de transformación que suprimirá la expresión del polipéptido de interés. Este se puede combinar con cualquier combinación de otros casetes de supresión o casetes de sobreexpresión, para generar la combinación deseada de rasgos en la planta. Se reconoce además que se pueden apilar secuencias polinucleotídicas en una localización genómica deseada usando un sistema de recombinación específica del sitio. Véanse, por ejemplo, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, y WO99/25853.

Casetes de expresión vegetales

Las composiciones de la invención pueden contener adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos para la transformación y expresión en una planta de interés. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden estar presentes en constructos de ADN o casetes de expresión. "Casete de expresión", como se usa aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedante apropiada, que comprende un promotor enlazado operablemente a la secuencia nucleotídica de interés (*es decir*, un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables) que está operablemente enlazada a señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. La región codificante codifica habitualmente una proteína de interés, pero también codifica un ARN funcional de interés, por

ejemplo ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección del sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, queriendo decir que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión puede ser también uno que sea de origen natural, pero se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedante, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no se encuentra de forma natural en la célula hospedante, y se debe de haber introducido en la célula hospedante o en un ancestro de la célula hospedante mediante un suceso de transformación. La expresión de la secuencia nucleotídica en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, o de un promotor inducible, que inicia la transcripción sólo cuando la célula hospedante se expone a cierto estímulo externo particular. Adicionalmente, el promotor puede ser también específico de un tejido u órgano o etapa de desarrollo particular.

La presente invención engloba la transformación de plantas con casetes de expresión capaces de expresar un polinucleótido de interés, *es decir*, un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional y traduccional (*es decir*, un promotor) y un marco de lectura abierto polinucleotídico. El casete de expresión puede comprender opcionalmente una región de terminación transcripcional y traduccional (*es decir*, región de terminación) funcional en plantas. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende un gen marcador seleccionable, para permitir la selección de transformantes estables. Los constructos de expresión de la invención pueden comprender también una secuencia líder, y/o una secuencia que permite la expresión inducible del polinucleótido de interés. Véase Guo *et al.* (2003) *Plant J.* 34:383-92 y Chen *et al.* (2003) *Plant J.* 36:731-40, para ejemplos de secuencias que permiten la expresión inducible.

Las secuencias reguladoras del constructo de expresión están enlazadas operablemente al polinucleótido de interés. Por "enlazadas operablemente" se quiere decir un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la segunda secuencia inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que corresponde a la segunda secuencia. Generalmente, operablemente enlazadas significa que las secuencias nucleotídicas que se enlazan son contiguas.

En la práctica de la invención se puede usar cualquier promotor capaz de dirigir la expresión en la planta de interés. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo al hospedante vegetal. Los términos "heterólogo" y "exógeno", cuando se usan aquí, se refieren a una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo* una secuencia de ADN o ARN) o un gen, se refieren a una secuencia que se origina de una fuente extraña a la célula hospedante particular, o, si procede de la misma fuente, está modificada de su forma original. De este modo, un gen heterólogo en una célula hospedante incluye un gen que es endógeno a la célula hospedante particular, pero que se ha modificado, por ejemplo, mediante el uso de barajado de ADN. Los términos también incluyen múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. De este modo, los términos se refieren a un fragmento de ADN que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedante en la que el elemento no se encuentra normalmente. Los segmentos de ADN exógenos se expresan para producir polipéptidos exógenos.

Una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN) "homóloga" es una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN o ARN) asociada de forma natural con una célula hospedante en la que se introduce.

La elección de los promotores a incluir depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, eficiencia, selectibilidad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial por células o tejidos. Es una materia normal para un experto en la técnica modular la expresión de una secuencia seleccionando y colocando apropiadamente promotores y otras regiones reguladoras con relación a esa secuencia. Los promotores que se usan para la expresión del transgén o transgenes pueden ser un promotor vegetal fuerte, un promotor vírico, o promotores quiméricos compuestos de elementos tales como: la caja TATA de cualquier gen (o cajas TATA sintéticas, basadas en el análisis del gen de la planta), opcionalmente fusionado a la región 5' a la caja TATA de promotores vegetales (que dirigen la expresión génica en tejidos y temporalmente apropiada), opcionalmente fusionado a uno o más potenciadores (tales como el potenciador 35S, el potenciador FMV, el potenciador CMP, el potenciador de la SUBUNIDAD PEQUEÑA DE RUBISCO, el potenciador de PLASTOCYANINA).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, por ejemplo, el promotor central del promotor Rsyn7, y otros promotores constitutivos descritos en el documento WO 99/43838 y en la patente U.S. nº 6.072.050; el promotor CaMV 35S central (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632; y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); el promotor de ALS (patente U.S. nº 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las Patentes U.S. nºs 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

Los promotores vegetales o quiméricos apropiados son útiles para aplicaciones tales como la expresión de transgenes en ciertos tejidos, mientras que minimizan la expresión en otros tejidos, tales como semillas, o tejidos reproductivos. Los promotores de tipo celular o preferencialmente tisulares ejemplares conducen la expresión preferentemente en el tejido diana, pero también pueden igualmente conducir a cierta expresión en otros tipos celulares o tejidos. Los métodos para identificar y caracterizar regiones promotoras en ADN genómico vegetal incluyen, por ejemplo, los descritos en las siguientes referencias: Jordano, *et al.*, *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos, *et al.*, *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green, *et al.*, *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, *et al.*, *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); y Zhang, *et al.*, *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996).

En otras realizaciones de la presente invención, se pueden desear promotores inducibles. Los promotores inducibles llevan a cabo la transcripción en respuesta a estímulos externos, tales como agentes químicos, o estímulos medioambientales. Por ejemplo, los promotores inducibles pueden conferir transcripción en respuesta a hormonas tales como ácido giberélico o etileno, o en respuesta a la luz o a la sequía.

Existe una variedad de terminadores transcripcionales para uso en casetes de expresión. Son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén, y la poliadenilación de ARNm correcta. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés operablemente enlazada, puede ser nativa con el hospedante vegetal, o puede derivar de otra fuente (es decir extraña o heteróloga al promotor, a la secuencia de ADN de interés, al hospedante vegetal, o a cualquier combinación de los mismos). Los terminadores transcripcionales apropiados son aquellos que se sabe que funcionan en plantas, e incluyen el terminador CAMV 35S, el terminador tml, el terminador de nopalina sintasa, y el terminador rbcS E9 del guisante. Estos se pueden usar tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Además, se puede usar un terminador de la transcripción nativo del gen.

Generalmente, el casete de expresión comprenderá un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados.

Se han encontrado numerosas secuencias para potenciar la expresión génica a partir de la unidad transcripcional, y estas secuencias se pueden usar conjuntamente con los genes de esta invención para incrementar su expresión en plantas transgénicas.

Se ha demostrado que diversas secuencias intrónicas potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha encontrado que los intrones del gen *Adhl* del maíz potencian significativamente la expresión del gen de tipo salvaje bajo su promotor cognato cuando se introducen en células de maíz. Se encontró que el intrón 1 es particularmente efectivo y que potenció la expresión en constructos de fusión con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Callis *et al.* *Genes Develop.* 1:1183-1200 (1987)). En el mismo sistema experimental, el intrón del gen bronce 1 del maíz tiene un efecto similar potenciando la expresión. Las secuencias intrónicas se han incorporado de forma habitual en vectores de transformación de plantas, típicamente en el líder no traducido.

También se sabe que un número de secuencias líder no traducidas, derivadas de virus, potencian la expresión, y estas son particularmente efectivas en células dicotiledóneas. Específicamente, se ha demostrado que las secuencias líder del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV, la "secuencia W"), el Virus del Moteado Clorótico del Maíz (MCMV), y el Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), son efectivas potenciando la expresión (por ejemplo, Gallie *et al.* *Nucl. Acids Res.* 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski *et al.* *Plant Molec. Biol.* 15: 65-79 (1990)). Otras secuencias líder conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a: líderes de picomavirus, por ejemplo líder de EMCV (región no codificante de 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R., y Moss, B. *PNAS USA* 86:6126-6130 (1989)); los líderes de potivirus, por ejemplo el líder de TEV (Virus del Jaspeado del Tabaco) (Allison *et al.* 1986); el líder de MDMV (Virus del Mosaico del Enanismo Maíz); *Virology* 154:9-20); el líder de la proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak, D. G., y Samow, P., *Nature* 353: 90-94 (1991)); el líder no traducido procedente del ARNm de proteína de revestimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4) (Jobling, S. A., y Gehrke, L., *Nature* 325:622-625 (1987); el líder del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gallie, D. R. *et al.*, *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256 (1989); y el líder del Virus Moteado Clorótico del Maíz (MCMV) (Lommel, S. A. *et al.*, *Virology* 81:382-385 (1991). Véase también, Della-Cioppa *et al.*, *Plant Physiology* 84:965-968 (1987).

La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más de los casetes de expresión descritos anteriormente. El constructo puede ser un vector, tal como un vector de transformación vegetal. En una realización, el vector es un vector de transformación vegetal que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID NO: 34, 35, 36 o 37.

55 Plantas

Como se usa aquí, la expresión "parte vegetal" o "tejido vegetal" incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales se pueden generar plantas, callos vegetales, racimos vegetales, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen,

óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, fruta, pepitas, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras, y similares.

5 Las plantas útiles en la presente invención incluyen plantas que son transgénicas para al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. El tipo de planta seleccionada depende de una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, el uso aguas abajo del material vegetal cosechado, la susceptibilidad de la especie vegetal a la transformación, y las condiciones en las que se harán crecer, se cosecharán, y/o se procesarán las plantas. Un experto reconocerá además que factores adicionales para seleccionar variedades vegetales apropiadas para uso en la presente invención incluyen elevado potencial de rendimiento, buena fortaleza del tallo, resistencia a enfermedades específicas, tolerancia a la sequía, secado rápido, y suficiente calidad de grano para permitir el almacenamiento y el envío al mercado con pérdida mínima.

15 Las plantas según la presente invención incluyen cualquier planta que se cultive con el fin de producir material vegetal que es buscado por el hombre o animal para el consumo oral, o para la utilización en un proceso industrial, farmacéutico, o comercial. La invención se puede aplicar a cualquiera de una variedad de plantas, incluyendo, pero sin limitarse a, maíz, trigo, arroz, cebada, haba de soja, algodón, sorgo, habas en general, colza/cánola, alfalfa, lino, girasol, alazor, mijo, centeno, caña de azúcar, remolacha azucarera, cacao, té, Brassica, algodón, café, batata, lino, cacahuete, clavo; vegetales tales como lechuga, tomate, cucurbitáceas, casabe, patata, zanahoria, rábano, guisante, lentejas, repollo, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, pimientos, y piña; frutas de árboles tales como limón, manzanas, peras, melocotones, albaricoques, nueces, aguacate, plátano, y coco, y flores tales como orquídeas, claveles y rosas. Otras plantas útiles en la práctica de la invención incluyen pastos perennes, tales como pasto varilla, pastos de las praderas, pasto de la India, pasto de tallo azul gigante, y similares. Se reconoce que se pueden usar mezclas de plantas.

25 Además, el término "cosechas" se ha de entender también que incluye cosechas que se han hecho tolerantes a herbicidas o clases de herbicidas (tales como, por ejemplo, inhibidores de ALS, por ejemplo primisulfurón, prosulfurón y trifloxisulfurón, inhibidores de EPSPS (5-enol-pirovil-chiquimato-3-fosfato-sintasa), inhibidores de GS (glutamina sintetasa)) como resultado de métodos convencionales de reproducción o manipulación genética mediante ingeniería. Los ejemplos de cosechas que se han hecho tolerantes a herbicidas o clases de herbicidas mediante métodos de manipulación genética mediante ingeniería incluyen variedades de cosechas resistentes a glifosato y a glufosinato, comercialmente disponibles con los nombres comerciales ROUNDUPREADY® y LIBERTYLINK®. El método según la presente invención es especialmente adecuado para la protección de cosechas de haba de soja que también se han hecho tolerantes a glifosato y/o glufosinato, y en las que se usan herbicidas de HPPD en un programa de control de malas hierbas junto con otros de tales herbicidas (glufosinato y/o glifosato) para el control de malas hierbas.

35 Se contempla además que los constructos de la invención se pueden introducir en variedades vegetales que tienen propiedades mejoradas adecuadas u óptimas para un uso aguas abajo particular. Por ejemplo, la variabilidad genética de origen natural da como resultado plantas con resistencia o tolerancia a inhibidores de HPPD u otros herbicidas, y tales plantas son también útiles en los métodos de la invención. El método según la presente invención se puede optimizar además cruzando los transgenes que proporcionan un nivel de tolerancia con variedades de cultivo de haba de soja que muestran un nivel mejorado de tolerancia a inhibidores de HPPD que se encuentra en un pequeño porcentaje de líneas de haba de soja.

Transformación vegetal

45 Una vez que se ha clonado en un sistema de expresión un polinucleótido de HPPD mutante resistente o tolerante a herbicidas, solo o en combinación con una o más moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables, se transforma en una célula vegetal. Los casetes de expresión de receptor y diana de la invención se pueden introducir en la célula vegetal de muchas maneras reconocidas en la técnica. El término "introducir", en el contexto de un polinucleótido, por ejemplo un constructo nucleotídico de interés, quiere decir presentar a la planta el polinucleótido de manera que el polinucleótido gane acceso al interior de una célula de la planta. Cuando se va a introducir más de un polinucleótido, estos polinucleótidos se pueden ensamblar como parte de un único constructo nucleotídico, o como constructos nucleotídicos separados, y se pueden localizar en los mismos vectores de transformación o en diferentes vectores de transformación. En consecuencia, estos polinucleótidos se pueden introducir en la célula hospedante de interés en un suceso de transformación individual, en sucesos de transformación separados, o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de reproducción. Los métodos de la invención no dependen del método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, sólo que el polinucleótido o polinucleótidos ganen acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir polinucleótidos en plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de transformación transitoria, métodos de transformación estable, y métodos mediados por virus.

"Transformación transitoria", en el contexto de un polinucleótido, quiere decir que se introduce un polinucleótido en la planta y no se integra en el genoma de la planta.

Por "introducir de forma estable" o "introducido de forma estable", en el contexto de un polinucleótido introducido en una planta, se quiere decir que el polinucleótido introducido se incorpora de forma estable en el genoma de la planta, y de este modo la planta se transforma de forma estable con el polinucleótido.

5 "Transformación estable" o "transformado de forma estable" quiere decir que un polinucleótido, por ejemplo un constructo nucleotídico descrito aquí, introducido en una planta, se integra en el genoma de la planta y es capaz de ser heredado por la progenie de la misma, más particularmente por la progenie de múltiples generaciones sucesivas.

Aquellos de pericia normal en las técnicas de transformación vegetal conocen numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación vegetal, y se pueden usar los genes pertinentes a esta invención conjuntamente con cualquiera de tales vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación preferida y de la especie diana para la transformación. Para ciertas especies diana, se pueden preferir diferentes marcadores de selección de antibióticos o de herbicidas. Los marcadores de selección usados habitualmente en transformación incluyen el gen *nptII*, que confiere resistencia a canamicina y antibióticos relacionados (Messing y Vierra *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan *et al.*, *Nature* 304:184-187 (1983)), los genes *pat* y *bar*, que confieren resistencia al herbicida glufosinato (también denominado fosfinotricina; véanse White *et al.*, *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer *et al. Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990) y las patentes U.S. n^{os} 5.561.236 y 5.276.268), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger y Diggelmann, *Mol. Cell Biol.* 4: 2929-2931), y el gen de *dhfr*, que confiere resistencia a metatrexato (Bourouis *et al.*, *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), el gen de EPSPS, que confiere resistencia a glifosato (patentes U.S. n^{os} 4.940.935 y 5.188.642), el gen de glifosato N-acetiltransferasa (GAT), que también confiere resistencia a glifosato (Castle *et al.* (2004) *Science*, 304:1151-1154; Pub. Sol. de patentes U.S. n^{os} 20070004912, 20050246798, y 20050060767); y el gen de manosa-6-fosfato isomerasa, que proporciona la capacidad para metabolizar manosa (patentes U.S. n^{os} 5.767.378 y 5.994.629). Como alternativa, y en una realización preferida, el gen de HPPD de la actual invención se usa él mismo, como el marcador seleccionable, en combinación con el uso de un herbicida de HPPD como agente de selección.

25 Los métodos para la regeneración de plantas también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han utilizado vectores plasmídicos Ti para el suministro de ADN extraño, así como la captación directa de ADN, liposomas, electroporación, microinyección, y microproyectiles. Además, se pueden utilizar bacterias del género *Agrobacterium* para transformar células vegetales. A continuación se dan descripciones de técnicas representativas para transformar plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, así como una técnica de transformación de plástidos representativa.

30 Muchos vectores están disponibles para la transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estos poseen típicamente al menos una secuencia frontera de T-DNA, e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Para la construcción de vectores útiles en la transformación con *Agrobacterium*, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. n^o 2006/0260011.

35 La transformación sin el uso de *Agrobacterium tumefaciens* soslaya la necesidad de secuencias de T-DNA en el vector de transformación escogido, y en consecuencia se pueden utilizar vectores que carecen de estas secuencias, además de vectores tales como aquellos descritos anteriormente que contienen las secuencias de T-DNA. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen la transformación vía bombardeo con partículas, captación de protoplastos (*por ejemplo*, PEG y electroporación) y microinyección. La elección del vector depende enormemente de la selección preferida para la especie que se transforma. Para la construcción de tales vectores, véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente U.S. n^o 20060260011.

45 Para la expresión de una secuencia nucleotídica de la presente invención en plástidos vegetales, se usa el vector de transformación de plástidos pPH143 (el WO 97/32011, véase el Ejemplo 36). La secuencia nucleotídica se inserta en pPH143, sustituyendo de ese modo la secuencia codificante de PROTOX. Este vector se usa entonces para la transformación plástidica y la selección de transformantes para resistencia a espectinomina. Como alternativa, la secuencia nucleotídica se inserta en pPH143, de forma que sustituye al gen *aadH*. En este caso, los transformantes se seleccionan para resistencia a inhibidores de PROTOX.

50 Las técnicas de transformación para dicotiledóneas son bien conocidas en la técnica, e incluyen técnicas a base de *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas sin *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por los protoplastos o células. Esto se puede lograr mediante captación mediada por PEG o por electroporación, suministro mediado por bombardeo con partículas, o microinyección. Los ejemplos de estas técnicas se describen por Paszkowski *et al. EMBO J.* 3:2717-2722 (1984); Potrykus *et al. Mol. Gen. Genet.* 199:169-177 (1985); Reich *et al. Biotechnology* 4:1001-1004 (1986); y Klein *et al. Nature* 327:70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneran en plantas completas usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

55 La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas, debido a su elevada eficiencia de transformación y a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* implica típicamente la transferencia del vector binario que posee el ADN extraño de interés (*por ejemplo*, pCIB200 o pCIB2001) a una cepa de *Agrobacterium* apropiada, que puede depender del complemento de genes *vir* portados por la cepa hospedante de *Agrobacterium* en un plásmido Ti

corresidente, o cromosómicamente (*por ejemplo*, cepa CIB542 para pCIB200 y pCIB2001 (Uknes *et al. Plant Cell* 5:159-169 (1993)). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* se logra mediante un procedimiento de emparejamiento triparental usando *E. coli* que posee el vector binario recombinante, una cepa de *E. coli* auxiliar que posee un plásmido tal como pRK2013 y que es capaz de movilizar el vector binario recombinante a la cepa diana de *Agrobacterium*. Como alternativa, el vector binario recombinante se puede transferir a *Agrobacterium* mediante transformación con ADN (Hofgen y Willmitzer *Nucl. Acids Res.* 16: 9877 (1988)).

La transformación de la especie vegetal diana mediante *Agrobacterium* recombinante implica habitualmente el cocultivo de la *Agrobacterium* con explantes procedentes de la planta, y siguiendo protocolos bien conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera en medio seleccionable que posee el marcador de resistencia a antibióticos o a herbicidas presente entre las fronteras de T-DNA del plásmido binario.

Otro enfoque para transformar células vegetales con un gen implica propulsar partículas inertes o biológicamente activas en los tejidos y células vegetales. Esta técnica se describe en las patentes U.S. n^{os} 4.945.050, 5.036.006, y 5.100.792, todas de Sanford *et al.* Generalmente, este procedimiento implica impulsar partículas inertes o biológicamente activas en las células en condiciones efectivas para penetrar la superficie exterior de la célula y producir la incorporación en el interior de la misma. Cuando se utilizan partículas inertes, el vector se puede introducir en la célula revistiendo las partículas con el vector que contiene el gen deseado. Como alternativa, la célula diana puede estar rodeada por el vector, de manera que el vector es portado en la célula por la estela de la partícula. Las partículas biológicamente activas (*por ejemplo*, células de levadura secas, bacteria seca o un bacteriófago, conteniendo cada uno ADN que se busca introducir) también pueden ser propulsadas en un tejido de célula vegetales.

La transformación de la mayoría de las especies de monocotiledóneas se ha convertido ahora también en algo normal. Las técnicas preferidas incluyen la transferencia génica directa en protoplastos usando técnicas mediante PEG o electroporación, y bombardeo con partículas en el tejido del callo. Las transformaciones se pueden llevar a cabo con una única especie de ADN, o con múltiples especies de ADN (es decir, cotransformación), y estas dos técnicas son adecuadas para uso con esta invención. La cotransformación puede tener la ventaja de evitar la construcción completa del vector, y de generar plantas transgénicas con loci sin enlazar para el gen de interés y el marcador seleccionable, permitiendo la eliminación del marcador seleccionable en generaciones subsiguientes, considerándose esto deseable. Sin embargo, una desventaja del uso de la cotransformación es la frecuencia menor de 100% con la que la especie de ADN separada se integra en el genoma (Schocher *et al. Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)).

Las Solicitudes de Patentes EP 0292435, EP 0392225, y WO 93/07278, describen técnicas para la preparación de callo y protoplastos a partir de una línea consanguínea de élite de maíz, la transformación de los protoplastos usando PEG o electroporación, y la regeneración de plantas de maíz a partir de protoplastos transformados. Gordon-Kamm *et al. (Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) y Fromm *et al. (Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) han publicado técnicas para la transformación de la estirpe del maíz derivada de A188 usando bombardeo con partículas. Además, WO 93/07278 y Koziel *et al. (Biotechnology* 11:194-200 (1993)) describen técnicas para la transformación de estirpes consanguíneas de élite de maíz mediante bombardeo con partículas. Esta técnica utiliza embriones inmaduros de maíz de una longitud de 1,5-2,5 mm, cortados de una mazorca de maíz 14-15 días después de la polinización, y un dispositivo PDS-1000He Biolistics para el bombardeo.

La transformación de arroz también se puede llevar a cabo mediante técnicas de transferencia génica directa utilizando protoplastos o bombardeo con partículas. Las transformaciones mediadas por protoplastos se han descrito para los tipos Japónica e Índica (Zhang *et al. Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimamoto *et al. Nature* 338:274-277 (1989); y Datta *et al. Biotechnology* 8:736-740 (1990)). Ambos tipos también son transformables de forma habitual usando bombardeo con partículas (Christou *et al. Biotechnology* 9:957-962 (1991)). Además, WO 93/21335 describe técnicas para la transformación de arroz vía electroporación.

La Solicitud de Patente EP 0332581 describe técnicas para la generación, transformación, y regeneración de protoplastos de Pooideae. Estas técnicas permiten la transformación de Dactylis y trigo. Además, la transformación del trigo se ha descrito por Vasil *et al. (Biotechnology* 10:667-674 (1992)) usando bombardeo con partículas en células de callo regenerable a largo plazo tipo C, y también por Vasil *et al. (Biotechnology* 11:1553-1558 (1993)) y Weeks *et al. (Plant Physiol.* 102:1077-1084 (1993)) usando bombardeo con partículas de embriones inmaduros y callo derivado de embriones inmaduros. Sin embargo, una técnica preferida para la transformación de trigo implica la transformación de trigo mediante bombardeo con partículas de embriones inmaduros, e incluye una etapa con alto contenido de sacarosa o una etapa con alto contenido de maltosa antes del suministro génico. Antes del bombardeo, se colocan en placas cualquier número de embriones (0,75-1 mm de longitud) en medio MS con 3% de sacarosa (Murashiga y Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) y 3 mg/l de 2,4-D para la inducción de embriones somáticos, que se deja transcurrir en la oscuridad. En el día escogido del bombardeo, los embriones se retiran del medio de inducción y se colocan en el osmótico (*es decir*, medio de inducción con sacarosa o maltosa añadida a la concentración deseada, típicamente 15%). Los embriones se dejan plasmolizar durante 2-3 horas y después son bombardeados. Veinte embriones por placa diana son típicos, aunque no críticos. Un plásmido que posee el gen apropiado (tal como pCIB3064 o pSOG35) se hace precipitar sobre partículas de oro de tamaño micrométrico usando procedimientos estándar. Cada placa de embriones es disparada con el dispositivo de helio

DuPont BIOLISTICS® usando una presión de estallido de alrededor de un 1000 psi usando un tamiz de malla 80 estándar. Tras el bombardeo, los embriones se colocan nuevamente en la oscuridad para que se recuperen durante alrededor de un 24 horas (todavía en osmótico). Después de 24 h, los embriones se retiran del osmótico y se colocan nuevamente en medio de inducción, en el que permanecen durante alrededor de un mes antes de la regeneración. Aproximadamente un mes después, los explantes embrionarios con callo embrionario en desarrollo se transfieren a medio de regeneración (MS+1 mg/litro NAA, 5 mg/litro GA), que contiene además el agente de selección apropiado (10 mg/l basta en el caso de pCIB3064, y 2 mg/l de metotrexato en el caso de pSOG35). Después de aproximadamente un mes, los retoños desarrollados se transfieren a recipientes estériles más grandes conocidos como "GA7", que contienen MS de fuerza media, 2% de sacarosa, y la misma concentración de agente de selección.

También se ha descrito la transformación de monocotiledóneas usando *Agrobacterium*. Véanse, WO 94/00977 y la patente U.S. nº 5.591.616. Véase también, Negrotto *et al. Plant Cell Reports* 19:798-803 (2000).

Por ejemplo, se puede usar arroz (*Oryza sativa*) para generar plantas transgénicas. Se pueden usar diversas variedades de cultivo del arroz (Hiei *et al.*, 1994, *Plant Journal* 6:271-282; Dong *et al.*, 1996, *Molecular Breeding* 2:267-276; y Hiei *et al.*, 1997, *Plant Molecular Biology* 35:205-218). También, los diversos constituyentes de los medios descritos más abajo se pueden variar en cantidad o se pueden sustituir. Las respuestas embrionarias se inician y/o los cultivos se establecen a partir de embriones maduros cultivando en medio MS-CIM (sales basales de MS, 4,3 g/litro; vitaminas B5 (200X), 5 ml/litro; sacarosa, 30 g/litro; prolina, 500 mg/litro; glutamina, 500 mg/litro; hidrolizado de caseína, 300 mg/litro; 2,4-D (1 mg/ml), 2 ml/litro; ajustar pH hasta 5,8 con KOH 1 N; Phytigel, 3 g/litro). Tanto los embriones maduros en las etapas iniciales de respuesta del cultivo o las estirpes del cultivo establecidas se inoculan y cocultivan con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*) que contiene la construcción vectorial deseada. *Agrobacterium* se cultiva a partir de lotes de glicerol sobre medio YPC sólido (100 mg/L de espectinomicina y cualquier otro antibiótico apropiado) durante alrededor de un 2 días a 28°C. *Agrobacterium* se resuspende en medio MS-CIM líquido. El cultivo de *Agrobacterium* se diluye hasta una OD⁶⁰⁰ de 0,2-0,3, y se añade acetosiringona hasta una concentración final de 200 µM. La acetosiringona se añade antes de mezclar la disolución con los cultivos de arroz para inducir al *Agrobacterium* para la transferencia de ADN a las células vegetales. Para la inoculación, los cultivos vegetales se sumergen en la suspensión bacteriana. La suspensión bacteriana líquida se retira y los cultivos inoculados se colocan en medio de cocultivo y se incuban a 22°C durante dos días. Los cultivos se transfieren entonces a medio MS-CIM con ticarcilina (400 mg/litro) para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*. Para los constructos que utilizan el gen marcador seleccionable de PMI (Reed *et al. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:127-132), los cultivos se transfieren a medio de selección que contiene manosa como fuente de hidratos de carbono (MS con 2% de manosa, 300 mg/litro de ticarcilina) después de 7 días, y se cultivan durante 3-4 semanas en la oscuridad. Las colonias resistentes se transfieren entonces para la regeneración en medio de inducción (MS sin 2,4-D, 0,5 mg/litro de IAA, 1 mg/litro de zeatina, 200 mg/litro de timentina, 2% de manosa y 3% de sorbitol) y se hacen crecer en la oscuridad durante 14 días. Las colonias que proliferan se transfieren entonces a otra ronda de medio de inducción de regeneración y se mueven a la habitación de crecimiento iluminada. Los brotes regenerados se transfieren a recipientes GA7 con medio GA7-1 (MS sin hormonas y con 2% de sorbitol) durante 2 semanas, y después se mueven al invernadero donde son suficientemente grandes y tienen raíces adecuadas. Las plantas se transplantan al suelo en el invernadero (generación T₀), se hacen crecer hasta la madurez, y la semilla T₁ se cosecha.

Las plantas obtenidas vía transformación con una secuencia de ácido nucleico de interés en la presente invención pueden ser cualquiera de una amplia variedad de especies vegetales, incluyendo aquellas monocotiledóneas y dicotiledóneas; sin embargo, las plantas usadas en el método de la invención se seleccionan preferiblemente de la lista de cosechas diana agrónomicamente importantes expuestas aquí en otra parte. La expresión de un gen de la presente invención, en combinación con otras características importantes para la producción y calidad, se pueden incorporar en estirpes vegetales a través de reproducción. Los enfoques y técnicas de reproducción son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Welsh, *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley and Sons, NY (1981); *Crop Breeding*, Wood D.R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Segunda Edición, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY (1986); y Wricke y Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter and Co., Berlín (1986).

Para la transformación de plástidos, se hacen germinar semillas de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xanthiense", siete por placa, en una disposición circular de 1" en un medio de agar T, y 12-14 días después de sembrar se bombardean con partículas de volframio de 1 µm (M10, Biorad, Hercules, Calif.) revestidas con ADN procedente de los plásmidos pPH143 y pPH145, esencialmente como se describe (Svab, Z. y Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). Las plántulas bombardeadas se incuban en medio T durante dos días, después de lo cual se cortan las hojas y se colocan con el lado abaxial hacia arriba en luz brillante (350-500 µmoles de fotones/m²/s) en placas de medio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) que contiene 500 µg/ml de dihidrocloruro de espectinomicina (Sigma, St. Louis, MO). Los brotes resistentes que aparecen por debajo de las hojas cloróticas, tres a ocho semanas después del bombardeo, se subclonan en el mismo medio selectivo, se deja que se forme callo, y los brotes secundarios se aíslan y se subclonan. La segregación completa de copias genómicas de plástidos transformados (homoplasmicidad) en subclones independientes se evalúa mediante técnicas estándar de

transferencia Southern (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). Se separa ADN celular total digerido con BamHI/EcoRI (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346349) en geles de agarosa con 1% de Tris-borato (TBE), se transfiere a membranas de nailon (Amersham), y se sonda con secuencias de ADN cebadas al azar marcadas con ³²P que corresponden a un fragmento de ADN de BamHI/HindIII de 0,7 kb procedente de pC8 que contiene una porción de la secuencia que selecciona plástidos rps7/12. Los brotes homoplásmicos se enraizan asépticamente en medio MS/IBA que contiene espectinomomicina (McBride, K. E. et al. (1994) PNAS 91, 7301-7305), y se transfieren al invernadero.

Las propiedades genéticas manipuladas mediante ingeniería en las semillas y plantas transgénicas descritas anteriormente se perpetúan mediante reproducción sexual o crecimiento vegetativo, y de este modo se pueden mantener y propagar en las plantas de la progenie. Generalmente, el mantenimiento y la propagación hacen uso de métodos agrícolas conocidos, desarrollados para satisfacer fines específicos tales como el arado, la siembra o el cosechado.

El uso de las propiedades genéticas ventajosas de las plantas y semillas transgénicas según la invención se puede hacer adicionalmente en la reproducción vegetal. Dependiendo de las propiedades deseadas, se toman diferentes medidas de reproducción. Las técnicas pertinentes son bien conocidas en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, hibridación, reproducción endogámica, reproducción por retrocruzamiento, reproducción de múltiples líneas, mezcla de variedades, hibridación interespecífica, técnicas aneuploides, etc. De este modo, las semillas y plantas transgénicas según la invención se pueden usar para la reproducción de líneas vegetales mejoradas que, por ejemplo, incrementan la efectividad de métodos convencionales, tales como el tratamiento con herbicidas o plaguicidas, o permiten dispensarlos con dichos métodos debido a sus propiedades genéticas modificadas.

Muchos métodos adecuados para la transformación que usan marcadores de selección adecuados, tales como canamicina, vectores binarios tales como procedentes de *Agrobacterium*, y regeneración de plantas, como, por ejemplo, procedentes de discos de hojas de tabaco, son bien conocidos en la técnica. Opcionalmente, igualmente una población de control vegetal se transforma con un polinucleótido que expresa la HPPD de control. Como alternativa, una planta dicotiledónea no transformada, tal como *Arabidopsis* o tabaco, se puede usar como un control, puesto que, en este caso, expresa su propia HPPD endógena.

Resistencia a herbicidas

La presente invención proporciona plantas, células vegetales, tejidos y semillas transgénicas que se han transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica una HPPD mutante o variante de la misma que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables.

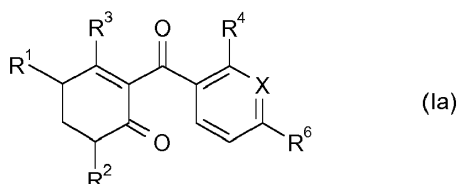
En una realización, las plantas transgénicas de la invención presentan resistencia o tolerancia a la aplicación de herbicida en una cantidad desde alrededor de un 5 hasta alrededor de un 2,000 gramos por hectárea (g/ha), incluyendo, por ejemplo, alrededor de un 5 g/ha, alrededor de un 10 g/ha, alrededor de un 15 g/ha, alrededor de un 20 g/ha, alrededor de un 25 g/ha, alrededor de un 30 g/ha, alrededor de un 35 g/ha, alrededor de un 40 g/ha, alrededor de un 45 g/ha, alrededor de un 50 g/ha, alrededor de un 55 g/ha, alrededor de un 60 g/ha, alrededor de un 65 g/ha, alrededor de un 70 g/ha, alrededor de un 75 g/ha, alrededor de un 80 g/ha, alrededor de un 85 g/ha, alrededor de un 90 g/ha, alrededor de un 95 g/ha, alrededor de un 100 g/ha, alrededor de un 110 g/ha, alrededor de un 120 g/ha, alrededor de un 130 g/ha, alrededor de un 140 g/ha, alrededor de un 150 g/ha, alrededor de un 160 g/ha, alrededor de un 170 g/ha, alrededor de un 180 g/ha, alrededor de un 190 g/ha, alrededor de un 200 g/ha, alrededor de un 210 g/ha, alrededor de un 220 g/ha, alrededor de un 230 g/ha, alrededor de un 240 g/ha, alrededor de un 250 g/ha, alrededor de un 260 g/ha, alrededor de un 270 g/ha, alrededor de un 280 g/ha, alrededor de un 290 g/ha, alrededor de un 300 g/ha, alrededor de un 310 g/ha, alrededor de un 320 g/ha, alrededor de un 330 g/ha, alrededor de un 340 g/ha, alrededor de un 350 g/ha, alrededor de un 360 g/ha, alrededor de un 370 g/ha, alrededor de un 380 g/ha, alrededor de un 390 g/ha, alrededor de un 400 g/ha, alrededor de un 410 g/ha, alrededor de un 420 g/ha, alrededor de un 430 g/ha, alrededor de un 440 g/ha, alrededor de un 450 g/ha, alrededor de un 460 g/ha, alrededor de un 470 g/ha, alrededor de un 480 g/ha, alrededor de un 490 g/ha, alrededor de un 500 g/ha, alrededor de un 510 g/ha, alrededor de un 520 g/ha, alrededor de un 530 g/ha, alrededor de un 540 g/ha, alrededor de un 550 g/ha, alrededor de un 560 g/ha, alrededor de un 570 g/ha, alrededor de un 580 g/ha, alrededor de un 590 g/ha, alrededor de un 600 g/ha, alrededor de un 610 g/ha, alrededor de un 620 g/ha, alrededor de un 630 g/ha, alrededor de un 640 g/ha, alrededor de un 650 g/ha, alrededor de un 660 g/ha, alrededor de un 670 g/ha, alrededor de un 680 g/ha, alrededor de un 690 g/ha, alrededor de un 700 g/ha, alrededor de un 710 g/ha, alrededor de un 720 g/ha, alrededor de un 730 g/ha, alrededor de un 740 g/ha, alrededor de un 750 g/ha, alrededor de un 760 g/ha, alrededor de un 770 g/ha, alrededor de un 780 g/ha, alrededor de un 790 g/ha, alrededor de un 800 g/ha, alrededor de un 810 g/ha, alrededor de un 820 g/ha, alrededor de un 830 g/ha, alrededor de un 840 g/ha, alrededor de un 850 g/ha, alrededor de un 860 g/ha, alrededor de un 870 g/ha, alrededor de un 880 g/ha, alrededor de un 890 g/ha, alrededor de un 900 g/ha, alrededor de un 910 g/ha, alrededor de un 920 g/ha, alrededor de un 930 g/ha, alrededor de un 940 g/ha, alrededor de un 950 g/ha, alrededor de un 960 g/ha, alrededor de un 970 g/ha, alrededor de un 980 g/ha, alrededor de un 990 g/ha, alrededor de un 1.000, g/ha, alrededor de un 1.010 g/ha, alrededor de un 1.020 g/ha, alrededor de un 1.030 g/ha, alrededor de un 1.040 g/ha, alrededor de un 1.050 g/ha, alrededor de un 1.060 g/ha, alrededor de un 1.070 g/ha, alrededor de un 1.080 g/ha, alrededor de un 1.090 g/ha, alrededor de un 1.100 g/ha,

alrededor de un 1.110 g/ha, alrededor de un 1.120 g/ha, alrededor de un 1.130 g/ha, alrededor de un 1.140 g/ha, alrededor de un 1.150 g/ha, alrededor de un 1.160 g/ha, alrededor de un 1.170 g/ha, alrededor de un 1.180 g/ha, alrededor de un 1.190 g/ha, alrededor de un 1.200 g/ha, alrededor de un 1.210 g/ha, alrededor de un 1.220 g/ha, alrededor de un 1.230 g/ha, alrededor de un 1.240 g/ha, alrededor de un 1.250 g/ha, alrededor de un 1.260 g/ha, alrededor de un 1.270 g/ha, alrededor de un 1.280 g/ha, alrededor de un 1.290 g/ha, alrededor de un 1.300 g/ha, alrededor de un 1.310 g/ha, alrededor de un 1.320 g/ha, alrededor de un 1.330 g/ha, alrededor de un 1.340 g/ha, alrededor de un 1.350 g/ha, alrededor de un 360 g/ha, alrededor de un 1.370 g/ha, alrededor de un 1.380 g/ha, alrededor de un 1.390 g/ha, alrededor de un 1.400 g/ha, alrededor de un 1.410 g/ha, alrededor de un 1.420 g/ha, alrededor de un 1.430 g/ha, alrededor de un 1.440 g/ha, alrededor de un 1.450 g/ha, alrededor de un 1.460 g/ha, alrededor de un 1.470 g/ha, alrededor de un 1.480 g/ha, alrededor de un 1.490 g/ha, alrededor de un 1.500 g/ha, alrededor de un 1.510 g/ha, alrededor de un 1.520 g/ha, alrededor de un 1.530 g/ha, alrededor de un 1.540 g/ha, alrededor de un 1.550 g/ha, alrededor de un 1.560 g/ha, alrededor de un 1.570 g/ha, alrededor de un 1.580 g/ha, alrededor de un 1.590 g/ha, alrededor de un 1.600 g/ha, alrededor de un 1.610 g/ha, alrededor de un 1.620 g/ha, alrededor de un 1.630 g/ha, alrededor de un 1.640 g/ha, alrededor de un 1.650 g/ha, alrededor de un 1.660 g/ha, alrededor de un 1.670 g/ha, alrededor de un 1.680 g/ha, alrededor de un 1.690 g/ha, alrededor de un 1.700 g/ha, alrededor de un 1.710 g/ha, alrededor de un 1.720 g/ha, alrededor de un 1.730 g/ha, alrededor de un 1.740 g/ha, alrededor de un 1.750 g/ha, alrededor de un 1.760 g/ha, alrededor de un 1.770 g/ha, alrededor de un 1.780 g/ha, alrededor de un 1.790 g/ha, alrededor de un 1.800 g/ha, alrededor de un 1.810 g/ha, alrededor de un 1.820 g/ha, alrededor de un 1.830 g/ha, alrededor de un 1.840 g/ha, alrededor de un 1.850 g/ha, alrededor de un 1.860 g/ha, alrededor de un 1.870 g/ha, alrededor de un 1.880 g/ha, alrededor de un 1.890 g/ha, alrededor de un 1.900 g/ha, alrededor de un 1.910 g/ha, alrededor de un 1.920 g/ha, alrededor de un 1.930 g/ha, alrededor de un 1.940 g/ha, alrededor de un 1.950 g/ha, alrededor de un 1.960 g/ha, alrededor de un 1.970 g/ha, alrededor de un 1.980 g/ha, alrededor de un 1.990 g/ha, o alrededor de un 2.000.

Los niveles medios y de distribución de tolerancia o resistencia a herbicidas de un intervalo de sucesos de transformación vegetal primario se evalúan de la manera normal basándose en el daño a la planta, síntomas de clorosis meristemática, etc., en un intervalo de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos se pueden expresar en términos de, por ejemplo, valores GR₅₀, derivados de curvas de dosis/respuesta que representan gráficamente las “dosis” en el eje x, y representan gráficamente en el eje y el “porcentaje de exterminio”, “efecto herbicida”, “números de plantas verdes que emergen”, etc., en las que valores incrementados de GR₅₀ corresponden a niveles incrementados de tolerancia inherente a inhibidores (*por ejemplo*, valor incrementado de Ki/K_{mHPP}) y/o el nivel de expresión de polipéptido de HPPD expresado.

Los métodos de la presente divulgación son especialmente útiles para proteger cosechas de la lesión herbicida de herbicidas inhibidores de HPPD de las clases de química de HPPD descritas a continuación. En un aspecto, se seleccionan del grupo que consiste en:

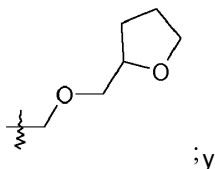
a) un compuesto de fórmula (Ia)



donde R¹ y R² son hidrógeno o juntos forman un puente de etileno;

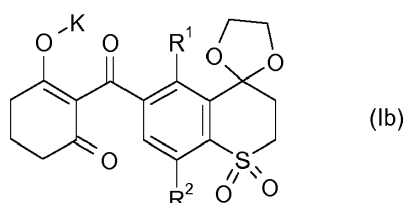
R³ es hidroxilo o feniltilio-; R⁴ es halógeno, nitro, alquilo C₁-C₄, (alcoxi C₁-C₄)-(alquil C₁-C₄)-, (alcoxi C₁-C₄)-(alcoxi C₁-C₄)-(alquil C₁-C₄)-;

X es metino, nitrógeno o C-R⁵ donde R⁵ es hidrógeno, alcoxi C₁-C₄, (haloalcoxi C₁-C₄)-(alquil C₁-C₄)- o un grupo



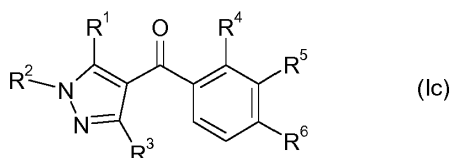
R⁶ es alquilsulfonil C₁-C₄- o haloalquilo C₁-C₄;

b) un compuesto de fórmula (Ib)



R¹ y R² son independientemente alquilo C₁-C₄; y los ácidos libres de los mismos;

c) un compuesto de fórmula (Ic)

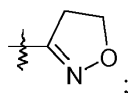


5 donde R¹ es hidroxil, fenilcarbonil-(alcoxi C₁-C₄)- o fenilcarbonil-(alcoxi C₁-C₄)- donde el resto de fenilo está sustituido en la posición *para* con halógeno o alquilo C₁-C₄, o fenilsulfoniloxi- o fenilsulfoniloxi- donde el resto de fenilo está sustituido en la posición *para* con halógeno o alquilo C₁-C₄;

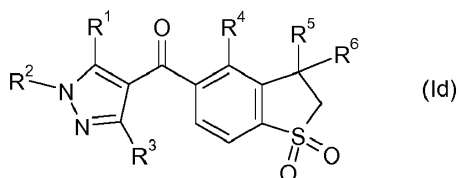
R² es alquilo C₁-C₄;

10 R³ es hidrógeno o alquilo C₁-C₄; R⁴ y R⁶ son independientemente halógeno, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄ o alquilsulfonil C₁-C₄; y

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



d) un compuesto de fórmula (Id)

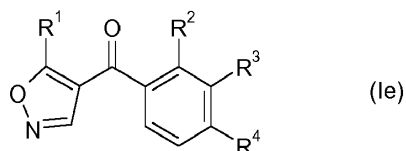


15 donde R¹ es hidroxil;

R² es alquilo C₁-C₄;

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

e) un compuesto de fórmula (Ie)

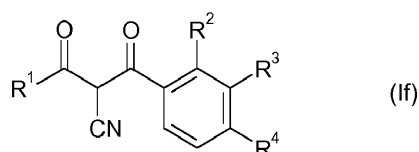


20 donde R¹ es ciclopropilo;

R² y R⁴ son independientemente halógeno, haloalquilo C₁-C₄ o alquilsulfonil C₁-C₄; y

R³ es hidrógeno;

f) un compuesto de fórmula (If)

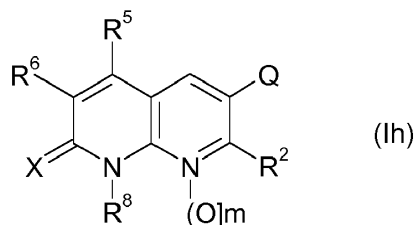
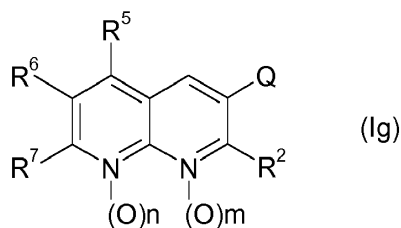


donde R¹ es ciclopropilo;

R² y R⁴ son independientemente halógeno, haloalquilo C₁-C₄ o alquilsulfonyl C₁-C₄; y

R³ es hidrógeno;

5 g) un compuesto de fórmula (Ig) o fórmula (Ih)



donde:

10 R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, (alcoxi C₁-C₃)-(alquilo C₁-C₃) y (alcoxi C₁-C₃)-(alcoxi C₂-C₃)-(alquilo C₁-C₃);

R⁵ es hidrógeno o metilo;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, hidroxilo y metilo;

15 R⁷ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, sulfhidrilo, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, haloalquilo C₁-C₆, haloalqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₃-C₆, alcoxi C₁-C₆, cicloalcoxi C₄-C₇, haloalcoxi C₁-C₆, alquiltio C₁-C₆, alquilsulfinilo C₁-C₆, alquilsulfonyl C₁-C₆, haloalquiltio C₁-C₆, amino, alquilamino C₁-C₆, dialquilamino C₂-C₆, dialquilaminosulfonyl C₂-C₆, alquilaminosulfonyl C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆)-(alquilo C₁-C₆), (alqueno C₃-C₆)-(alcoxi C₂-C₆), (alquino C₃-C₆)-(alcoxi C₁-C₆), (alcoxi C₁-C₆)carbonilo, (alquilo C₁-C₆)carbonilo, (alqueno C₁-C₄)-S(O)_p-R', (alqueno C₁-C₄)-CO₂-R', (alqueno C₁-C₄)-(CO)N-R', fenil, feniltio, fenilsulfinilo, fenilsulfonyl, fenoxi, pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo y heteroarilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros, donde el heteroarilo contiene de uno a tres heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, donde el componente fenilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₃, haloalcoxi C₁-C₃, halo, ciano y nitro;

X = O o S;

25 n = 0 o 1;

m = 0 o 1 siempre que si m = 1 entonces n = 0 y si n=1 entonces m = 0;

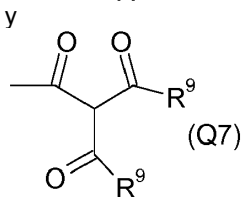
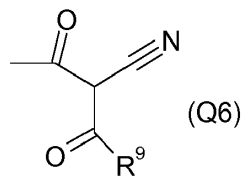
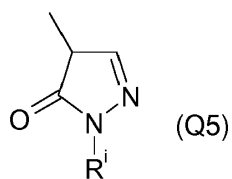
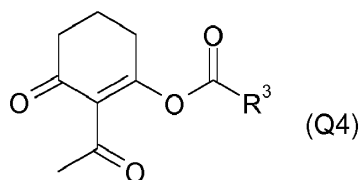
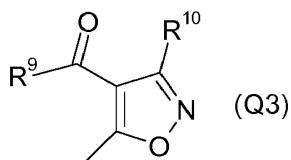
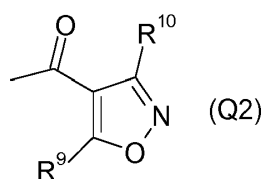
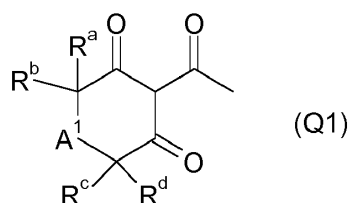
p = 0, 1 o 2;

R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

30 R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, (alquilo C₁-C₆)carbonil-(alquilo C₁-C₃), (cicloalquilo C₃-C₆)alquenoilo, por ejemplo, ciclohexilmetileno, (alquilo C₃-C₆)alquenoilo, por ejemplo, propargilo, (alqueno C₂-C₆)alquenoilo, por ejemplo, alilo, (alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), ciano-(alquilo C₁-C₆), arilcarbonil-(alquilo C₁-C₃) (donde el arilo puede estar sustituido opcionalmente con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, alcoxi C₁-C₃, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃), aril-(alquilo C₁-C₆) (donde el arilo puede

5 estar sustituido opcionalmente con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, alcoxi C₁-C₃, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆) y un (heteroaril de 5 o 6 miembros)-(alquilo C₁-C₃) o heterocicliil-(alquilo C₁-C₃), donde el heteroarilo o heterocicliilo contiene de uno a tres heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, donde el componente heterocicliilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con un sustituyente seleccionado el grupo que consiste en halo, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃ y alcoxi C₁-C₃;

Q se selecciona del grupo que consiste en:



donde

A¹ se selecciona del grupo que consiste en O, C(O), S, SO, SO₂ y (CR^eR^f)_q;

q = 0, 1 o 2;

5 R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_4 que puede estar mono, di o trisustituido con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C_1-C_4 , halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxycarbonilo, (alcoxi C_1-C_4)-carbonilo, alquiltio C_1-C_4 , alquilsulfinilo C_1-C_4 , alquilsulfonilo C_1-C_4 , (alquil C_1-C_4)-carbonilo, fenilo y heteroarilo, siendo posible a su vez que los grupos fenilo y heteroarilo estén mono, di o trisustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C_1-C_4 , halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxycarbonilo, (alcoxi C_1-C_4)-carbonilo, alquilsulfonilo C_1-C_4 y haloalquilo C_1-C_4 , donde los sustituyentes del nitrógeno en el anillo heterocíclico no son halógeno; o

10 R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi C_1-C_4 , halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxycarbonilo, (alcoxi C_1-C_4)-carbonilo, alquiltio C_1-C_4 , alquilsulfinilo C_1-C_4 , alquilsulfonilo C_1-C_4 , (alquil C_1-C_4)-carbonilo, fenilo o heteroarilo, siendo posible a su vez que los grupos fenilo y heteroarilo estén mono, di o trisustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C_1-C_4 , halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxycarbonilo, (alcoxi C_1-C_4)-carbonilo, alquilsulfonilo C_1-C_4 y haloalquilo C_1-C_4 , donde los sustituyentes del nitrógeno en el anillo heterocíclico no son halógeno; o

15 R^a y R^b juntos forman un anillo carbocíclico de 3 a 5 miembros que puede estar sustituido con alquilo C_1-C_4 y puede estar interrumpido por oxígeno, azufre, S(O), SO₂, OC(O), NR⁹ o por C(O); o

R^a y R^c juntos forman una cadena de alquileo C_1-C_3 que puede estar interrumpida por oxígeno, azufre, SO, SO₂, OC(O), NR^h o por C(O); siendo posible a su vez que la cadena de alquileo C_1-C_3 esté sustituida con alquilo C_1-C_4 ;

R^g y R^h son cada uno, independientemente el uno del otro, alquilo C_1-C_4 , haloalquilo C_1-C_4 , alquilsulfonilo C_1-C_4 , (alquil C_1-C_4)-carbonilo o (alcoxi C_1-C_4)-carbonilo;

20 R^i es alquilo C_1-C_4 ;

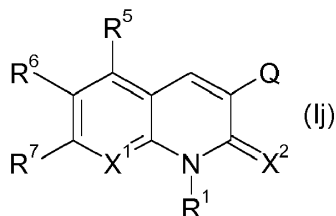
R^3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 , sustituido opcionalmente con halógeno y/o alcoxi C_1-C_3 ; y cicloalquilo C_3-C_6 sustituido opcionalmente con halógeno y/o alcoxi C_1-C_3 ;

R^9 se selecciona del grupo que consiste en ciclopropilo, CF₃ e i.-Pr;

R^{10} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, I, Br, SR¹¹, S(O)R¹¹, S(O)₂R¹¹ y CO₂R¹¹; y

25 R^{11} es alquilo C_{1-4} ;

h) un compuesto de fórmula (lj), (lk) o (lm)



o una sal agronómicamente aceptable de dicho compuesto, donde:

30 R^1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , (alcoxi C_1-C_3)-(alquilo C_1-C_3), (alcoxi C_1-C_3)-(alcoxi C_1-C_3)-(alquilo C_1-C_3), (alcoxi C_1-C_3)-(haloalquilo C_1-C_3), (alcoxi C_1-C_3)-(alcoxi C_1-C_3)-(haloalquilo C_1-C_3), (cicloalcoxi oxasustituido C_4-C_6)-(alquilo C_1-C_3), (cicloalquil oxasustituido C_4-C_6)-(alcoxi C_1-C_3)-(alquilo C_1-C_3), (cicloalcoxi oxasustituido C_4-C_6)-(haloalquilo C_1-C_3), (cicloalquilo oxasustituido C_4-C_6)-(alcoxi C_1-C_3)-(haloalquilo C_1-C_3), [(alcanosulfonil C_1-C_3)-(alquilamino C_1-C_3)]-(alquilo C_1-C_3), [(alcanosulfonilo C_1-C_3)-(cicloalquilamino C_3-C_4)]-(alquilo C_1-C_3), (alquil C_1-C_6)-carbonil-(alquilo C_1-C_3), (cicloalquil C_3-C_6)-(alquenoilo C_2-C_6), alquinilo C_3-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , ciano-(alquilo C_1-C_6), arilcarbonil-(alquilo C_1-C_3) (donde el arilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes del grupo que consiste en halo, alcoxi C_1-C_3 , alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , aril-(alquilo C_1-C_6) (donde el arilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes del grupo que consiste en halo, alcoxi C_1-C_3 , alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , arilo, heteroarilo de 5 o 6 miembros, (heteroarilo de 5 o 6 miembros)-(alquilo C_1-C_3) y heterociclilo-(alquilo C_1-C_3), donde el heteroarilo o heterociclilo contiene de uno a tres heteroátomos cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre y donde el componente arilo, heterociclilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , alcoxi C_1-C_3 , haloalcoxi C_1-C_3 , (alquilo C_1-C_6)-S(O)p-, (haloalquilo C_1-C_6)-S(O)p-, ciano y nitro;

45 R^5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, cloro, fluoro y metilo;

R^6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, hidroxilo y metilo;

R^7 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, ciano, nitro, halógeno, hidroxilo, sulfhidrido, alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , haloalquenoilo C_2-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , aril-(alquenoilo C_2-C_6), (alquinilo C_3-C_6),

5 alcoxi C₁-C₆, cicloalcoxi C₄-C₇, haloalcoxi C₁-C₆, (alquil C₁-C₆)-S(O)p, (cicloalquil C₃-C₆)-S(O)p, (haloalquil C₁-C₆)-S(O)p, (halocicloalquil C₃-C₆)-S(O)p, (alquil C₁-C₆)carbonilamino, [(alquil C₁-C₆)carbonil](alquilamino C₁-C₃), [(cicloalquil C₃-C₆)carbonil]amino, [(cicloalquil C₃-C₆)carbonil](alquilamino C₁-C₃), arilcarbonilamino, (arilcarbonil)-alquilamino C₁₋₃), (heteroarilcarbonil)amino, (heteroarilcarbonil)(alquilamino C₁-C₃), amino, alquilamino C₁-C₆, dialquilamino C₂-C₆, alquenilamino C₂-C₆, (alcoxi C₁-C₆)-(alquilamino C₂-C₆), [(alcoxi C₁-C₆)-(alquil C₂-C₄)]-(alquilamino C₁-C₆), cicloalquilamino C₃-C₆, ciclohaloalquilamino C₃-C₆, (alcoxi C₁-C₃)-(cicloalquilamino C₃-C₆), alquinilamino C₃-C₆, dialquilamino en el cual los sustituyentes se unen para formar un anillo de 4-6 miembros (por ejemplo, pirrolidinilo, piperidinilo) que contiene opcionalmente oxígeno (por ejemplo, morfolinilo) y/o sustituido opcionalmente con alcoxi C₁-C₃ y/o halógeno (especialmente flúor), dialquilaminosulfonilo C₂-C₆, alquilaminosulfonilo C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆)-(alquilo C₁-C₆), (alquenilo C₃-C₆)-(alcoxi C₂-C₆), (alquinilo C₃-C₆)-(alcoxi C₁-C₆), (alcoxi C₁-C₆)carbonilo, (alquil C₁-C₆)carbonilo, (alquilenil C₁-C₄)-S(O)p-R', (alquilenil C₁-C₄)-CO₂-R', (alquilenil C₁-C₄)-(CO)N-R'R', arilo (por ejemplo, fenilo), aril-(alquilo C₁-C₃), aril-S(O)p, heteroaril-S(O)p, ariloxi (por ejemplo, fenoxi), un heteroarilo de 5 o 6 miembros, heteroaril-(alquilo C₁-C₃) y heteroariloxi, donde el heteroarilo contiene de uno a tres heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, donde el componente arilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₃, haloalcoxi C₁-C₃, halo, ciano y nitro;

X¹ = N-(O)n o C-R⁸;

X² = O o S;

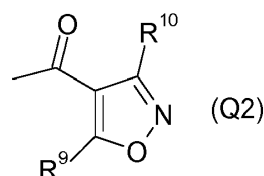
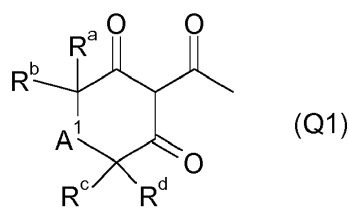
20 n = 0 o 1;

p = 0, 1 o 2;

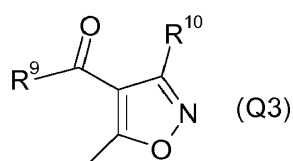
R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

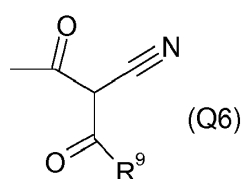
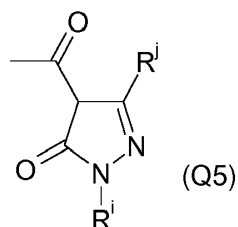
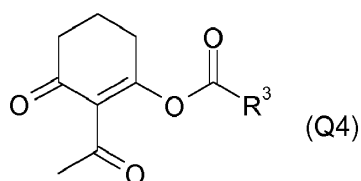
25 R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, (alquil C₁-C₆)carbonilo-(alquilo C₁-C₃), (cicloalquilo C₃-C₆)-(alquenilo C₂-C₆), por ejemplo, ciclohexilmetilenilo, alquinilo C₃-C₆ (por ejemplo, propargilo), alquenilo C₂-C₆ (por ejemplo, alilo), (alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), ciano-(alquil C₁-C₆), arilcarbonil-(alquilo C₁-C₃) (donde el arilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alcoxi C₁-C₃, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃), aril-(alquilo C₁-C₆) (donde el arilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes del grupo que consiste en halo, alcoxi C₁-C₃, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), arilo, un heteroarilo de 5 o 6 miembros, (un heteroarilo de 5 o 6 miembros)-(alquilo C₁-C₃) y heterociclil-(alquilo C₁-C₃), donde el heteroarilo o heterociclilo contiene de uno a tres heteroátomos cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre y donde el componente arilo, heterociclilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃ y alcoxi C₁-C₃, ciano y nitro;

35 Q se selecciona del grupo que consiste en:

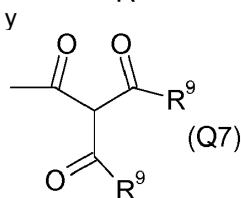


40





5



donde

A¹ se selecciona el grupo que consiste en O, C(O), S, SO, SO₂ y (CR^eR^f)_q;

10 q = 0, 1 o 2;

R^a, R^b, R^c, R^d, R^e y R^f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ que puede estar mono, di o trisustituido con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C₁-C₄, halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxicarbonilo, (alcoxi C₁-C₄)carbonilo, alquiltio C₁-C₄, alquilsulfonilo C₁-C₄, alquilsulfonilo C₁-C₄, (alquil C₁-C₄)carbonilo, fenilo y heteroarilo, siendo posible a su vez que los grupos fenilo y heteroarilo estén mono, di o trisustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C₁-C₄, halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxicarbonilo, (alcoxi C₁-C₄)carbonilo, alquilsulfonilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄, donde los sustituyentes del nitrógeno en el anillo heterocíclico no son halógeno; o

15

R^a, R^b, R^c, R^d, R^e y R^f se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi C₁-C₄, halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxicarbonilo, (alcoxi C₁-C₄)carbonilo, alquiltio C₁-C₄, alquilsulfonilo C₁-C₄, alquilsulfonilo C₁-C₄, (alquil C₁-C₄)carbonilo, fenilo o heteroarilo, siendo posible a su vez que los grupos fenilo y heteroarilo estén mono, di o trisustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi C₁-C₄, halógeno, hidroxilo, ciano, hidroxicarbonilo, (alcoxi C₁-C₄)carbonilo, alquilsulfonilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄, donde los sustituyentes del nitrógeno en el anillo heterocíclico no son halógeno; o

20

R^a y R^b juntos forman un anillo carbocíclico de 3 a 5 miembros que puede estar sustituido con alquilo C₁-C₄ y puede estar interrumpido por oxígeno, azufre, S(O), SO₂, OC(O), NR^g o por C(O); o

25

R^a y R^c juntos forman una cadena de alquilenos C₁-C₃ que puede estar interrumpida por oxígeno, azufre, SO, SO₂, OC(O), NR^h o por C(O); siendo posible a su vez que la cadena de alquilenos C₁-C₃ esté sustituida con alquilo C₁-C₄;

R^g y R^h son cada uno independientemente el uno del otro alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, alquilsulfonilo C₁-C₄, (alquil C₁-C₄)carbonilo o (alcoxi C₁-C₄)carbonilo;

30

Rⁱ es alquilo C₁-C₄;

R^j se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₄ y cicloalquilo C₃-C₆;

R³ se selecciona el grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, sustituido opcionalmente con halógeno y/o alcoxi C₁-C₃, y cicloalquilo C₃-C₆ sustituido opcionalmente con halógeno y/o alcoxi C₁-C₃;

R⁹ se selecciona del grupo que consiste en ciclopropilo, CF₃ e i.-Pr;

R¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, I, Br, SR¹¹, S(O)R¹¹, S(O)₂R¹¹ y CO₂R¹¹; y

R¹¹ es alquilo C₁₋₄.

Con relación a las estructuras (Ia)-(Im) descritas aquí:

5 Halógeno engloba flúor, cloro, bromo o yodo. En consecuencia lo mismo es aplicable a halógeno en el contexto de otras definiciones tales como haloalquilo o halofenilo.

Los grupos haloalquilo que tienen una longitud de cadena de 1 a 6 átomos de carbono son, por ejemplo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 2-fluoroetilo, 2-cloroetilo, pentafluoroetilo, 1,1-difluoro-2,2,2-tricloroetilo, 2,2,3,3-tetrafluoroetilo y 2,2,2-tricloroetilo, heptafluoro-*n*-propilo y perfluoro-*n*-hexilo.

10 Los radicales alquilenilo adecuados incluyen, por ejemplo, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH(C₂H₅).

15 Los radicales haloalqueno adecuados incluyen grupos alqueno sustituidos una o más veces con halógeno, donde el halógeno es flúor, cloro, bromo o yodo y, especialmente, fluoro o cloro, por ejemplo, 2,2-difluoro-1-metilvinilo, 3-fluoropropenilo, 3-cloropropenilo, 3-bromopropenilo, 2,3,3-trifluoropropenilo, 2,3,3-tricloropropenilo y 4,4,4-trifluorobut-2-en-1-ilo. Los radicales alqueno C₂-C₆ preferidos sustituidos una, dos o tres veces con halógeno son aquellos que tienen una longitud de cadena de 2 a 5 átomos de carbono. Los radicales haloalquilalqueno adecuados incluyen, por ejemplo, grupos alquilalqueno sustituidos una o más veces con halógeno, donde el halógeno es bromo o yodo y, especialmente, fluoro o cloro, por ejemplo, 3-fluoropropinilo, 5-cloropent-2-in-1-ilo, 5-bromopent-2-in-1-ilo, 3,3,3-trifluoropropinilo y 4,4,4-trifluoro-but-2-in-1-ilo. Los grupos alquilalqueno preferidos sustituidos una o más veces con halógeno son aquellos que tienen una longitud de cadena de 3 a 5 átomos de carbono.

20 Los grupos alcoxi tienen preferiblemente una longitud de cadena de 1 a 6 átomos de carbono. Un alcoxi es, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi o *tert*-butoxi o un isómero de pentiloxi o hexiloxi, preferiblemente metoxi y etoxi. Un alquilcarbonilo es preferiblemente acetilo o propionilo. Un alcoxycarbonilo es, por ejemplo, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo, isopropoxycarbonilo, *n*-butoxycarbonilo, isobutoxycarbonilo, *sec*-butoxycarbonilo o *tert*-butoxycarbonilo, preferiblemente metoxycarbonilo, etoxycarbonilo o *tert*-butoxycarbonilo.

25 Un haloalcoxi es, por ejemplo, fluorometoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi, 2,2,2-trifluoroetoxi, 1,1,2,2-tetrafluoroetoxi, 2-fluoroetoxi, 2-cloroetoxi, 2,2-difluoroetoxi o 2,2,2-tricloroetoxi, preferiblemente difluorometoxi, 2-cloroetoxi o trifluorometoxi.

30 Los grupos alquiltio tienen preferiblemente una longitud de cadena de 1 a 6 átomos de carbono. Un alquiltio es, por ejemplo, metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, *n*-butiltio, isobutiltio, *sec*-butiltio o *tert*-butiltio, preferiblemente metiltio o etiltio. Un alquilsulfino es, por ejemplo, metilsulfino, etilsulfino, propilsulfino, isopropilsulfino, *n*-butilsulfino, isobutilsulfino, *sec*-butilsulfino o *tert*-butilsulfino, preferiblemente metilsulfino o etilsulfino.

Un alquilsulfonilo es, por ejemplo, metilsulfonilo, etilsulfonilo, propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, *n*-butilsulfonilo, isobutilsulfonilo, *sec*-butilsulfonilo o *tert*-butilsulfonilo, preferiblemente metilsulfonilo o etilsulfonilo.

35 Un alquilamino es, por ejemplo, metilamino, etilamino, *n*-propilamino, isopropilamino o un isómero de butilamino. Dialquilamino es, por ejemplo, dimetilamino, metiletilamino, dietilamino, *n*-propilmetilamino, dibutilamino o diisopropilamino. Se da preferencia a los grupos alquilamino que tienen una longitud de cadena de 1 a 4 átomos de carbono.

Un cicloalquilamino o dicicloalquilamino es, por ejemplo, ciclohexilamino o dicitlopropilamino.

40 Los grupos alcoxialquilo tienen preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Un alcoxialquilo es, por ejemplo, metoximetilo, metoxietilo, etoximetilo, etoxietilo, *n*-propoximetilo, *n*-propoxietilo, isopropoximetilo o isopropoxietilo.

Los grupos alquiltioalquilo tienen preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Un alquiltioalquilo es, por ejemplo, metiltiomietilo, metiltioetilo, etiltiomietilo, etiltioetilo, *n*-propiltiomietilo, *n*-propiltioetilo, isopropiltiomietilo, isopropiltioetilo, butiltiomietilo, butiltioetilo o butiltiobutilo.

45 Los grupos cicloalquilo tienen preferentemente de 3 a 6 átomos de carbono anulares y pueden estar sustituidos con uno o más grupos metilo; preferiblemente no están sustituidos, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

50 El fenilo, incluido el fenilo como parte de un sustituyente tal como fenoxi, bencilo, benciloxi, benzoilo, feniltio, fenilalquilo, fenoxialquilo o tosilo, puede estar en una forma mono o polisustituida, en cuyo caso los sustituyentes podrán estar, según se desee, en la posición o posiciones *orto*, *meta* y/o *para*.

El heterocíclico incluye, por ejemplo, morfolinilo y tetrahidrofurilo.

El heteroarilo, incluido el heteroarilo como parte de un sustituyente tal como heteroariloxi, se refiere a un heteroarilo de cinco o seis miembros que contiene de uno a tres heteroátomos, donde cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Se debe sobreentender que el componente heteroarilo puede estar opcionalmente mono o polisustituido. Por lo tanto, el término heteroarilo incluye, por ejemplo, furanilo, tiofenilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo y triazolilo.

Los compuestos de fórmula Ij pueden contener centros asimétricos y pueden estar presentes como un único enantiómero, parejas de enantiómeros en cualquier proporción o, cuando esté presente más de un centro asimétrico, contener diastereoisómeros en todas las proporciones posibles. Normalmente, uno de los enantiómeros tiene una mayor actividad biológica en comparación con las otras posibilidades.

De manera similar, cuando haya alquenos disustituídos, estos podrán estar presentes en la forma *E* o *Z* o como mezclas de ambos en cualquier proporción.

Además, los compuestos de fórmula Ij que comprenden Q1, Q5, Q6 o Q7 o cuando R¹ es hidrógeno pueden estar en equilibrio con formas tautoméricas alternativas con hidroxilo. Se debe sobreentender que todas las formas tautoméricas (único tautómero o mezclas de los mismos), mezclas racémicas e isómeros únicos están incluidos en el alcance de la presente invención.

El experto también comprenderá que si n es 1 en relación con la fórmula Ij para formar el *N*-óxido, entonces el nitrógeno y el oxígeno estarán cargados como corresponde (N⁺ O⁻).

En un aspecto preferido de la presente divulgación, X² es oxígeno.

En otro aspecto preferido, R¹ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₃)-(alquilo C₁-C₃), (alcoxi C₁-C₃)-(alcoxi C₂-C₃)-(alquilo C₁-C₃), haloalquilo C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₃)-(haloalquilo C₁-C₃) y fenilo.

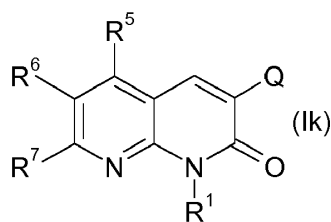
En otro aspecto preferido, R¹ es arilo, preferentemente fenilo, o un heteroarilo de 5 o 6 miembros que contiene de uno a tres heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre y donde el arilo o heteroarilo puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₃, haloalcoxi C₁-C₃, (alquil C₁-C₆)-S(O)p-, (haloalquil C₁-C₆)-S(O)p-, ciano y nitro.

En otro aspecto preferido, R⁵ es hidrógeno.

En otro aspecto preferido, R⁶ es hidrógeno o fluoro.

En otro aspecto preferido R^j se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y ciclopropilo.

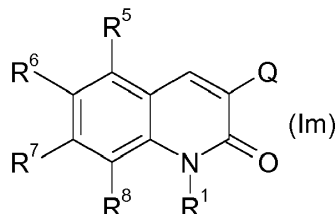
En otro aspecto preferido, el compuesto herbicida es de fórmula (Ik):



En un aspecto más preferido de la presente divulgación, el compuesto herbicida es de fórmula (Ik) donde Q es Q1, en particular donde A¹ es CR^aR^f y donde R^a, R^b, R^c, R^d, R^e y R^f son hidrógeno y donde q = 1. En otra realización preferida de la presente invención, Q es Q1, donde A¹ es CR^aR^f y donde R^b, R^d, R^e y R^f son hidrógeno, R^a y R^c forman juntos una cadena de etileno y donde q = 1.

En otro aspecto preferido, cuando el compuesto herbicida es de fórmula (Ik) y donde R⁷ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alquilo C₁-C₆), (alcoxi C₁-C₆)-(alcoxi C₂-C₆)-(alquilo C₁-C₆), alquilamino C₁-C₆, dialquilamino C₁-C₆, alquenilamino C₂-C₆, (alcoxi C₁-C₆)-(alquilamino C₂-C₃), [(alcoxi C₁-C₆)-(alquil C₂-C₄)]-(alquilamino C₁-C₆), cicloalquilamino C₃-C₆, cicloalquilamino C₃-C₆, (alcoxi C₁-C₃)-(cicloalquilamino C₃-C₆), alquilamino C₃-C₆ y grupo dialquilamino en el cual los sustituyentes se unen para formar un anillo de 4-6 miembros, que contiene opcionalmente oxígeno y/o está sustituido opcionalmente con alcoxi C₁-C₃ y/o halógeno, especialmente flúor. En una realización aún más preferida, R⁷ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, cloro, metilo, etilo, 1-metiletilo, ciclopropilo, fluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 1-fluoro-1-metiletilo, 2,2,2-trifluoroetilo, difluoroclorometilo, metoxi, etoxi, metoximetilo, 1-metoxietilo, 2-metoxietoxi, 2-metoxietoximetilo, (2-metoxietil)amino y (2-metoxietil)metilamino.

En otro aspecto preferido, el compuesto herbicida es de fórmula (Im):



En otro aspecto preferido de la presente divulgación, el compuesto herbicida es de fórmula (Im), donde Q es Q1, en particular donde A¹ es CR^eR^f y donde R^a, R^b, R^c, R^d, R^e y R^f son hidrógeno, y donde q = 1. En otro aspecto preferido de la presente divulgación, Q es Q1, donde A¹ es CR^eR^f y donde R^b, R^d, R^e y R^f son hidrógeno, R^a y R^c juntos forman una cadena de etileno y donde q = 1.

En otro aspecto preferido donde el compuesto herbicida es de fórmula (Im) y donde R⁷ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, ciano, halógeno, nitro, haloalquilo C₁-C₆, (alcoxi C₁-C₃)-(haloalquilo C₁-C₃), (alcoxi C₁-C₃)-(alcoxi C₂-C₆)-(haloalquilo C₁-C₃), haloalcoxi C₁-C₆, (alquil C₁-C₆)-S(O)_p, (cicloalquil C₃-C₆)-S(O)_p, (haloalquil C₁-C₆)-S(O)_p, (halocicloalquil C₃-C₆)-S(O)_p, aril-S(O)_p y heteroaril-S(O)_p. En un aspecto aún más preferido, R⁷ se selecciona del grupo que consiste en cloro, fluoro, ciano, nitro, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1-fluoro-1-metiletilo, difluoroclorometilo, difluorometoxi, trifluorometoxi, 1,1-difluoroetoxi, metilsulfinilo, metilsulfonilo, etilsulfinilo, etilsulfonilo, fenilsulfinilo y fenilsulfonilo.

En aspectos preferidos adicionales, los compuestos herbicidas de HPPD son compuestos bicíclicos tal como se describe en WO2009/016841.

En un aspecto particular, el inhibidor de HPPD se selecciona del grupo que consiste en benzobicyclón, mesotriona, sulcotriona, tefuriltriona, tembotriona, 4-hidroxi-3-[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona, cetospiradox o el ácido libre del mismo, benzofenap, pirasulfotol, pirazolinato, pirazoxifeno, topamezona, [2-cloro-3-(2-metoxietoxi)-4-(metilsulfonyl)fenil](1-etil-5-hidroxi-1H-pirazol-4-il)metanona, (2,3-dihidro-3,3,4-trimetil-1,1-dioxidobenzo[b]tien-5-il)(5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona, isoxaclortol, isoxaflutol, α-(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonyl)-β-oxo-4-cloro-bencenopropanonitrilo y α-(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonyl)-β-oxo-4-(trifluorometil)bencenopropanonitrilo.

En la técnica existe sobrada constancia de otros inhibidores de HPPD y se pueden utilizar en los métodos de la presente divulgación, incluidos inhibidores de HPPD que tienen los siguientes números de registro de Chemical Abstracts: benzobicyclón (CAS RN 156963-66-5), mesotriona (CAS RN 104206-82-8), sulcotriona (CAS RN 99105-77-8), tefuriltriona (CAS RN 473278-76-1), tembotriona (CAS RN 335104-84-2), 4-hidroxi-3-[[2-(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]carbonil]biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona (CAS RN 352010-68-5), cetospiradox (CAS RN 192708-91-1) o su ácido libre (CAS RN 187270-87-7), benzofenap (CAS RN 82692-44-2), pirasulfotol (CAS RN 365400-11-9), pirazolinato (CAS RN 58011-68-0), pirazoxifeno (CAS RN 71561-11-0), topamezona (CAS RN 210631-68-8), [2-cloro-3-(2-metoxietoxi)-4-(metilsulfonyl)fenil](1-etil-5-hidroxi-1H-pirazol-4-il)metanona (CAS RN 128133-27-7), (2,3-dihidro-3,3,4-trimetil-1,1-dioxidobenzo[b]tien-5-il)(5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona (CAS RN 345363-97-5), isoxaclortol (CAS RN 141112-06-3), isoxaflutol (CAS RN 141112-29-0), α-(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonyl)-β-oxo-4-clorobencenopropanonitrilo (CAS RN 143701-66-0) y α-(ciclopropilcarbonil)-2-(metilsulfonyl)-β-oxo-4-(trifluorometil)bencenopropanonitrilo (CAS RN 143701-75-1).

El nivel de expresión de HPPD mutante debería ser suficiente para reducir sustancialmente (respecto a plantas tratadas de la misma manera pero que carecen transgenes de HPPD mutante) el nivel de residuo del herbicida original en todo el tejido de la planta. Obviamente, un experto en la técnica comprenderá que ciertas enzimas de HPPD mutantes pueden conferir resistencia a ciertos subgrupos de química de HPPD y una enzima puede que no proporcione resistencia a todas las HPPD.

Métodos de uso

La presente divulgación también proporciona un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus, que comprende plantas de cosechas y malas hierbas, en el que las plantas se obtienen por cualquiera de los métodos de la actual invención descritos anteriormente, en el que el método comprende la aplicación al locus de una cantidad controladora de malas hierbas de uno o más herbicidas. En estos métodos de invención se puede usar cualquiera de las plantas transgénicas descritas aquí. El término "locus" puede incluir suelo, semillas, y plántulas, así como una vegetación establecida. Los herbicidas se pueden aplicar adecuadamente preemergencia o posemergencia de la cosecha o malas hierbas.

La expresión "cantidad controladora de malas hierbas" quiere incluir funcionalmente una cantidad de herbicida que es capaz de afectar al crecimiento o desarrollo de una mala hierba. De este modo, la cantidad puede ser suficientemente pequeña para simplemente retrasar o suprimir el crecimiento o desarrollo de una mala hierba dada, o la cantidad puede ser suficientemente grande para destruir irreversiblemente una mala hierba dada.

De este modo, la presente divulgación proporciona un método para controlar malas hierbas en un locus, que comprende aplicar al locus una cantidad controladora de malas hierbas de uno o más herbicidas, en el que el locus comprende una planta transgénica que se ha transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas de HPPD, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. En una realización, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a un herbicida, incluyendo, por ejemplo, herbicidas seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HPPD, glifosato y glufosinato. En otra realización, el locus comprende una planta transgénica que se ha transformado con cualquier combinación de moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, incluyendo una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que confiere resistencia o tolerancia a un herbicida, en combinación con al menos una, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona plantas transgénicas y métodos útiles para el control de especies vegetales indeseadas en campos de cosechas, en los que las plantas de cosechas se hacen resistentes a la química de HPPD mediante transformación para expresar genes que codifican polipéptidos de HPPD mutantes, y en los que se aplica un herbicida de HPPD como una aplicación desde la parte superior en cantidades capaces de exterminar o alterar el crecimiento de especies vegetales indeseadas (especies de malas hierbas, o, por ejemplo, plantas de cosechas sobrantes o "maleza" o "espontánea" en un campo de plantas de cosecha deseables). La aplicación puede ser pre- o post-emergencia de las plantas de la cosecha o de la especie indeseada, y se puede combinar con la aplicación de otros herbicidas a los que la cosecha es tolerante de forma natural, o a los que es resistente vía la expresión de uno o más transgenes distintos de resistencia a herbicidas. Véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud U.S. n° 2004/0058427 y la Publicación de Solicitud PCT n° WO 98/20144.

En otro aspecto, la divulgación también se refiere a un método para proteger plantas de cosecha de la lesión herbicida. En el cultivo de plantas de cosecha, especialmente a escala comercial, la rotación correcta de la cosecha es crucialmente importante para la estabilidad del rendimiento (el logro de rendimientos elevados de buena calidad a lo largo de un período prolongado) y para el éxito económico de un negocio agronómico. Por ejemplo, a lo largo de grandes áreas de las principales regiones de los Estados Unidos donde se hace crecer el maíz (el "cinturón de maíz central"), se hace crecer soja como la cosecha subsiguiente al maíz, en alrededor de un 75% de los casos. El control selectivo de las malas hierbas en cosechas de maíz está siendo llevado a cabo cada vez más usando herbicidas inhibidores de HPPD. Aunque esa clase de herbicidas tiene excelente idoneidad para ese fin, puede dar como resultado daño fitotóxico agrónomicamente inaceptable a las plantas de la cosecha en las cosechas subsiguientes (daño "residual"). Por ejemplo, ciertas variedades de soja son sensibles a restos incluso muy pequeños de tales herbicidas inhibidores de HPPD. En consecuencia, las plantas resistentes o tolerantes a herbicidas de la invención también son útiles para plantarlas en un locus de cualquier remanente a corto plazo de herbicida procedente de una aplicación previa (*por ejemplo*, plantando una planta transgénica de la invención en el año siguiente a la aplicación de un herbicida, para reducir el riesgo de daño procedente de restos de suelo del herbicida).

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no a modo limitante.

Ejemplos

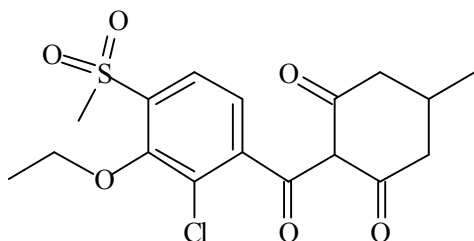
Ejemplo 1. Clonación, expresión y ensayo de SEC ID NO: 14 de HPPD derivada de *Avena*, y determinación de los valores de k_{cat} , K_{mHPPD} y K_i (kon y koff) frente a diversos herbicidas de HPPD.

La secuencia de ADN (SEC ID NO: 1) sintetizada mediante GeneArt (Regensburg, Alemania) que codifica una HPPD derivada de *Avena sativa* (SEC ID NO: 14), se clonó en pET24a y se expresó en *E. coli* BL21(DE3) con selección de 50 µg/ml de canamicina como se describe en la Publicación de la Solicitud PCT n° WO 02/46387. Los cultivos nocturnos que se hicieron crecer a 30°C se usaron para inocular 3 x 1 litro de LB en matraces de agitación, a una relación 1:100. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C, 220 rpm, hasta que se alcanzó una A^{600nm} de 0,6-0,8. La temperatura se redujo hasta 15°C, y se indujo con 0,1 mM de IPTG. Los cultivos se hicieron crecer toda la noche, y las células se cosecharon después de centrifugar durante 15 minutos a 10.000 g. Las células se almacenaron a -20°C hasta la extracción. Un pelete celular procedente de 3 litros de cultivo en matraz de agitación (~12 g) se descongeló en tampón de extracción (50 mM de Tris, 10 de mM ascorbato de sodio, 2 mM de DTT, 2 mM de AEBSF, 10 µM de inhibidor de tripsina, 1 mM de EDTA, pH 7,66) a una relación de 1 ml de tampón:1 g de pasta celular. El extracto se hizo pasar a través del destructor celular a 30.000 psi, y se centrifugó a 50.000 g durante 25 minutos a 4°C. Opcionalmente el extracto se intercambia de tampón en Sepadex G25. Los sobrenadantes se colocaron en perlas en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C. Los niveles de expresión de HPPD se estimaron mediante análisis de transferencia Western, usando como patrón *Avena* purificada (1-10 ng). Los extractos se diluyeron 1:6000, y se cargaron 1-10 µl sobre 12% de SDS PAGE. Además, la expresión se cuantificó comparando SDS PAGE inducido y no inducido con tinción de COOMASSIE® (Imperial Chemicals Industries, Ltd., Londres UK). Los geles se transfirieron sobre membranas de PVDF, y se llevaron a cabo transferencias Western usando suero anti-HPPD de trigo de conejo (1:6600) como anticuerpo primario, y anticuerpos enlazados a FITC anti-conejo de cabra (1:600) como secundario. La detección de las bandas se llevó a cabo haciendo un barrido en un Fluorimager™ 595 (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cuantificación de los picos se llevó a cabo usando

ImageQuant™ (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK). El ADN plasmídico se volvió a aislar de todas las cepas transformadas, y se confirmó la secuencia de ADN a lo largo de la región codificante.

Por Western, se estimó que el nivel de expresión del polipéptido de SEC ID NO: 14 expresado en el extracto de *E. coli* era alrededor de un 10-14 mg/ml de una concentración total de proteína soluble de 33,5 mg/ml.

- 5 La concentración de HPPD activa en el extracto también se estimó de forma más exacta mediante titulación de sitios activos. Por ejemplo, se añadió un intervalo de volúmenes de extracto (típicamente 0-20 μ l) a 50 mM de tampón de BisTrisPropano, a pH 7,0 y a 25°C, que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 μ g/ml de catalasa bovina y 3 nmoles de compuesto de Estructura A marcado con 14 C (1,81 GBq/mmol), en un volumen de ensayo final total de 425 μ l.



Estructura A

- 10 La reacción de unión de proteína radiomarcada se extinguió después de 3 minutos mediante adición de 100 μ l de 1 mM de Estructura A "fría". La proteína se intercambió en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1M de KCl mediante cromatografía rápida en una columna NAP5 G25 Sephadex (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y 14 C unido a las fracciones proteicas se midió en un líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). La concentración de sitio de unión de HPPD en el extracto se calculó a partir de la titulación como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente PCT n° WO 02/46387, y se estimó como 94,9, 78,3, y 82,3 (media 85,2) μ M en un extracto, y 47,2 μ M en otro ejemplo.

- 20 En un método alternativo, se calculó el título del sitio activo en función de un ensayo de titulación basado en la actividad que se llevó a cabo preincubando varias relaciones de extracto y soluciones de la estructura A con el fin de lograr una valoración exacta del sitio activo; después se diluyó rápidamente en la solución del ensayo que contenía pHPP 100-200 μ M para su ensayo inmediato cuantificando por HPLC/UV la formación del homogentisato después de 30-40 s (es decir, un tiempo lo suficientemente corto para que no se produzca una asociación y disociación significativa del inhibidor en la escala temporal del ensayo) tal como se describe a continuación.

- 25 Los valores de K_{mHPP} y k_{cat} de la HPPD expresada se estimaron basándose en los ensayos llevados a cabo a 25°C en disolución de 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 μ g/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO), y un intervalo de concentraciones (típicamente 0,5x-10x K_m) de 4-hidroxifenilpiruvato. Típicamente, los ensayos en un volumen final de 110 μ l se iniciaron con la adición de enzima, y se detuvieron de forma exacta después de 20, o preferiblemente 10 ó 15 segundos, con adición mezclada en remolinos de 20 μ l de ácido perclórico al 25%. La disolución de ensayo se transfirió a viales de Chromacol 03-CVG HPLC, se cerraron herméticamente, y la cantidad de homogentisato formada en una alícuota de 40 μ l se determinó mediante inyección en una columna de HPLC Aqua C18 5 μ 75 x 4,6 mm HPLC de fase inversa que corre con 5,5% de acetonitrilo 0,1% de TFA (Tampón A) a 1,5 ml/min. La columna se eluyó a 1,5 ml/minuto usando un lavado de 2 minutos en tampón A, seguido de un lavado de 2 minutos en una mezcla 30/70 de tampón A y 100% de acetonitrilo, y un lavado adicional de 3,5 minutos en tampón A. La elución de homogentisato se monitorizó mediante UV a 292 nm, y la cantidad formada en cada reacción se cuantificó comparando con una curva de calibración patrón.

- 35 Los valores de K_m y V_{max} se determinaron (por ejemplo Figura 1) usando un ajuste de mínimos cuadrados no lineal usando el software Grafit 4™ (Erithacus Software, Middlesex, UK). Los valores de k_{cat} se determinaron dividiendo la velocidad máxima, V_{max} , expresada en nmoles/segundo, entre el número de nmoles de enzima HPPD (basado en la concentración determinada mediante titulación de sitios activos).

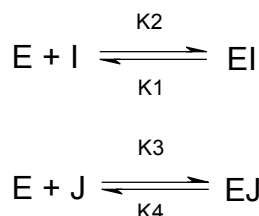
- 40 A partir de un conjunto de experimentos separados similares a aquellos que produjeron los datos mostrados en la Figura 1, en un extracto de SEC ID NO: 14 de HPPD se estimó el valor de K_m como 6,17, 4,51, 6,09, 6,13, 4,37, 4,62, 5,41, 5,13 y 6 μ M (K_m media = 5,38 μ M). Los valores de k_{cat} correspondientes fueron 4,92, 6,25, 7,08, 6,26, 5,5, 6,77, 6,89, 7,12 y 7,39 s^{-1} (k_{cat} media = 6,46 s^{-1}). Obsérvese que para este cálculo, y de forma estándar aquí, Mr se tomó como ~94 kD, y se supuso un sitio activo por dímero (es decir, la mitad de actividad de los sitios así como la unión del inhibidor; véanse Garcia *et al.* (2000) *Biochemistry*, 39:7501-7507; Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD) – The Herbicide Target". En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220). Si se hubiera aceptado la suposición alternativa de un sitio activo por monómero, entonces los valores calculados de k_{cat} , en consecuencia, se habrían dividido a la mitad.

- 50 Las velocidades de asociación (gobernadas por una constante de velocidad de asociación, k_{on}) para la formación de los complejos de enzima:inhibidor, E_i y velocidades de disociación (gobernadas por una constante de velocidad de

disociación, k_{off}) se determinaron por métodos conocidos en la técnica y esencialmente como se describe en Hawkes *et al.* (2001) *Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds*, 2:563-568 y en la Publicación de Solicitud de Patente PCT nº WO 02/46387).

5 Por ejemplo, las velocidades de asociación se midieron, a tiempo cero, añadiendo ~60 pmoles de HPPD a 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO) y un exceso (~300 pmoles) de ¹⁴C-inhibidor en un volumen de ensayo total de 425 µl, y, a diversos puntos de tiempo (0-180 s), extinguiendo la reacción de unión del radiomarcador mediante adición y
 10 mezclamiento rápido de 100 µl de estructura A "fría" 1 mM. Las muestras de proteína extinguidas a diferentes tiempos se intercambiaron entonces en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1 M de KCl mediante cromatografía rápida a través de una columna NAP5 G25 Sephadex (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cantidad de ¹⁴C unido a las fracciones proteicas se cuantificó en un líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Los datos se ajustaron según el esquema más abajo, a fin de derivar el valor de la constante de velocidad aparente de segundo orden, k_2 , que gobierna la
 15 velocidad de asociación de la enzima y el inhibidor radiomarcado. Se usó un intervalo de concentraciones de enzima y de inhibidor. Opcionalmente, la constante de velocidad se puede obtener a partir de experimentos similares en los que la enzima (a ~0,05-0,2 µM de sitios de unión) y, en este caso, inhibidor sin marcar (a ~0,5 a 2 µM) se hacen reaccionar durante un intervalo de tiempos cortos (0-60 s) en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO), y entonces se
 20 extinguió mediante dilución rápida en disolución de ensayo que contiene 100-200 µM de HPP para el ensayo inmediato mediante cuantificación por HPLC/UV de la formación de homogentisato después de 30-40 s (*es decir*, un tiempo suficientemente corto de manera que la disociación y asociación del inhibidor no se produce significativamente en la escala de tiempo del ensayo) como se describe anteriormente. Otros métodos ejemplares se describen en la Publicación de Solicitud de Patente PCT nº WO 02/46387.

25 Las velocidades de disociación (k_1 en el esquema más abajo) se obtuvieron a partir de estudios de velocidad de intercambio, en los que el inhibidor de ensayo, I, o su pareja de intercambio, J, se radiomarcaron, y los datos se ajustaron según el esquema más abajo. Como se señala en Hawkes *et al.* (2001) *Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds*, 2:563-568, las preparaciones de HPPD parecen típicamente contener un 15-30% de una fracción que se intercambia más rápidamente (unión más débil) de sitios de unión al inhibidor. Esta puede ser una forma ligeramente dañada de la enzima (mantiene la actividad catalítica y puede que tenga una K_m para el sustrato más elevada) y,
 30 excepto cuando las velocidades de disociación son tan elevadas que las fracciones que se intercambian de manera rápida y lenta son indistinguibles, las velocidades de disociación se refieren siempre al comportamiento de la fracción principal que se intercambia de manera más lenta, que representa el 70-85% de la masa de los sitios de unión al inhibidor de HPPD presentes en los extractos ensayados.



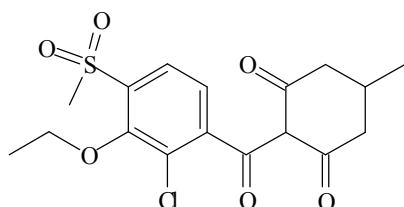
35 Las velocidades de disociación se determinaron preincubando, por ejemplo, ~200 pmoles de sitios de unión a HPPD (determinados como se describe anteriormente mediante titulación de los sitios activos en una reacción de 3 min. con la estructura A) en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO) que contiene ~1,0 nmoles de ¹⁴C inhibidor a 25°C en un volumen de ensayo total de 1,3 ml. Después de 30 minutos, se inició la reacción de intercambio con adición de 100
 40 µl de 1 mM de estructura A "fría" con mezclamiento a conciencia, e, inmediatamente, se extrajeron 150 µl y se cargaron en una columna NAP5, la proteína se intercambió en 50 mM de tampón de 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1 M de KCl mediante cromatografía rápida (< 2 min.) a través de una columna NAP5 G25 Sephadex (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cantidad de ¹⁴C unido a proteína se midió mediante líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Se retiraron alícuotas adicionales y se midieron de la misma manera a diversos tiempos durante
 45 minutos u horas según se requiere, a fin de determinar la cinética de intercambio.

En una variante del método útil para distinguir mejor entre velocidades de disociación que fueron relativamente rápidas (*por ejemplo*, en las que $t_{1/2} < 15$ min. a 25°C), la temperatura del experimento se redujo desde 25°C hasta
 50 la temperatura del hielo. En este caso, las velocidades de disociación se determinaron preincubando ~200 pmoles de HPPD en tampón de reacción (50 mM de BTP pH 7, 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina, y 10% de glicerol) que contiene ~1,0 nmoles de ¹⁴C inhibidor a 25°C en un volumen de ensayo total de 1,3 ml. Después de 30 minutos, la vasija de reacción se transfirió a hielo. Después de otros 10 minutos a temperatura del hielo, se inició la reacción de intercambio mediante adición de 100 µl de 1 mM de Estructura A, con mezclamiento a

conciencia, y se extrajeron 150 μl y se cargaron en una columna NAP5 en una habitación fría a $\sim 5\text{-}8^\circ\text{C}$, a fin de cuantificar la cantidad de radiomarcador que queda unido a la proteína a diversos tiempos desde el comienzo de intercambio a la temperatura del hielo.

- 5 Las velocidades de disociación (k_1) de los inhibidores de HPPD que no se pueden radiomarcarse o que presentan otros problemas de medición (por ejemplo niveles elevados de unión no específica a proteína de fondo, que se puede medir como unión del radiomarcador que persiste en presencia de concentraciones elevadas de inhibidor "frío") se pueden medir indirectamente. En este caso, primero se forma el complejo enzimático ($\sim 0,1\text{-}0,2 \mu\text{M}$) con el inhibidor sin marcar, y después se obtuvo la cinética de intercambio ahuyentándolo con una concentración elevada de estructura A marcada con ^{14}C y monitorizando la velocidad a la cual el marcador se une a la proteína. La estructura A es un inhibidor particularmente potente con cinética conocida y en un exceso de 20 veces o más, ocupará, en el equilibrio, $>95\%$ de los sitios de unión en la competición de intercambio con los otros inhibidores ensayados aquí, y de hecho con la mayoría de los otros inhibidores (los expertos en la técnica diseñarán por supuesto las concentraciones del experimento/relativas y ajustarán los datos en consecuencia). Los métodos ejemplares también se describen en la Publicación de Solicitud de Patente PCT n° WO 02/46387.
- 15 Los datos de velocidades de asociación y de disociación ejemplares (y los valores de k_i derivados) se obtuvieron para la SEC ID NO: 11 de HPPD derivada de *Avena* para los siguientes compuestos como se indica.

Estructura A (^{14}C a 1,81 GBq/mmol)



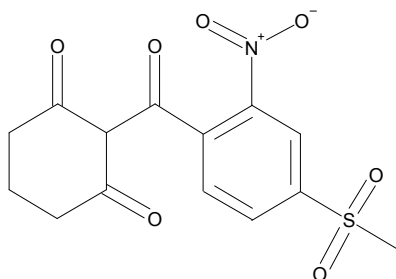
Velocidad de disociación ($k_1 = 1,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$). 25°C , método radioquímico directo.

- 20 Velocidad de disociación ($k_2 = 8,50 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). 25°C , método radioquímico directo.

$K_d = 1,96\text{E-}10 \text{ M}$.

Relación $K_d/ K_m = 0,000036$

Estructura B (^{14}C a 1,425GBq/mmol)

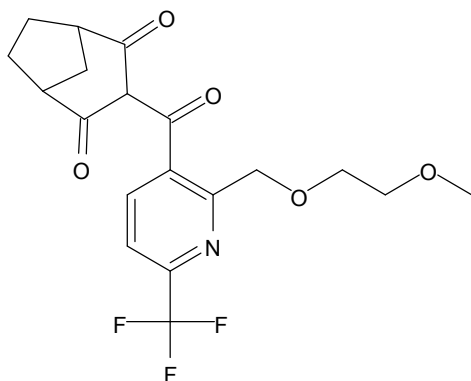


- 25 Velocidad de disociación k_1 (media) = $8,1 \text{ E-}04 \text{ s}^{-1}$ a 25°C (los experimentos individuales produjeron $k_1 = 8,00 \text{ E} - 04$, $8,88 \text{ E} - 04$, $7,50 \text{ E} - 04$ y $8,00\text{E} -04$, según se determina mediante el método radioquímico directo). Medida a temperatura de hielo $k_1 = 1,21 \text{ E-} 05 \text{ s}^{-1}$ (los experimentos individuales produjeron $1,16 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$, $1,0 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$, $1,2 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$, $1,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ mediante el método radioquímico directo).

- 30 La velocidad de asociación k_2 (media) $6,7 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 25°C (los experimentos individuales produjeron $k_2 = 6,35 \text{ E} + 04$, $7,50 \text{ E} + 04$, $6,2 \text{ E} + 04$ según se determina mediante el método radioquímico directo). Para mesotriona, que tiene una velocidad de disociación relativamente rápida, los estimados para la velocidad de asociación basándose en el método a base de actividad fueron más variables, oscilando desde $4,2 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $4,9 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ hasta $7,5 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 25°C .

- 35 K_d se estimó así a partir del dato radioquímico como $1,16 \text{ E} -08 \text{ M}$, que corresponde a una relación K_d/ K_m de 0,00217.

Estructura C (^{14}C a 0,774 GBq/mmol)



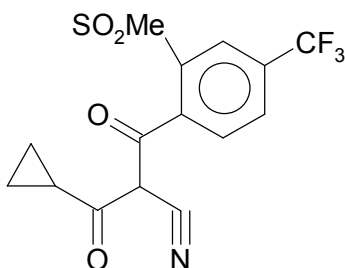
Velocidad de disociación k_1 (media) = $7,04 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ a 25°C (Los experimentos individuales dieron $k_1 = 7,80 \text{ E} - 05$, $9,17 \text{ E} - 05$, $4,5 \text{ E} - 05$, $6 \text{ E} - 05$, $7 \text{ E} - 05$ y $7,80 \text{ E} - 05$ según se estimó mediante el método radioquímico indirecto).

- 5 Velocidad de asociación k_2 $7,50 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 25°C según se estimó mediante el método radioquímico directo, está muy de acuerdo con los estimados a partir del método a base de actividad enzimática de $7,50 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $7,80 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $7,60 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $7,20 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $1,0 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 25°C .

Basándose en el método radioquímico, el estimado de $K_d = 9,4 \text{ E} - 09 \text{ M}$.

Por lo tanto, el estimado de la relación K_d/K_m es entonces = $0,0017$.

Estructura D (^{14}C a $1,036 \text{ GBq/mmol}$)



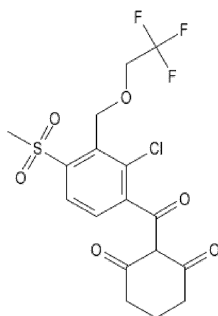
- 10 Velocidad de disociación $k_1 = 3,96 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ a 25°C según se determina usando el método radioquímico directo (mediciones individuales de $4,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ y $3,75 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$).

- 15 Velocidad de asociación $k_2 = 3,20 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C según se determina mediante el método radioquímico directo. Esto está bastante de acuerdo con los estimados procedentes del método a base de actividad para una velocidad de disociación de $3,20 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $5,7 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Basado en los métodos radioquímicos, el estimado de $K_d = 1,23 \text{ E} - 9 \text{ M}$.

El estimado de la relación $K_d/K_m = 0,00023$.

Estructura E



- 20 Velocidad de disociación $k_1 = 4,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ a 25°C según se determina mediante el método radioquímico indirecto (mediciones individuales de $5,50 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ y $2,85 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$).

Velocidad de asociación $k_2 = 1,30 \text{ E} + 05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C según se determina mediante el método no radioquímico directo.

El estimado de $K_d = 3,21 \text{ E} - 10 \text{ M}$

El estimado de la relación $K_d / K_m = 0,000059$.

- 5 **Ejemplo 2.** Clonación, expresión y ensayo de variantes adicionales de las SEC ID NOs: 12-20 de las HPPD derivadas de *Avena* y determinación de los valores de k_{cat} , K_{mHPP} y K_i (k_{on} y k_{off}) frente a diversos herbicidas de HPPD.

10 Secuencias de ADN, que corresponden a las SEC ID NOs: 2-14, que codifican polipéptidos de HPPD que corresponden a las SEC ID NOs: 15-26 derivadas de *Avena sativa*, se sintetizaron mediante GeneArt (Regensburg, Alemania), se clonaron en pET24a, y se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) con selección con 50 µg/ml de canamicina como se describe en la Pub. Sol. PCT nº WO 02/46387. Las células se hicieron crecer, se prepararon extractos proteicos, y se llevaron a cabo medidas de los títulos de sitios activos de HPPD y cinéticas (de los valores de k_{cat} , K_{mHPP} , k_1 , k_2 y K_i), como se describe en el Ejemplo 1.

En el presente ejemplo, se usaron las siguientes secuencias de HPPD:

- 15 La SEC ID NO: 15 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de A por Q en el motivo de secuencia GVQHIA (residuos 1-6 de SEC ID NO:55).

La SEC ID NO: 16 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de G por Q en el motivo de secuencia GVQHIA (residuos 1-6 de SEC ID NO:55).

- 20 La SEC ID NO: 17 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de S por Q en el motivo de secuencia GVQHIA (residuos 1-6 de SEC ID NO:55).

La SEC ID NO: 18 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de T por I en el motivo de secuencia SSIQTY (residuos 1-6 de SEC ID NO:53).

La SEC ID NO: 19 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de A por I en el motivo de secuencia SSIQTY (residuos 1-6 de SEC ID NO:53).

- 25 La SEC ID NO: 20 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de S por I en el motivo de secuencia SSIQTY (residuos 1-6 de SEC ID NO:53).

La SEC ID NO: 21 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de V por I en el motivo de secuencia SSIQTY (residuos 1-6 de SEC ID NO:53).

- 30 La SEC ID NO: 22 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de M por L en el motivo de secuencia SGLNS (residuos 5-9 de SEC ID NO:43).

La SEC ID NO: 23 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de W for A en el motivo de secuencia FAEFT (residuos 5-9 of SEC ID NO:42).

HPPD SEC ID NO: 24 se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de M por L en el motivo de secuencia G(I,V)LVDRD (SEC ID NO:30).

- 35 La SEC ID NO: 25 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de A por L en el motivo de secuencia G(I,V)LVDR (residuos 1-6 de SEC ID NO:30).

La SEC ID NO: 26 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 14 mediante la sustitución de M por L en el motivo de secuencia G(I,V)LVDR (residuos 1-6 de SEC ID NO:30) y mediante la sustitución de M por L en el motivo de secuencia SGLNS (residuos 5-9 de SEC ID NO:43).

- 40 Se obtuvieron los valores (generalmente determinados radioquímicamente) de k_{on} (k_2), k_{off} (k_1) y K_i (todos a 25 °C) para las HPPD del presente ejemplo frente a varias estructuras del inhibidor tal como se muestra en la Tabla 3. Los valores que se proporcionan para la referencia de SEC ID NO: 14 en la Tabla 3 son los valores promedio de varios experimentos como los descritos anteriormente. Todos los experimentos con las otras HPPD incluyeron medidas contiguas a SEC ID NO: 14 como control comparativo. En los experimentos, las relaciones entre las velocidades de asociación y disociación relativas a este control contiguo fueron reproducibles incluso cuando los valores absolutos variaron en un cierto grado. Por lo tanto, los valores que se proporcionan en la Tabla 3 para las SEC ID NOs: 15-26 de HPPD están normalizados frente a los valores de control promedio para la SEC ID NO: 14 de HPPD de acuerdo con estas relaciones observadas.

Tabla 3. Resumen de los valores de k_{on} , k_{off} y K_d para las variantes de HPPD

Variante de HPPD	Estructura A			Estructura B		
	kon(k2)	koff(k1)	Kd	kon(k2)	koff(k1)	Kd
	/s /M	/s	nM	/s /M	/s	nM
SEC ID NO 14	85000	1,67E -05	0,20	67000	8,10E -04	11,6
SEC ID NO 15	35000	3,33E -05	0,95	70000	8,00E -04	11,4
SEC ID NO 16	ND	ND	ND	53000	2,00E -03	37,7
SEC ID NO 17	ND	ND	ND	53000	1,00E -03	18,9
SEC ID NO 18	42000	1,67E -05	0,40	35000	6,00E -04	17,1
SEC ID NO 19	ND	ND	ND	38000	7,50E -04	19,7
SEC ID NO 20	ND	ND	ND	31500	9,00E -04	28,6
SEC ID NO 21	85000	1,67E -05	0,20	70000	6,00E -04	8,6
SEC ID NO 22	85000	1,08E -05	0,13	70000	1,20E -03	17,1
SEC ID NO 23	85000	2,83E -05	0,33	70000	7,00E -04	10,0
SEC ID NO 24	85000	2,30E -05	0,27	70000	1,57E -03	22,4
SEC ID NO 25	ND	ND	ND	20000	8,00E -04	40,0
SEC ID NO 26	ND	ND	ND	70000	3,00E -03	42,9

Variante de HPPD	Estructura C			Estructura D		
	kon(k2)	koff(k1)	Kd	kon(k2)	koff(k1)	Kd
	/s /M	/s	nM	/s /M	/s	nM
SEC ID NO 14	7500	7,04E -05	9,4	32000	3,96E -05	1,2
SEC ID NO 15	7500	1,13E -04	17,7	ND	2,37E -05	ND
SEC ID NO 16	4500	1,20E -04	26,7	ND	ND	ND
SEC ID NO 17	9400	6,65E -05	7,1	ND	ND	ND
SEC ID NO 18	7500	9,00E -05	11,9	ND	3,96E -05	ND
SEC ID NO 19	7500	6,60E -05	8,9	ND	ND	ND
SEC ID NO 20	10100	6,60E -05	6,6	ND	ND	ND
SEC ID NO 21	7500	9,00E -05	11,9	ND	3,96E -05	ND
SEC ID NO 22	4400	9,00E -05	23,9	ND	2,37E -05	ND
SEC ID NO 23	7500	ND	ND	ND	2,37E -05	ND
SEC ID NO 24	4900	7,82E -05	16,0	32000	9,18E -05	2,9
SEC ID NO 25	4800	1,13E -04	23,0	ND	ND	ND
SEC ID NO 26	ND	9,00E -05	ND	ND	ND	ND

5 Por ejemplo, la velocidad de disociación de la mesotrión (estructura B) de SEC ID NO: 14 de HPPD fue claramente diferente de la de SEC ID NO: 24 (veáanse las Figuras 4A-4C) siendo la bondad del ajuste sensible a cambios pequeños en k_{off} . A partir de estos datos, se puede observar que la mesotrión se disoció alrededor de dos veces más rápido de SEC ID NO: 26 de HPPD que de SEC ID NO: 24 de HPPD, y de SEC ID NO: 24 de HPPD alrededor de dos veces más rápido que de SEC ID NO: 14 de HPPD. Por lo general, las estimaciones absolutas de k_{off} obtenidas de los ajustes a los datos fueron reproducibles en un $\pm 10\%$ y normalmente mejores.

10 Cuando las velocidades de disociación se volvieron relativamente rápidas ($t_{1/2} < 10$ minutos) también fue útil realizar medidas comparativas a la temperatura del hielo con el fin de confirmar de manera más exacta la diferencia entre una HPPD y otra. Por lo tanto, por ejemplo, a temperaturas del hielo, la disociación de la mesotrión de SEC ID NO: 14 de HPPD estuvo gobernada por una constante de velocidad, k_{off} , de $1,16 \text{ E-}05 \text{ s}^{-1}$ (mucho más lenta que el valor de $8,1 \text{ E-}04 \text{ s}^{-1}$ estimado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) mientras que para SEC ID NOS: 22, 24 y 26, las velocidades de disociación correspondientes de la mesotrión a la temperatura del hielo fueron de $2,17 \text{ E-}05 \text{ s}^{-1}$, $2,25 \text{ E-}05 \text{ s}^{-1}$ y $4,17 \text{ E-}05 \text{ s}^{-1}$; estos valores presentan una coherencia proporcionada buena con los de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (véase la Tabla 3).

15 Se extrajeron varias conclusiones de los datos de la Tabla 3. Las propiedades de SEC ID NOS: 15-17 de HPPD indicaron que ciertas sustituciones a asparagina (Q) en la secuencia de aminoácidos GVQHI proporcionaron mejoras significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD en la tolerancia (valores más lentos de k_{on} y/o valores más rápidos de k_{off}) con relación a, por ejemplo, las Estructuras A, B y C.

Los datos de SEC ID NO: 18-21 de HPPD indicaron que ciertas sustituciones a isoleucina (I) en la secuencia de aminoácidos SGIQTY proporcionaron mejoras significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD en la tolerancia (principalmente mediante valores más lentos de k_{on}) con relación a, por ejemplo, las Estructuras A y B.

5 Los datos de SEC ID NO: 22 de HPPD indicaron que ciertas sustituciones a leucina (L) en la secuencia de aminoácidos ESGLN proporcionaron mejoras significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD en la tolerancia (principalmente mediante valores más rápidos de k_{off}) con relación a, por ejemplo, las Estructuras B y C.

Los datos de SEC ID NO: 23 de HPPD indicaron que ciertas sustituciones a alanina (A) en la secuencia de aminoácidos EFAEF proporcionaron mejoras significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD en la tolerancia (principalmente mediante valores más rápidos de k_{off}) con relación a, por ejemplo, la Estructura A.

10 Los datos de SEC ID NOs: 24 y 25 de HPPD indicaron que ciertas sustituciones a leucina (L) en la secuencia de aminoácidos G(I,V)LVDRD proporcionaron mejoras significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD en la tolerancia (mediante valores más rápidos de k_{off} y/o valores más lentos de k_{on}) con relación a, por ejemplo, la Estructura A, la Estructura B, la Estructura C y la Estructura D.

15 Los datos de SEC ID NO: 26 de HPPD indicaron que la combinación de ciertas sustituciones a leucina (L) en la secuencia de aminoácidos ESGLN con ciertas sustituciones a leucina (L) en la secuencia de aminoácidos G(I,V)LVDRD proporcionaron mejoras aún más significativas respecto a SEC ID NO: 14 de HPPD (y sobre y superiores al efecto de cualquiera de los cambios solos) en la tolerancia (principalmente mediante valores más rápidos de k_{off}) con relación a, por ejemplo, la Estructura B.

20 Nuevamente, tal como se describió para el Ejemplo 1, se determinaron los valores de k_{cat} y K_m para varias HPPD de la invención expresadas en extractos y los valores se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de K_m y k_{cat} de varias HPPD

Variante de HPPD	K_m μM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m $\mu M^{-1}s^{-1}$
SEC ID NO: 14	5,38	6,46	1,2
SEC ID NO: 18	35,98	17,94	0,50
SEC ID NO: 21	5,98	5,47	0,91
SEC ID NO: 22	12,43	5,79	0,46
SEC ID NO: 24	4,74	4,35	0,92
SEC ID NO: 26	10,58	4,05	0,38

25 Varias de las variantes de HPPD tuvieron valores de K_m bajos similares a SEC ID NO: 14 de HPPD y valores superiores de k_i/K_m con relación a los diversos herbicidas de HPPD y, por lo tanto, la sobreexpresión en plantas se espera que proporcione una mayor tolerancia a herbicidas respecto a estos herbicidas. Por ejemplo, SEC ID NO: 24 de HPPD fue dos veces más resistente a mesotriona que SEC ID NO: 14 de HPPD ya que mostró una relación de k_i/K_m de 0,0047 en comparación con 0,0021.

30 Además, todas las secuencias anteriores, así como también las colecciones de variantes mutadas en las mismas posiciones de amino que mostraron niveles alterados y mejorados de tolerancia a herbicidas son útiles para ser incluidas en procesos de mutagénesis y barajado con el fin de generar aún más HPPD mutadas y barajadas útiles como transgenes para conferir tolerancia a herbicidas. Por ejemplo, los mutantes divulgados en la Tabla 5 son útiles para generar un polipéptido mutante de HPPD tolerante a herbicidas y para su inclusión en reacciones de recombinación para generar más HPPD.

Tabla 5. Ejemplos de mutaciones útiles en polipéptidos de HPPD tolerantes a herbicidas

Mutación	Región de aminoácidos de SEC ID NO:14
K411L	GGFGKGNFS
K411T	GGFGKGNFS
K411S	GGFGKGNFS
K411M	GGFGKGNFS
K411A	GGFGKGNFS
K411E	GGFGKGNFS
K411V	GGFGKGNFS
M325L	GFEFMAPPQ
L271I	VLLPLNEPV

ES 2 619 279 T3

Mutación	Región de aminoácidos de SEC ID NO:14
L271M	VLLPLNEPV
L271V	VLLPLNEPV
G408A	GGCG G FGKG
G408S	GGCG G FGKG
G408T	GGCG G FGKG
V258M	GLNS V VLAN
V258I	GLNS V VLAN
V258A	GLNS V VLAN
V258K	GLNS V VLAN
V217I	RFDH V VGNV
V217A	RFDH V VGNV
V217M	RFDH V VGNV
V217C	RFDH V VGNV
L271I	VLLPLNEPV
L271M	VLLPLNEPV
L271V	VLLPLNEPV
A326S	FEFM A PPQA
A326K	FEFM A PPQA
A326P	FEFM A PPQA
A326D	FEFM A PPQA
A326R	FEFM A PPQA
A326N	FEFM A PPQA
A326Y	FEFM A PPQA
A326H	FEFM A PPQA
I370V	VLLQIFTKP
Y287F	QIQTYLEYH
G254S	TTES G LNSV
G254A	TTES G LNSV
E416Q	GNFSE L FKS
I339L	GVRRIAGDV
L269M	EAVLLPLNE
L269F	EAVLLPLNE
S420A	ELFK S IEDY
I372S	LQIFTKPVG
Y172V	EVELYGDVV
I299M	GVQHIALAS

Como otro ejemplo, los mutantes divulgados en la Tabla 6 también son útiles para generar un polipéptido mutante de HPPD tolerante a herbicidas y para su inclusión en reacciones de recombinación para generar más HPPD.

Tabla 6. Ejemplos de mutaciones útiles en polipéptidos de HPPD tolerantes a herbicidas

Mutación	Región de aminoácidos de SEC ID NO:14
K411L	GGFG K GNFS
K411T	GGFG K GNFS
K411S	GGFG K GNFS
K411M	GGFG K GNFS
K411A	GGFG K GNFS
K411E	GGFG K GNFS
K411V	GGFG K GNFS
M325L	GFEF M APPQ
L271I	VLLPL N EPV
L271M	VLLPL N EPV
L271V	VLLPL N EPV
G408A	GGCG G FGKG
G408S	GGCG G FGKG
G408T	GGCG G FGKG
V258M	GLNS V LAN
V258I	GLNS V LAN
V258A	GLNS V LAN
V258K	GLNS V LAN
V217I	RFDH V VGNV
V217A	RFDH V VGNV
V217M	RFDH V VGNV
V217C	RFDH V VGNV
L271I	VLLPL N EPV
L271M	VLLPL N EPV
L271V	VLLPL N EPV
A326S	FEF M APPQA
A326K	FEF M APPQA
A326P	FEF M APPQA
A326D	FEF M APPQA
A326R	FEF M APPQA
A326N	FEF M APPQA
A326Y	FEF M APPQA
A326H	FEF M APPQA
I370V	VLLQ I FTKP
Y287F	Q I QTYLEYH
G254S	TTES G LNSV
G254A	TTES G LNSV
E416Q	GNF S ELFKS
I339L	G V RR I AGDV

Mutación	Región de aminoácidos de SEC ID NO:14
L269M	EAVLLPLNE
L269F	EAVLLPLNE
S420A	ELFKSIEDY
I372S	LQIFTKPVG
Y172V	EVELYGDVV
I299M	GVQHIALAS

La Tabla 7 resume los datos de los estudios cinéticos de un grupo de mutantes de SEC ID NO: 14 de HPPD expresados respecto al control, “ninguna” significa SEC ID NO: 14 de HPPD no mutada. Los experimentos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en la Tabla 4. “Sulc” se refiere a sulcotriona y “nd” significa “no determinado”. Para V217I, L271I, L271V, V258M y A326R, se estimaron los valores relativos de k_{cat} a partir de comparaciones con las velocidades iniciales en extractos celulares de HPPD preparadas y expresadas de manera similar en ensayos de actividad enzimática convencionales a pH 7,0, 25 °C y con una concentración de sustrato de HPP 120 μ M. Los mutantes V217I, V258M y A326R, M325L y L358M de SEC ID NO: 14 son enzimas de HPPD activas que ofrecen algo de resistencia a sulcotriona y también pueden ofrecer resistencia a B. K411T ofrece una resistencia significativa a E y especialmente ya que el aumento superior a 5X en K_d respecto a este herbicida comprende principalmente una mejora en la velocidad de disociación (3,5X) más que en la velocidad de asociación. L358M, M325L y K411T ofrecen todos ellos mejoras respecto a D. Para la tolerancia a herbicidas L271I y L271V parece que ofrecen ventajas significativas en k_{cat} respecto a la enzima no mutada.

Tabla 7. Valores cinéticos relativos de varios mutantes de SEC ID NO: 14

Mutación	Compuesto químico									Velocidad	
	B		sulc	C		D		E			
	k_{off}	K_d	K_d	k_{off}	K_d	k_{off}	K_d	k_{off}	K_d	k_{cat}	k_{cat}/K_m
ninguna	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L358M	2	2	2	1,1	1,7	2,3	2,3	1,2	1,5	0,7	0,8
M325L	1,1	1,1	1,3	1	1	1,2	1,4	1	1	1,2	1,3
V217I	1,5	1,5	1,3	1,1	1,1	1	1	1	1	1,1	1,1
V258M	nd	nd	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	nd
L281I	nd	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,7	nd
L281V	nd	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2	nd
A326R	1,7	1,7	1,6	0,9	0,9	1,4	1,4	1,3	1,6	1,2	1,4
K411T	0,3	0,5	0,9	1	1,1	1,2	3,6	3,5	5,4	1	0,4

Se sobreentenderá que la mayoría de las sustituciones en aminoácidos dentro de la región del sitio activo de HPPD sumamente conservada y que se encuentren a 8 Å o menos de los átomos de la mesotriona unida (de acuerdo con la interpretación de los datos cristalográficos de rayos X publicados de HPPD de *arabidopsis* y de maíz y el modelo de homología construido con la HPPD de avena) dan como resultado enzimas desactivadas o funcionales solo en parte. A partir de los alineamientos de secuencias de HPPD (activas) de la base de datos, se seleccionaron alrededor de 60 mutantes sencillos o dobles de SEC ID NO: 14 como mutantes en los que se podían realizar cambios en algunos residuos sin pérdida de la actividad enzimática (suponiendo que fueran cambios que representarían parte de la extensión de la variación de secuencia que se observa entre las HPPD naturales en estas posiciones). Estos mutantes se generaron, se hicieron crecer, se expresaron las HPPD y los extractos se prepararon y estudiaron para determinar su actividad catalítica y resistencia a mesotriona (con relación al control, SEC ID NO: 14 no mutada). Incluso entre este conjunto privilegiado, la mayoría mostró una actividad catalítica significativamente alterada y/o fueron significativamente más sensibles a sulcotriona que el control. Y287F y I370V fueron mutaciones neutras con valores de k_{cat} y resistencia a sulcotriona similares (dentro del 20%) a los de la enzima no mutada. Entre un conjunto adicional de aproximadamente 70 mutantes que engloban residuos que están hasta a 10 Å de los átomos de los inhibidores unidos, algunas mutaciones neutras más de este tipo (con relación a SEC ID NO: 14) fueron G254S, G254A, E416Q, V258M, V258I, V258A, V258K, S415K, S415Q, I421L, A326S, L269M, L269F, S420A, T372S, Y172V e I299M. Estas mutaciones adicionales se pueden combinar todas ellas opcionalmente con mutaciones que confieren resistencia para producir variantes catalíticamente activas de enzimas resistentes a herbicidas de HPPD de la presente invención.

Un mutante adicional de SEC ID NO: 14 de HPPD, G408A, mostró unos valores cinéticos de inhibición respecto a B y C que muestran que este mutante fue relativamente resistente a la inhibición por estos compuestos. La evolución temporal de la inhibición no fue sencilla y no se pudo ajustar al modelo cinético descrito anteriormente. El método experimental utilizado fue similar al descrito anteriormente para medir las velocidades de unión al inhibidor monitorizando la actividad enzimática. La evolución temporal de la inhibición se muestra en las Figuras 10A-10D. Se incubó enzima a alrededor de 75 nM con inhibidor a 0,15 o 0,6 μM para diferentes tiempos de hasta 260 s y a continuación se ensayó inmediatamente durante un periodo de 150 s tras la adición de HPP 115 μM (y, por lo tanto, con $[S] \sim 30 \times K_m$ también ralentizó drásticamente cualquier unión adicional al inhibidor). En el caso del mutante parece que hubo una fase rápida inicial de inhibición que después se ralentizó y dejó la enzima inhibida solo parcialmente. En el caso de la enzima de control, la inhibición continuó (o tendió) hasta una inhibición completa. Aunque tenga en cuenta que en el caso de la inhibición de la enzima de control por parte del compuesto B no se alcanzó completamente un 100%. El ~8% de actividad residual en este caso fue un artefacto del método debido a la velocidad de disociación relativamente rápida del compuesto B que permitió que se recuperara algo de actividad durante el ensayo de 150 s utilizado para monitorizar el progreso de la reacción entre la enzima y el inhibidor. Este artefacto es insignificante con inhibidores que se disocian más lentamente tales como C. Durante el tiempo del experimento y a 0,6 μM de B, la inhibición del mutante G408A parece que se equilibró hasta una actividad residual de aproximadamente el 35%. Parece que esto no fue debido a que B presentara una velocidad de disociación aún más rápida de G208A que de la enzima de control ya que, a la temperatura del hielo, la velocidad de disociación determinada radioquímicamente de B respecto a G408A pareció ser indistinguible de la velocidad observada con SEC ID NO: 14 de HPPD de control. El mutante G408 también mostró una k_{cat} y k_{cat}/K_m similar a SEC ID NO: 14 de HPPD. Sea cual sea la explicación, tanto B como C parece que inhiben la HPPD mutante G408A en menor medida que la enzima de control. También cabe destacar que la actividad de G408A pareció ser inestable ya que la actividad de control en ausencia del inhibidor disminuyó a lo largo del transcurso del experimento. La adición de inhibidor pareció detener este descenso de la actividad y en experimentos adicionales se confirmó que la actividad del mutante G408A era inestable en ausencia de inhibidor o sustrato pero que el inhibidor la estabilizaba y parecía ser no menos estable que la enzima salvaje a lo largo de la evolución temporal del ensayo prolongado en presencia de sustrato o cuando estaba parcialmente inhibida por un herbicida de HPPD. Por lo tanto, a pesar de una cierta inestabilidad, el mutante G408A es útil solo o combinado con otras mutaciones para proporcionar tolerancia útil a herbicidas cuando hay herbicida presente en los tejidos vegetales en los que se expresa.

Aparte de los experimentos cinéticos enzimáticos, se demostró además una mejor resistencia a los herbicidas de HPPD cuando las HPPD de la presente invención se expresaron en *E. coli* y se evaluaron visualmente las resistencias a herbicidas comparativas de las diversas HPPD mediante la producción de piomelanina. Por ejemplo, se expresaron SEC ID NO: 14 de HPPD y SEC ID NO: 24 de HPPD a partir de un vector pET24 en células *E. coli* BL21. Hechas crecer sin adición de IPTG, hubo una expresión suficiente de HPPD para que los cultivos se volvieran marrones lentamente debido a la producción del pigmento piomelanina (que es el resultado de la autooxidación de homogentisato derivado de HPPD). Las células se hicieron crecer a partir de un inóculo de partida del 10% en 0,5 ml de caldo L que contenía 50 μg de canamicina ml^{-1} en placas de 45 pocillos durante 48-96 h a 15 $^{\circ}\text{C}$. Normalmente, el color de la piomelanina en el medio se leyó (a 430 nm) después de ~72 h. Se notó que la adición de 12,5 ppm de mesotriona provocó, de manera significativa, proporcionalmente menos inhibición del desarrollo del color de piomelanina en las células que expresaban SEC ID NO: 24 de HPPD que en las que expresaban SEC ID NO: 14 de HPPD. La Figura 5 compara la absorbancia del medio obtenido después de 72 h en triplicados contiguos que se hicieron crecer de *E. coli* que expresa SEC ID NOs: 14, 18 y 24 de HPPD, hechos crecer todos en la misma placa.

Las células que expresan SEC ID NO: 24 de HPPD, que mostraron la relación más elevada de K_i/K_m , mostraron uniformemente la menor diferencia de color entre las células que se hicieron crecer con y sin 12,5 ppm de mesotriona presente en el medio. Se observó lo mismo cuando la mesotriona se sustituyó por 20 ppm de sulcotriona (datos que no se muestran) lo que indica que SEC ID NO: 24 ofrece una mejor tolerancia a sulcotriona así como también a mesotriona. De manera similar, las células que expresaban el mutante G408A también mostraron una resistencia relativa a SEC ID NO: 14 de HPPD respecto a sulcotriona de acuerdo con el ensayo de piomelanina con 25 ppm de sulcotriona.

Ejemplo 3. Preparación y estudio de líneas vegetales transgénicas estables que expresan una enzima de HPPD heteróloga.

En el presente ejemplo, los genes de HPPD mutantes derivados de HPPD de *Avena* fueron las secuencias expuestas en SEC ID NOs: 1-13 (optimizadas para tabaco) u, opcionalmente, están optimizadas en codones según la cosecha diana (por ejemplo, haba de soja) y preparadas sintéticamente y obtenidas comercialmente a partir de GeneArt (Regensburg, Alemania). Cada secuencia se diseñó para tener sitios 5' *Nde1* y 3' *BamH1* para facilitar la clonación directa. Por ejemplo, las secuencias expuestas en SEC ID NOs: 11, 12 o 13 se clonan en un vector binario adecuado para la transformación vegetal a base de *Agrobacterium*.

En un ejemplo particular, los genes que codifican SEC ID NO: 14 de HPPD y SEC ID NO: 24 de HPPD se clonaron en constructos de expresión idénticos como se describe más adelante y se transformaron en tabaco.

Tal como se describe en la Pub. Sol. de patente PCT n $^{\circ}$ WO 02/46387, la secuencia nucleotídica codificante de HPPD se edita mediante PCR (o se sintetiza inicialmente) para incluir sitios 5' *Nco1* y 3' *Kpn1* (y para eliminar

cualquiera de tales sitios internos). A continuación, este producto se liga en pMJB1. pMJB1 fue un plásmido derivado de pUC19 que contiene el promotor CaMV35S mejorado doble operable en plantas, un potenciador TMV omega y el terminador de la transcripción NOS. En la Figura 2 de la Pub. Sol. de patente PCT n° WO 98/20144, se muestra una representación esquemática del plásmido resultante. El casete de expresión, que comprende el promotor 35S mejorado doble, el líder TMV omega, el gen de 4-HPPD y el terminador nos se corta usando *Hind* III/*Eco* R1 (digerido de *Eco* R1 parcial) y se clona en pBIN 19 digerido de forma similar y se transforma en células competentes de *E. coli* TOP 10. El ADN recuperado de la *E. coli* se usa para transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, y las bacterias transformadas se seleccionan en medio que contiene rifampicina y canamicina. El tejido de tabaco se somete a transformación mediada por *Agrobacterium*, usando métodos bien descritos en la técnica o como se describe aquí. Por ejemplo, una placa maestra de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector binario que expresa HPPD se usa para inocular 10 ml de LB (caldo L) que contiene 100 mg/l de rifampicina más 50 mg/l de canamicina, usando una única colonia bacteriana. Esto se incuba toda la noche a 28°C, agitando a 200 rpm. Este cultivo nocturno completo se usa para inocular un volumen de 50 ml de LB que contiene el mismo antibiótico. Nuevamente, esto se cultiva toda la noche a 28°C, agitando a 200 rpm. Las células de *Agrobacterium* se peletizan centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos, y después se resuspenden en medio MS (Murashige y Skoog) que contiene 30 g/l de sacarosa, pH 5,9 hasta una OD (600 nM) = 0,6. Esta suspensión se dispensa en alícuotas de 25 ml en cápsulas de Petri.

Cultivos de brotes de tabaco micropropagados de forma clonal se usaron para escindir hojas jóvenes (todavía no expandidas completamente). La nervadura central y los márgenes externos de las hojas se eliminan y se desechan, y la lámina que queda se corta en cuadrados de 1 cm. Estos se transfieren a la suspensión de *Agrobacterium* durante 20 minutos. Los explantes se retiran entonces, se embadurnan en papel de filtro estéril para eliminar la suspensión en exceso, después se transfieren a medio NBM sólido (medio MS que contiene 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de BAP (bencilaminopurina) y 0,1 mg/l de NAA (ácido naftalenoacético) a pH 5,9, y solidificado con 8 g/l de plantagar), con la superficie abaxial de cada explante en contacto con el medio. Se transfirieron aproximadamente 7 explantes por placa, que entonces se cierran herméticamente y se mantienen en una incubadora alumbrada a 25°C durante un fotoperíodo de 16 horas durante 3 días.

Los explantes se transfieren entonces sobre medio NMB que contiene 100 mg/l de canamicina más antibiótico, para evitar el crecimiento adicional de *Agrobacterium* (200 mg/l de timentina con 250 mg/l de carbenicilina). Entonces se llevó a cabo el subcultivo adicional sobre este mismo medio cada 2 semanas.

A medida que los brotes comienzan a regenerarse a partir de las explantas de hojas que forman callos, se retiran a medio de alargamiento de brotes (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de plantagar, 100 mg/l de canamicina, 200 mg/l de timentina, 250 mg/l de carbenicilina, pH 5,9). Las plantas transgénicas estables enraízan fácilmente en 2 semanas. Para proporcionar múltiples plantas por suceso para permitir finalmente ensayar más de un herbicida por planta transgénica, todos los brotes que enraízan se micropropagan para generar 3 o más clones enraizados.

Las plantas transgénicas putativas que están enraizando y que muestran un crecimiento vigoroso del brote en el medio que incorpora canamicina se analizan mediante PCR usando cebadores que amplificaron un fragmento de 500 pb en el transgén de HPPD. La evaluación de este mismo cebador montado en tabaco sin transformar mostró de forma concluyente que estos cebadores no amplificarían secuencias del gen de HPPD de tabaco nativo.

Los brotes transformados se dividen en 2 ó 3 clones y se regeneran a partir de callo resistente a canamicina. Los brotes se enraizan en agar MS que contiene canamicina. Las explantas enraizadas que sobreviven se vuelven a enraizar para proporcionar aproximadamente 70-80 eventos resistentes a canamicina y positivos a PCR a partir de cada evento.

Una vez enraizadas, las plántulas se transfieren desde agar y se ponen en macetas en 50% de turba, 50% de John Innes Soil n° 3 con un fertilizante de liberación lenta en macetas redondas de 3 pulgadas, y se dejan regadas regularmente para establecerse durante 8-12 días en el invernadero. Las condiciones del invernadero son de alrededor de un 24-27°C día, 18-21°C noche, y aproximadamente un fotoperíodo de 14 horas. La humedad se ajusta a ~65%, y los niveles de luz usados son de hasta 2000 $\mu\text{moles/m}^2$ al nivel del banco.

De este modo se produjeron dos poblaciones transgénicas, cada una de alrededor de 80 plantas de tabaco y que comprenden, como alternativa, un gen de HPPD que codifica SEC ID NO: 14 de HPPD o SEC ID NO: 24 de HPPD dentro de casetes de expresión que, de otro modo, son idénticos. Se hicieron crecer estas dos poblaciones hasta alrededor de la etapa foliar 2-4 y a continuación cada una se dividió en dos subpoblaciones, una que comprendía aquellas plántulas que después de surgir del cultivo tisular eran bastante más grandes y más avanzadas y la otra población que comprendía las plantas más pequeñas. Por lo tanto, las poblaciones con tamaños pequeños de SEC ID NO: 14 y SEC ID NO: 24 parecieron ser visualmente similares y comparables unas a otras, al igual que lo hicieron las dos poblaciones de plantas más grandes.

Cada una de las dos poblaciones más pequeñas se pulverizaron con 300 g/ha de mesotriona y las dos poblaciones más grandes con 500 g/ha. Se mezcló Callisto® en agua con 0,2-0,25% de tensioactivo X-77 y se pulverizó desde un brazo de grúa en un pulverizador de carril adecuado que se mueve a 2 mph, con una boquilla a alrededor de 2 pulgadas desde las partes superiores de la planta. El volumen de pulverización fue de 200 l/ha.

- Se evaluaron las plantas para determinar el daño y se les asignó una calificación 13 días después del tratamiento (DAT). La totalidad de las cuatro poblaciones parecieron ser sumamente resistentes a los tratamientos con herbicida pero las poblaciones que expresaban SEC ID NO: 24 de HPPD más que las poblaciones control con SEC ID NO: 14. De las dos poblaciones con tamaños más grandes pulverizadas con 500 g/ha únicamente 4 de 38 (10%) de plantas positivas por PCR morfológicamente normales (surgió una que era quimérica) que expresaban SEC ID NO: 24 mostraron síntomas de daños por el herbicida mientras que 9 de un total de 33 (27%) de las plantas que expresaban SEC ID NO: 14 mostraron daño. Se apreció poco daño en las dos poblaciones con tamaños más pequeños pulverizadas con 300 g/ha de mesotriona; aquí 2 de 28 plantas que expresaban SEC ID NO: 24 mostraron un daño visible debido al herbicida en comparación con 4 de 26 plantas que expresaban SEC ID NO: 14.
- Las plantas de los eventos que mostraron el daño menor se hacen crecer hasta la floración, a continuación se introducen en bolsas y se permite que se autofertilicen. Las semillas de los eventos seleccionados se recogen y se plantan de nuevo en macetas y se estudian de nuevo para determinar la resistencia a herbicidas en una prueba de pulverización para determinar la resistencia a herbicidas de HPPD (por ejemplo, mesotriona). Los eventos con una única copia entre las líneas de plantas T1 se identifican por su relación de segregación 3:1 (con respecto a canamicina y/o herbicida) y por RT-PCR cuantitativa. Las semillas del tabaco T1 (var. Samsun) seleccionadas de esta manera se siembran en macetas con un diámetro de 3 pulgadas que contienen un 50% de turba y un 50% de John Innes Soil nº 3.

Ejemplo 4. Construcción de vectores de transformación de haba de soja

- Se construyeron vectores binarios para transformación de dicotiledóneas (haba de soja) con un promotor, tal como un promotor sintético que contiene un potenciador transcripcional CaMV 35S y uno FMV y una caja TATA sintética que dirigen la expresión de una secuencia codificante de HPPD, tal como SEC ID NO: 24, seguido del terminador de 3' del gen Nos. El gen de HPPD se optimizó en los codones para la expresión de haba de soja basándose en la secuencia de aminoácidos predicha de la región codificante del gen de HPPD. En el caso de que no se usara como marcador seleccionable la propia HPPD, se construyeron vectores de transformación binarios de *Agrobacterium* que contenían un casete de expresión de HPPD añadiendo un gen marcador seleccionable de la transformación. Por ejemplo, el vector de transformación binario 17146 (SEC ID NO: 33) contiene un casete de expresión para la variante de HPPD (SEC ID NO: 24) enlazado con dos casetes del gen PAT (uno con el promotor 35S y uno con el promotor CMP, y ambos genes PAT van seguidos por el terminador nos) para la selección a base de glufosinato durante el proceso de transformación. Otro vector de transformación binario (17147) (SEC ID NO: 34) contiene el casete de expresión de la variante de HPPD (SEC ID NO: 24) y también un casete de marcador seleccionable de EPSPS. El vector 17147 se transformó en haba de soja, y se obtuvieron plantas transgénicas usando selección con glifosato después de la transformación, mediada por *Agrobacterium*, de dianas de semillas inmaduras. De manera similar, se construyó el vector binario 15764 (SEC ID NO: 35) para comprender los casetes de expresión para expresar la variante de HPPD (SEC ID NO: 14) junto con un gen marcador seleccionable bar y se construyó el vector binario 17149 (SEC ID NO: 36) para comprender un casete de expresión que expresa la variante de HPPD (SEC ID NO: 26) junto con dos casetes del gen PAT. En todos los casos, las secuencias de ADN que codifican los genes de HPPD se optimizaron en los codones para la expresión en haba de soja.

- Los vectores binarios descritos anteriormente se construyeron usando una combinación de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como PCR de solapamiento, síntesis de ADN, subclonación y ligación de fragmentos de restricción. Sus estructuras únicas se obtienen explícitamente en las Figuras 6 (vector 17146), 7 (vector 17147), 8 (vector 15764) y 9 (vector 17149) y en los listados de secuencias (SEC ID NOs: 33-36). A continuación, se proporciona información adicional con respecto a los vectores mostrados en las Figuras 6-9.

Las abreviaturas usadas en la Figura 6 (vector 17146) se definen según lo siguiente:

cAvHPPD-04

- 45 Principio: 1024 Final: 2343

Gen de HPPD de avena optimizado en los codones para haba de soja que codifica SEC ID NO: 24

cPAT-03-01

Principio: 3209 Final: 3760

- 50 S. viridochromogenes sintético Hoescht AO2774 PAT, codones vegetales; idéntico a la proteína Q57146 de fosfinotricin acetil transferasa

cPAT-03-02

Principio: 5062 Final: 5613

Proteína fosfinotricin acetil transferasa de S. viridochromogenes PAT Q57146, ADN de cPAT-03-01, con sitios *BamH1*, *Bgl2* mutados

cSpec-03

Principio: 6346 Final: 7134

5 También denominado *aadA*; gen que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina para mantenimiento del vector en *E. coli* y *Agrobacterium*. También conocido como cSPEC-03

cVirG-01

Principio: 7434 Final: 8159

virG (putativo) procedente de pAD1289 con codón de Principio TTG. virGN54D procede de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607

10 cRepA-01

Principio: 8189 Final: 9262

Proteína de replicación RepA, pVS1

eNOS-01

Principio: 168 Final: 259

15 Secuencia potenciadora de NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.

eFMV-03

Principio: 396 Final: 589

Región potenciadora del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)

20 e35S-05

Principio: 596 Final: 888

Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador 35S del virus del mosaico de la coliflor

eTMV-02

Principio: 953 Final: 1020

25 Secuencia líder de TMV Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión. EMBL: TOTMV6

eFMV-03

Principio: 4054 Final: 4247

Región potenciadora procedente del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)

e35S-05

30 Principio: 4254 Final: 4546

Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador 35S del virus del mosaico de la coliflor

eNOS-01

Principio: 4557 Final: 4648

35 Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios

bNRB-05

Principio: 4 Final: 259 (complementario)

Región de frontera derecha/ T-DNA de NOS; puede influir en los promotores. EMBL Nos: J01826, V00087, AF485783.

ES 2 619 279 T3

bNRB-01-01

Principio: 101 Final: 125 (complementario)

Repetición de frontera derecha de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

bNLB-03

5 Principio: 5937 Final: 6066 (complementario)

Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

bNRB-01-01

Principio: 5972 Final: 5996 (complementario)

10 Región de repetición de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

prCMP-04

Principio: 4655 Final: 5051

15 Promotor y líder del virus del rizado de la hoja amarilla de galán de noche (principio aagggagc?). genbank AF364175. US20040086447. prCMP-01 con un truncamiento de un par de bases en el extremo 5', y un truncamiento de 2 pares de bases en el extremo 3'

pr35S-04-01

Principio: 2664 Final: 3184

Promotor 35S procedente del virus del mosaico de la coliflor. EMBL: CAMVG2

oVS1-02

20 Principio: 9305 Final: 9709

Origen de replicación y región de partición de plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al Número de Acceso GenBank U10487; sirve como origen de replicación en el hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*

oCOLE-06

25 Principio: 10387 Final: 11193 (complementario)

El origen de replicación de ColE1 funcional en *E. coli* derivó de pUC19

tNOS-05-01

Principio: 2360 Final: 2612

Terminador sintético de nopalina sintetasa

30 tNOS-05-01

Principio: 3794 Final: 4046

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

Principio: 5642 Final: 5894

35 Terminador sintético de nopalina sintetasa

Las abreviaturas usadas en la Figura 7 (vector 17147) se definen como lo siguiente:

cAvHPPD-04

Principio: 1024 Final: 2343

Gen de HPPD de avena optimizado en los codones para haba de soja, que codifica SEC ID NO: 24

cGmEPSPS-01

Principio: 3672 Final: 5249

Versión optimizada en los codones para haba de soja de ADNc de EPSPS de haba de soja mutante doble

cSpec-03

5 Principio: 5982 Final: 6770

También denominado *aadA*; gen que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina para mantenimiento del vector en *E. coli* y *Agrobacterium*. También conocido como cSPEC-03

cVirG-01

10 Principio: 7070 Final: 7795

virG (putativo) procedente de pAD1289 con codón de Principio TTG. virGN54D procedió de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607

cRepA-01

Principio: 7825 Final: 8898

15 Proteína de replicación de RepA, pVS1

Descripción de la ubicación original:

eNOS-01

Principio: 168 Final: 259

20 Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.

eFMV-03

Principio: 396 Final: 589

Región potenciadora del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)

e35S-05

25 Principio: 596 Final: 888

Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador 35S del virus del mosaico de la coliflor

eTMV-02

Principio: 953 Final: 1020

Secuencia líder de TMV Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión. EMBL: TOTMV6

30 eFMV-03

Principio: 2664 Final: 2857

Región potenciadora del virus del mosaico de escrofularia (FMV)

e35S-05

Principio: 2864 Final: 3156

35 Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador 35S del virus del mosaico de la coliflor

eNOS-01

Principio: 3167 Final: 3258

Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.

bNRB-05

Principio: 4 Final: 259 (complementario)

Región de frontera derecha/T-DNA de NOS; puede influir en los promotores. EMBL Nos: J01826, V00087, AF485783.

5 bNRB-01-01

Principio: 101 Final: 125 (complementario)

Repetición de frontera derecha de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

bNLB-03

Principio: 5573 Final: 5702 (complementario)

10 Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

bNLB-01-01

Principio: 5608 Final: 5632 (complementario)

Región de repetición de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

15 prCMP-04

Principio: 3265 Final: 3661

Promotor y líder del virus del rizado de la hoja amarilla de galán de noche (principio aagggagc?). genbank AF364175. US20040086447. prCMP-01 con truncamiento de 1 par de bases en el extremo 5' y truncamiento de 2 pares de bases en el extremo 3'.

20 Descripción de la ubicación original:

oVS1-02

Principio: 8941 Final: 9345

Origen de la replicación y región de partición procedente del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al Número de Acceso GenBank U10487; sirve como origen de replicación en el hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*.

25 oCOLE-06

Principio: 10023 Final: 10829 (complementario)

El origen de replicación de ColE1 funcional en *E. coli* derivó de pUC19

tNOS-05-01

30 Principio: 2360 Final: 2612

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

Principio: 5278 Final: 5530

Terminador sintético de nopalina sintetasa

35 Las abreviaturas usadas en la Figura 8 (vector 15764) se definen según lo siguiente:

cAvHPPD-03

Principio: 450 Final: 1769 (complementario)

Gen de HPPD de avena optimizado en los codones para haba de soja que codifica SEC ID NO 14

cPATBAR-07

ES 2 619 279 T3

Principio: 3034 Final: 3585

Gen BAR X17220 de *S. hygroscopicus* (sitio Bgl2 mutado), proteína fosfinotricin acetil transferasa caa35093.

cSpec-03

Principio: 4334 Final: 5122

- 5 estreptomicina adenililtransferasa; de Tn7 (aadA)

cVirG-01

Principio: 5422 Final: 6147

Gen de virulencia G de *Agrobacterium tumefaciens* (virGN54D, que contiene el codón de Principio TTG) virGN54D procedió de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607

- 10 cRepA-03

Principio: 6177 Final: 7250

Proteína de replicación de RepA, pVS1 con A a G en nt735

eTMV-02

Principio: 1773 Final: 1840 (complementario)

- 15 Secuencia líder del virus del mosaico del tabaco (TMV_Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión.

EMBL: TOTMV6

e35S-05

Principio: 1905 Final: 2197 (complementario)

Región potenciadora 35S del virus del mosaico de la coliflor con cambios de pb de C a T y de C a A.

- 20 eFMV-03

Principio: 2204 Final: 2397 (complementario)

Potenciador del virus del mosaico de la escrofularia.

bNRB-04

Principio: 5 Final: 144 (complementario)

- 25 Región de frontera derecha de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*. Difiere de bNRB-03 en 20 pb en el extremo 5'.

bNRB-01-01

Principio: 102 Final: 126 (complementario)

Repetición de frontera derecha de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*.

- 30 bNLB-03

Principio: 3925 Final: 4054 (complementario)

Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*. (Zambryski *et al.* 1980, *Science*, 209:1385-1391) EMBL nº J01825.

bNLB-01-01

- 35 Principio: 3960 Final: 3984 (complementario)

Región de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*.

pr35S-04-01

Principio: 2494 Final: 3014

ES 2 619 279 T3

Promotor 35S; promotor definido originalmente en el mapa con una longitud de 641 pb; no hay una coincidencia exacta en la bibliografía (LF julio de 2004)

oVS1-02

Principio: 7293 Final: 7697

- 5 Origen de replicación y región de partición del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al número de acceso de GenBank U10487; actúa como un origen de replicación en el hospedante *Agrobacterium tumefaciens*

oCOLE-06

Principio: 8375 Final: 9181 (complementario)

- 10 Origen de replicación ColE1 funcional en *E. coli*

tNOS-05-01

Principio: 181 Final: 433 (complementario)

Terminador NOS: 3'UTR del gen nopalina sintasa

tNOS-05-01

- 15 Principio: 3619 Final: 3871

Terminador NOS: 3'UTR del gen nopalina sintasa

Las abreviaturas usadas en la Figura 9 (vector 17149) se definen según lo siguiente:

cAvHPPD-05

Principio: 1024 Final: 2343

- 20 Secuencia optimizada en los codones para haba de soja que codifica SEC ID NO: 26 de HPPD

cPAT-03-01

Principio: 3209 Final: 3760

S. viridochromogenes sintético Hoescht AO2774 PAT, codones vegetales; idéntico a la proteína Q57146 de fosfinotricin acetil transferasa

- 25 cPAT-03-02

Principio: 5062 Final: 5613

Proteína fosfinotricin acetil transferasa de *S. viridochromogenes* PAT Q57146, ADN de cPAT-03-01, con sitios *BamH1*, *Bgl2* mutados

cSpec-03

- 30 Principio: 6346 Final: 7134

También denominado *aadA*; gen que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina para mantenimiento del vector en *E. coli* y *Agrobacterium*. También conocido como cSPEC-03

cVirG-01

- 35 Principio: 7434 Final: 8159

virG (putativo) procedente de pAD1289 con codón de Principio TTG. virGN54D procede de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607

cRepA-01

Principio: 8189 Final: 9262

- 40 Proteína de replicación RepA, pVS1

- Descripción de la ubicación original
- eNOS-01
- Principio: 168 Final: 259
- 5 Secuencia potenciadora de NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.
- eFMV-03
- Principio: 396 Final: 589
- Región potenciadora del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)
- e35S-05
- 10 Principio: 596 Final: 888
- Cambios de pb de C a T y C a A en la región potenciadora 35S del virus del mosaico de la coliflor
- eTMV-02
- Principio: 953 Final: 1020
- Secuencia líder de TMV Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión. EMBL: TOTMV6
- 15 eFMV-03
- Principio: 4054 Final: 4247
- Región potenciadora procedente del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)
- e35S-05
- Principio: 4254 Final: 4546
- 20 eNOS-01
- Principio: 4557 Final: 4648
- Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios
- bNRB-05
- 25 Principio: 4 Final: 259 (complementario)
- Región de frontera derecha/T-DNA de NOS; puede influir en los promotores. EMBL Nos: J01826, V00087, AF485783.
- bNRB-01-01
- Principio: 101 Final: 125 (complementario)
- 30 Repetición de frontera derecha de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*
- bNLB-03
- Principio: 5937 Final: 6066 (complementario)
- Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*
- bNLB-01-01
- 35 Principio: 5972 Final: 5996 (complementario)
- Región de repetición de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*
- prCMP-04

Principio: 4655 Final: 5051

Promotor y líder del virus del rizado de la hoja amarilla de galán de noche (principio aagggagc?). genbank: AF364175. US20040086447. prCMP-01 con un truncamiento de un par de bases en el extremo 5' y un truncamiento de 2 pares de bases en el extremo 3'

5 pr35S-04-01

Principio: 2664 Final: 3184

Promotor 35S procedente de CaMV. EMBL: CAMVG2 (100% de coincidencia contra este registro EMBL)

oVS1-02

Principio: 9305 Final: 9709

10 Origen de replicación y región de partición de plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al número de acceso GenBank U10487; sirve como origen de replicación en el hospedante *Agrobacterium tumefaciens*

oCOLE-06

Principio: 10387 Final: 11193 (complementario)

15 El origen de replicación ColE1 funcional en *E.coli* derivó de pUC19

tNOS-05-01

Principio: 2360 Final: 2612

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

20 Principio: 3794 Final: 4046

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

Principio: 5642 Final: 5894

Terminador sintético de la nopalina sintetasa

25 **Ejemplo 5:** Transformación de haba de soja y selección de plantas resistentes a herbicidas.

El material vegetal de haba de soja se puede transformar de forma adecuada y se pueden regenerar plantas fértiles mediante muchos métodos que son bien conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, las plantas transgénicas de haba de soja fértiles morfológicamente normales se pueden obtener mediante: 1) la producción de tejido embriogénico somático procedente de, *por ejemplo*, cotiledón inmaduro, hipocotilo u otro tejido adecuado; 2) transformación mediante bombardeo con partículas o infección con *Agrobacterium*; y 3) regeneración de plantas. En un ejemplo, como se describe en la patente U.S. n° 5.204.944, se corta tejido de cotiledón procedente de embriones inmaduros de haba de soja, preferiblemente al que se le ha eliminado el eje embrionario, y se cultiva en medio que contiene hormonas, para formar material vegetal embriogénico somático. Este material se transforma usando, por ejemplo, métodos de ADN directos, bombardeo con microproyectiles revestidos con ADN o infección con *Agrobacterium*, se cultiva en un medio de selección adecuado y se regenera, opcionalmente también en presencia continua de agente de selección, en plantas de haba de soja transgénicas fértiles. Los agentes de selección pueden ser antibióticos tales como canamicina, higromicina, o herbicidas tales como fosfinotricina o glifosato, o, como alternativa, la selección se puede basar en la expresión de un gen marcador visualizable, tal como GUS. Como alternativa, los tejidos diana para la transformación comprenden tejido meristemático en vez de embriogénico somaclonal, u, opcionalmente, es tejido de flores o formador de flores. Otros ejemplos de transformaciones de haba de soja se pueden encontrar, *por ejemplo*, mediante el método de suministro de ADN físico, tal como bombardeo con partículas (Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; McCabe *et al.* (1988) *Bio/technology* 6:923-926), triquitas (Khalafalla *et al.* (2006) *African J. of Biotechnology* 5:1594-1599), inyección de haces de aerosol (patente U.S. n° 7.001.754), o mediante métodos de suministro mediados por *Agrobacterium* (Hinchee *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:915-922; patente U.S. n° 7.002.058; Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20040034889; Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20080229447; Paz *et al.* (2006) *Plant Cell Report* 25:206-213). El gen de HPPD también se puede suministrar en un orgánulo tal como un plásmido, para conferir resistencia incrementada a herbicidas (Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20070039075).

Las plantas transgénicas de haba de soja se pueden generar con los vectores binarios descritos anteriormente (Ejemplo 4) que contienen variantes del gen de HPPD con diferentes métodos de transformación. Opcionalmente, el gen de HPPD puede proporcionar el medio de selección e identificación de tejido transgénico. Por ejemplo, se usó un vector para transformar dianas de semillas inmaduras como se describe (Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20080229447) para generar plantas de haba de soja de HPPD transgénicas directamente usando inhibidor de HPPD, tal como mesotriona, como agente de selección. Opcionalmente, los genes de HPPD se pueden presentar en el polinucleótido junto con otras secuencias que proporcionan medios adicionales de selección/identificación de tejido transformado, incluyendo, por ejemplo, los genes conocidos que proporcionan resistencia a canamicina, higromicina, fosfotricina, butafenacilo, o glifosato. Por ejemplo, vectores binarios diferentes que contienen los genes marcadores seleccionables PAT o EPSPS como se describe en el Ejemplo 4 se transformaron en una diana de semilla de haba de soja inmadura para generar plantas tolerantes a herbicidas de HPPD usando transformación mediada por *Agrobacterium* y selección con glufosinato o glifosato (Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20080229447).

Como alternativa, las secuencias marcadoras seleccionables pueden estar presentes en polinucleótidos separados, y se usa un proceso de, por ejemplo, cotransformación y coselección. Como alternativa, en lugar de un gen marcador seleccionable, se puede usar un gen marcador puntuable, tal como GUS, para identificar un tejido transformado.

Se puede usar un método a base de *Agrobacterium* para la transformación de haba de soja para generar plantas transgénicas usando glufosinato, glifosato o inhibidor de HPPD mesotriona como agente de selección, usando semillas de haba de soja inmaduras como se describe (Publicación de Solicitud de Patente U.S. n° 20080229447).

Ejemplo 6: Crecimiento de plantas transgénicas de haba de soja, análisis y evaluación de la tolerancia a herbicidas.

Se llevaron plantas T₀ procedentes de cultivo de tejido al invernadero, en el que se transplantaron en suelo saturado con agua (mezcla para cepellones y plántulas REDI-EARTH, Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA o mezcla de germinación Fafard) mezclado con 1% de MARATHON granular (Olympic Horticultural Products, Co., Mainland, PA) a 5-10 g/gal de suelo en macetas cuadradas de 2". Las plantas se cubrieron con cúpulas para la humedad y se colocaron en una cámara Conviron (Pembina, ND) con las siguientes condiciones medioambientales: 24°C día; 20°C noche; fotoperíodo de 16-23 h de luz-1-8 h de oscuridad; y humedad relativa de 80%.

Después de que las plantas se establecieron en el suelo y aparecieron nuevos crecimientos (~1-2 semanas), se tomaron muestras de las plantas y se ensayaron para determinar la presencia del transgén deseado mediante análisis TAQMAN® usando sondas apropiadas para los genes de HPPD, o promotores (por ejemplo prCMP). Todas las plantas positivas se transplantaron en macetas cuadradas de 4" que contenían suelo Fafard n°3. Se incorporó un fertilizante de liberación lenta Sierra 17-6-12 en el suelo, a la tasa recomendada. Las plantas se vuelven a colocar entonces en un invernadero estándar para aclimatizarlas (~1 semana). Las condiciones medioambientales fueron: 27°C día; 21°C noche; fotoperíodo de 14 h (con luz complementaria); humedad ambiental. Después de aclimatarse (~1 semana), se tomaron muestras de las plantas y se ensayaron detalladamente para detectar la presencia y número de copias de transgenes insertados. Se hacen crecer plantas transgénicas de haba de soja hasta madurez, para la producción de semillas T1. Las plantas T1 se hicieron crecer y después de análisis TAQMAN®, se hicieron crecer las plantas homocigotas para la producción de semillas. Las semillas transgénicas y las plantas de la progenie se usaron para evaluar posteriormente su comportamiento de tolerancia a herbicidas y sus características moleculares.

Las plantas de haba de soja homocigotas procedentes de 2 eventos generados con el vector 15764 (Figura 8) y múltiples eventos generados con el vector 17147 (Figura 7) que expresan SEC ID NO: 14 y SEC ID NO: 24, respectivamente, a partir de dos casetes de expresión de HPPD idénticos se hicieron crecer y se ensayaron para determinar su tolerancia a una gama de herbicidas de HPPD. La Tabla 8 resume los resultados de estos ensayos a partir de plantas pulverizadas en la etapa de crecimiento V2. Cada punto de datos representa la calificación de daño promedio a partir de n = 7 réplicas.

Tabla 8. Resultados de los ensayos de pulverización con herbicida contra los eventos de haba de soja con vector 15764 y 17147

EVENTO/SEC de HPPD											
	11,4	4,8	9,3	3,6	42,1	8,1	26,4	6,9	36,4	4,8	
	20,7	3,4	22,1	3,9	52,9	9,9	42,5	4,2	52,1	7	
	15,3	2,4	15,3	3,7	62,1	6,4	30	4,1	51,4	6,3	

	8,3	2,1	5,3	2,1	45	4,1	19,3	5,3	39,3	11,7
	10,6	2,4	6,9	2,4	45	4,1	20,7	3,4	41,4	3,8
	18,6	4,2	19,3	3,4	68,6	6,9	31,3	4,8	80	21,4
	15,7	3,9	25	5,8	98,6	3,8	40	5,8	97,1	7,6
	82,9	8,6	83,6	4,8	82,1	3,9	96,1	3,5	84,3	8,4

5 El evento 1 fue más tolerante a mesotriona y el evento 2 fue el segundo evento 15764 más tolerante seleccionado a partir de una población de aproximadamente 90. Estos eventos se usaron para comparar el rendimiento de cinco eventos 17147. Cuatro de estos, SF, S8, S7 y S3 no se habían preseleccionado por el nivel de tolerancia (más que para confirmar resistencia, naturaleza no química y presencia del gen) mientras que el evento restante, T0, se había preseleccionado como el más resistente de los cinco eventos 17147 en un ensayo de campo preliminar.

10 Las plantas estuvieron en macetas de plástico de 4 x 4 x 4 pulgadas y se hicieron crecer en un régimen de luz de 15/9 horas (luz del día complementada con luz artificial en los invernaderos) con una temperatura mínima nocturna de 18 °C y una temperatura máxima diurna de 27 °C. El suelo fue mezcla VBRC regular (mezcla 1:1 de suelo de campo Vero y Mezcla Fafard II) donde el suelo de campo Vero es un 98% de arena y un 2% de arcilla. Los tratamientos con el compuesto B = CALLISTO® 4 SC (480 g ai/l), con el compuesto C (200 g ai/l) EC, con IFT = Balance Pro 4 SC (480 g ai/l) y con el compuesto E = Laudis 3,5 SC (420 g ai/l) incluyeron un 0,25% v/v de INDUCE (un tensioactivo no iónico) y sulfato de amonio (N-PAK líquido AMS) con una tasa equivalente a 8,5 lb/galón. El volumen del pulverizado fue de 150 l/ha y las calificaciones del daño reflejan evaluaciones a 14 DAT.

15 Resulta sorprendente que a partir de un conjunto tan pequeño de eventos 17147 la totalidad de los cinco eventos ensayados proporcionara tolerancia a mesotriona y a isoxaflutol equivalente a uno de los mejores eventos 15764, el evento 2, y ciertamente que dos de ellos, T0 y S7, superaran el rendimiento del evento 15764 más tolerante, el evento 1, que se seleccionó entre muchos.

20 Los datos *in vitro* y, en particular los datos de la velocidad de disociación, muestran que SEC ID NO: 24 es 2 y 2,3 veces superior a SEC ID NO: 14 respecto a B e IFT pero neutra respecto a C y E. El hecho de que las plantas que expresan SEC ID NO: 24 de HPPD mostraran un patrón alterado de manera similar a la tolerancia a herbicidas concuerda con esto. Por lo tanto, por ejemplo, los eventos SF y S8 muestran una tolerancia similar o mejor tanto a IFT como a B que 6W pero, a diferencia de 6W, esencialmente no tolerancia al compuesto E o al C. De manera similar, los únicos eventos 17147, T0 y S7, que muestran una tolerancia a E y C que es similar a la del evento 4R también muestran una tolerancia superior que 4R a B e IFT. Los datos *in vitro* tienen un valor predictivo en las plantas y SEC ID NO: 24 proporciona una mejor tolerancia a mesotriona e IFT pero no, por ejemplo, a tembotriona.

25 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Timothy Robert Hawkes

Michael Phillip Langford

Russell Colin Viner

5 Bernardus Theodorus Maria Vernooij

Richard Dale

<120> POLIPEPTIDOS DE HIDROXIFENILPIRUVATO DIOXIGENASA MUTANTES Y METODOS DE USO

<130> 72051-D-X

<1x50> 61/224.661

10 < 151> 2009-07-10

<150> 61/146.513

< 151> 2009-01-22

<160> 80

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 1

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga ttaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aaatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 2

< 211> 1317

25 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 2

```

atgcctccta ctctgcttac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tcctttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtagc tcatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagttagat 1080
agagatgata aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttagg aatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttfaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

5 <210> 3

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 3

```

atgcctccta ctctgcttac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tcctttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtagg acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagttagat 1080
agagatgata aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttagg aatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttfaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 4

< 211> 1317

15 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 4

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaatccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaatt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtac tcatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaac ctgtaggaga tagacctact 1140
ttttttttag aaatgattca aagaattgga tgtaggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
5 attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 5

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 5

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaatccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaatt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaa ctcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaac ctgtaggaga tagacctact 1140
ttttttttag aaatgattca aagaattgga tgtaggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
15 attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 6

15 < 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

5 <400> 6

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactcta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaagattt 180
tccttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tcctttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttgatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataaatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaag ctcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatac aaggagtatt attacaatt tttactaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aaatgattca aagaattgga tgatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaactct tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 7

< 211> 1317

< 212> ADN

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 7

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactcta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaagattt 180
tccttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta tcctttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttgatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataaatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaat ctcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatac aaggagtatt attacaatt tttactaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aaatgattca aagaattgga tgatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaactct tagtagctca aaaatct 1317

```

15 <210> 8

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 8

```

atgcctccta ctccctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaatccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagagatt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaag tacaaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaatataa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aaatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttga aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317
    
```

<210> 9

< 211> 1317

10 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 9

```

atgcctccta ctccctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaatccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagagatt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gaatgaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa tcaaaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaatataa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aaatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttga aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317
    
```

15

ES 2 619 279 T3

<210> 10

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

5 <220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 10

```

atgcctccta ctccctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaatccta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagagatt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgc 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
tgggaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataaatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa tcaaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt attagtagat 1080
agagatgac aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttag aatgattca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaactc 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 11

10 < 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

15 <400> 11

ES 2 619 279 T3

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactcta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaaagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt aatggtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttagg aatgatttca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaagaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

<210> 12

< 211> 1317

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

<400> 12

```

atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactcta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaaagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttggatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaaact actgaatctg gattaaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaattaaa gaatgtcaag aattaggagt agctgtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttagg aatgatttca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaagaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317

```

10 <210> 13

< 211> 1317

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de HPPD mutante

ES 2 619 279 T3

<400> 13

```
atgcctccta ctctgctac tgctactgga gctgctgctg ctgctgtaac tcctgaacat 60
gctgctagat cttttcctag agtagtaaga gtaaactcta gatctgatag atttcctgta 120
ttatcttttc atcatgtaga attatggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt 180
tcttttgctt taggagctcc tttagctgct agatctgatt tatctactgg aaattctgct 240
catgcttctt tattattaag atctggagct ttagcttttt tatttactgc tccttatgct 300
cctcctcctc aagaagctgc tactgctgct actgcttcta ttccttcttt ttctgctgat 360
gctgctagaa cttttgctgc tgctcatgga ttagctgtaa gatctgtagg agtaagagta 420
gctgatgctg ctgaagcttt tagagtatct gtagctggag gagctagacc tgcttttgct 480
cctgctgatt taggacatgg atttgatta gctgaagtag aattatatgg agatgtagta 540
ttaagatttg tatcttatcc tgatgaaact gatttacctt ttttacctgg atttgaaga 600
gtatcttctc ctggagctgt agattatgga ttaactagat ttgatcatgt agtaggaaat 660
gtacctgaaa tggctcctgt aattgattat atgaaaggat ttttaggatt tcatgaattt 720
gctgaattta ctgctgaaga tgtaggaact actgaatctg gaatgaattc tgtagtatta 780
gctaataatt ctgaagctgt attattacct ttaaatgaac ctgtacatgg aactaaaaga 840
agatctcaaa ttcaaactta tttagaatat catggaggac ctggagtaca acatattgct 900
ttagcttcta atgatgtatt aagaacttta agagaaatga gagctagaac tcctatggga 960
ggatttgaat ttatggctcc tcctcaagct aaatattatg aaggagtaag aagaattgct 1020
ggagatgtat tatctgaaga acaaatataa gaatgtcaag aattaggagt aatggtagat 1080
agagatgatc aaggagtatt attacaaatt tttactaaac ctgtaggaga tagacctact 1140
tttttttagg aatgatttca aagaattgga tgtatggaaa aagatgaagt aggacaagaa 1200
tatcaaaaag gaggatgtgg aggatttggg aaaggaaatt tttctgaatt atttaaatct 1260
attgaagatt atgaaaaatc tttagaagta aaacaatctg tagtagctca aaaatct 1317
```

<210> 14

< 211> 439

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Polipéptido de HPPD mutante

<400> 14

ES 2 619 279 T3

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270
 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285
 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300
 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320
 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335
 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350
 Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365
 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380
 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400
 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415
 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430
 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser

<210> 15

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 15

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe

ES 2 619 279 T3

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 Thr Ala
 100 105 110
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 17

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 17

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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

ES 2 619 279 T3

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 Thr Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 18

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 18

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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 Thr Ala

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 19

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 19

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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 Thr Ala
 100 105 110

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ala Gln Thr Tyr Leu
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 20

ES 2 619 279 T3

< 211> 439

< 212> PRT

< 213> Avena sativa

<400> 20

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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 Thr Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

5

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 21

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 21

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 22

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 22

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

ES 2 619 279 T3

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 Thr Ala
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 23

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Avena sativa

<400> 23

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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

ES 2 619 279 T3

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 Thr Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 24

< 211> 439

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 24

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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 Thr Ala
 100 105 110

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 25

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Avena sativa

<400> 25

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly 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 Thr Ala
 100 105 110

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

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

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala

ES 2 619 279 T3

< 212> PRT

< 213> Avena sativa

<400> 26

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 Thr Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

ES 2 619 279 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 27

< 211> 440

< 212> PRT

5 < 213> Avena sativa

<400> 27

ES 2 619 279 T3

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
1 5 10 15
Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
20 25 30
Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
35 40 45
Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
50 55 60
Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
65 70 75 80
His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
85 90 95
Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr
100 105 110
Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala
115 120 125
Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala
130 135 140
Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
145 150 155 160
Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
165 170 175
Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp
180 185 190
Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val
195 200 205
Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
210 215 220
Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu
225 230 235 240
Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu
245 250 255
Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
260 265 270
Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
275 280 285
Leu Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
290 295 300
Asn Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met
305 310 315 320
Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
325 330 335
Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu
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> 28

< 211> 7

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<220>

< 221> VARIANTE

< 222> 2
 < 223> Xaa = K, A o R
 <220>
 < 221> VARIANTE
 5 < 222> 6
 < 223> Xaa = Q o E
 <400> 28
Arg Xaa Ser Gln Ile Xaa Thr
1 5
 <210> 29
 10 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 15 <220>
 < 221> VARIANTE
 < 222> 1
 < 223> Xaa = P, A o S
 <220>
 20 < 221> VARIANTE
 < 222> 3
 < 223> Xaa = V o L
 <220>
 < 221> VARIANTE
 25 < 222> 6
 < 223> Xaa = I, L, or M
 <400> 29
Xaa Gly Xaa Gln His Xaa
1 5
 <210> 30
 30 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 35 <220>
 < 221> VARIANTE

< 222> 2
 < 223> Xaa = I o V
 <400> 30
Gly Xaa Leu Val Asp Arg Asp

5 1 5
 <210> 31
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial

10 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <220>
 < 221> VARIANTE
 < 222> 6

15 < 223> Xaa = S o G
 <400> 31
Glu Ser Gly Leu Asn Xaa
 1 5

<210> 32
 < 211> 5

20 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <220>

25 < 221> VARIANTE
 < 222> 2
 < 223> Xaa = A o S
 <220>
 < 221> VARIANTE

30 < 222> 5
 < 223> Xaa = T o V
 <400> 32
Phe Xaa Glu Phe Xaa
 1 5

<210> 33

35 < 211> 11205

ES 2 619 279 T3

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> vector

5 <400> 33

```
attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt 60
taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatatatcc 120
tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 180
attaaggagag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 240
aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaaa tcaattgggc 300
gcgtagcgtag cactagttaa ttccggacc aagcttgcat gcctgcagga attggccgca 360
gcggccattt aaatcaattg ggcgcgtgcg gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaaa 420
aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaa 480
gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct 540
gacagccac tcaactaatgc gtatgacgaa cgagtgacg accacaaaac tcgagacttt 600
tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 660
tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 720
```

ES 2 619 279 T3

aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac 780
gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg 840
tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatcccac tatccttctg caggtcgact 900
ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gagtattttt 960
acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt tacaattaca 1020
catatgcctc caacaccagc tactgctact ggagctgctg ctgctgcoct tacaccagaa 1080
catgctgcaa ggtcattccc tagagttggt cgcgttaacc ctaggtctga cagattccct 1140
gttctgtcct tccatcatgt ggagcttgg tgtgctgatg cagctagtgc tgctggctcg 1200
ttcagctttg cacttggagc accacttctg gcaagatctg atctgtctac agggaactca 1260
gcacatgctt ctctcctact tcgatctgga gcattagcct tcctttttac cgctccttat 1320
gctccacctc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattccctc cttttcagca 1380
gatgctgcaa gaacctttgc tgcgacat ggacttctg tcagatctgt tggagttagg 1440
gttctgatg cagctgaagc atttcgcgtt agtgttctg gaggagcaag acctgctttt 1500
gctccagcag atcttggca cggatttga cttgctgaag tggagctgta tggagatgtg 1560
gttctgagat tcgtgagcta tcctgacgaa actgacctac catttctcc aggattcgag 1620
agggtttcaa gtccaggtgc agttgactac ggtttgactc gctttgacca cgttgttggg 1680
aacgttccag aatggctcc tgcctcagc tacatgaagg gattccttgg tttccacgag 1740
ttcgtgaaat tcacagcaga ggatgttga accacagaat ctggactgaa cagtgtggtt 1800
ctagccaca cactgttctg cctcccaaa ccattgaacg agcctgttca tggaaaccaag 1860
agacgatctc agatccaaac ctacctgaa taccatggtg gaccaggagt tcaacacatc 1920
gcattggctt ctaacgatgt gcttccaaac ctccagggaa tgagagccag aactccaatg 1980
ggagggttcg aatttctggc cctcccaaa gccaagtact atgaaggagt ccgtagaatc 2040
gctggagatg tcttctcaga ggaacagatc aaggagtgtc aagaactggg tgttatggtt 2100
gatcgagacg atcaaggtgt gctactccag atcttcacca aaccagtgtg tgatcgtccc 2160
acttttttcc tcgaaatgat tcagcgaata ggatgcatgg agaaggatga agttgggcaa 2220
aagtaccaga aagttggatg tgggtggttt ggaaaaggga acttttccga gttgttcaag 2280
tccatagagg actacgagaa gtcactggaa gtcaagcagt ctgtcgttgc tcagaagagc 2340
taagagctct tcatatgacg atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa 2400
tctgttgcg ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 2460
aataattaac atgtaatgca tgacttatt tatgagatgg gttttatga ttagatccc 2520
gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaataatag cgcgcaaac aggataaatt 2580
atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgcgaccg aagcttgcct gcctgcaggt 2640
cgactctaga ggatctgga cccagcaaa gattcaata gaggacctaa cagaactcgc 2700
cgtaaagact ggcaaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat 2760
cttcgtcaac atggtggagc acgacacgct tgtctactcc aaaaatatca aagatcacgt 2820
ctcagaagac caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct 2880
cggattccat tgcggagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaag aggaaggtgg 2940
ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga 3000
cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gttgaaaaag aagacgttcc 3060
aaccacgtct caaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc 3120
acaatcccac tctccttgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttggg 3180
gaggacacgc tgaatcact agtccaccat gtctccggag agggagaccag ttgagattag 3240
gccaagtaca gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gtttaaccatt acattgagac 3300
gtctacagtg aacttttaga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga 3360
gaggttgcaa gatagatacc cttgggttgg tgcgtgaggtt gagggtggtt tggctggtat 3420
tgcttacgct ggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt 3480
ttacgtgtca catagggcatc aaaggttggg cctaggatcc acattgtaca cacatttct 3540
taagtctatg gaggcgcaag gttttaaagtc tgtggttctt gttataggcc ttccaaacga 3600
tccatctgtt aggttgcagc aggttttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgcagc 3660
tggatacaag catgggtgat ggcctgatgt tggtttttgg caaagggtt ttgagttgcc 3720
agctcctcca aggcagtta ggcagttac ccagatctga actagtgata tggcgccat 3780
gggtcgacct gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 3840
tgccggctct gcgatgatta tcataaatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 3900
taacatgtaa tgcagcagc tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcgaatt 3960
atacatttaa tacgcatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 4020
cgcggtgtca tctatgttac tagatccgga cccagctgct tgtggggacc agacaaaaa 4080
ggaatggtgc agaattgtta ggcgcaccta ccaaaagcat ctttgccttt attgcaaaga 4140
taaagcagat tcctctagta caagtgggga acaaaaatac gtggaaaaga gctgtcctga 4200
cagcccactc actaatcgt atgacgaacg cagtgacgac cacaaaactc gagacttttc 4260
aacaagggtt aatatccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta 4320
ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggtt cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa 4380
aggctatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa agatggaacc caccacga 4440
ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccagctcttc aaagcaagt gattgatgtg 4500
atatctccac tgaogtaagg gatgacgaac aatcccacta tcttctgccc ggacctcat 4560
gagcggagaa ttaagggtg cacttatgga cccccgcga tgacgcggga caagcgttt 4620

ES 2 619 279 T3

tacgtttgga actgacagaa ccgcaacgaa gctttggcag acaaagtggc agacatactg 4680
tcccacaaat gaagatggaa tctgtaaaag aaaacgcgtg aaataatgcg tctgacaaaag 4740
gttaggtcgg ctgcctttaa tcaataccaa agtggctcct accacgatgg aaaaactgtg 4800
cagtcggttt gccttttct gaagaacaaa taagattcgt ggccgacagg tgggggtcca 4860
ccatgtgaag gcatcttcag actccaataa tggagcaatg acgtaagggc ttacgaaata 4920
agtaagggta gtttgggaaa tgtccactca cccgtcagtc tataaatact tagccctcc 4980
ctcattgtta agggagcaaa atctcagaga gatagtccta gagagagaaa gagagcaagt 5040
agcctagaag tggatcccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat taggccagct 5100
acagcagctg atagggccgc ggtttgtgat atcgttaacc attacattga gacgtctaca 5160
gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct agagagggtg 5220
caagatagat acccttgggtt ggttgcctgag gttgagggtg ttgtggctgg tattgcttac 5280
gctgggcccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg 5340
tcacatagac atcaaaggtt gggcctagga tctacattgt acacacattt gcttaagtct 5400
atggaggcgc aaggttttaa gctcgtggtt gctgttatag gccttccaaa cgatccatct 5460
gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc agctggatac 5520
aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct 5580
ccaaggccag ttaggccaagt taccagata ttagtcgagc tctagatccc cgaatttccc 5640
cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaaagatt aatcctgttg ccggtcttgc 5700
gatgattatc gatcgggaat tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaagt 5760
catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata 5820
cgcgatagaa acaaaaatag agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtctcctc 5880
tatgttacta gatcgggaat tgggtaccat tgggtaccat ccccgggcgg ccagcatggc cgtatccgca 5940
atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc acaatatatc ctgccaccag 6000
ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc accactcgat acaggcagcc 6060
catcagaatt aattctcatg tttgacagct tatcatcgac tgcacgggtg accaatgctt 6120
ctggcgtcag cagcccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggctgtaa atcactgcat 6180
aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg ttttttggcg cgacatcata 6240
acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatccgg ctcgataaat 6300
gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agaccatgag ggaagcgttg 6360
atcgcgaag atcactcaac actatcagag gtatgttggc tcatcgagcg ccatctcgaa 6420
ccgacgttgc tggccgtaca tttgtacggc tccgcagtg atggcggcct gaagccacac 6480
agtgatattg atttgctggt tacggtgacc gtaaggcttg atgaaacaac gcggcgagct 6540
ttgatcaacg accttttga aacttcggct tcccctggag agagcgagat tctccgctct 6600
gtagaagtca ccattgttgt gcaacgagac atcattccgt ggcgttatcc agctaagcgc 6660
gaactgcaat ttggagaatg gacgcgcaat gacattcttg caggtatctt cgagccagcc 6720
acgatcgaca ttgatctggc tatcttctgt acaaaagcaa gagaacatag cgttgccttg 6780
gtaggtccaag cggcggagga actctttgat cgggttctct aacaggatct atttgaggcg 6840
ctaaatgaaa ccttaacgct atggaactcg ccgcccact gggctggcga tgagcgaat 6900
gtagtcttca cgttgtcccg catttgttac agcgcagtaa ccggcaaaaat cgcgcggaag 6960
gatgtcgtc cgcactgggc aatggagcgc ctgcccggcc agtatcagcc cgtcactatt 7020
gaagcttagc agccttatct tggacaagaa gatcgttgg gatcgcgcgc agatcagttg 7080
gaagaatttg ttcactacgt gaaaggcgag atcaccaaag tagtcggcaa ataaagctct 7140
agtggatctc cgtaccgggg gatctgctc gcggcggag cacgacgccc gggcgagacc 7200
ataggcgatc tcttaaatca atagtagctg taacctcgaa gcgtttcact tghtaacaacg 7260
attgagaatt tttgtcataa aattgaaata cttggttcgc atttttgtca tccgcggtca 7320
gccgcaatc tgacgaactg cccatttagc tggagatgat tgtacatcct tcacgtgaaa 7380
atcttcaag cgtgtgaaac aagggttcag attttagatt gaaaggtgag ccggtgaaac 7440
acgttcttct tgtcgatgac gacgtcgcta tgcggcatct tattattgaa taccttacga 7500
tccacgcctt caaagtgacc gcggtagccg acagcaccca gttcacaaga gtactctctt 7560
ccgcgacggt cgatgtcgtg gttggtgatc tagatttag tctgtaagat gggctcgaga 7620
tctgtcgtaa tctggcggca aagtctgata ttccaatcat aattatcagt ggcgaccgccc 7680
ttgaggagac ggataaagtt gttgcaactc agctaggagc aagtgatttt atcgctaagc 7740
cgttcagtat cagagagttt ctgacacgca ttcgggttgc cttgcccgtg cgcgcccaacg 7800
ttgtccgctc caaagaccga cgttctttt gttttactga ctggacactt aatctcagggc 7860
aacgtcgtt gatgtccgaa gctggcgggt aggtgaaact tacggcaggt gagttcaatc 7920
ttctcctcgc gtttttagag aaaccccgcg acgttctatc gcgcgagcaa cttctcattg 7980
ccagtcagat acgcgacgag gaggtttatg acaggagtat agatgttctc attttgaggc 8040
tgcgcgcaa acttgaggca gatccgtcaa gccctcaact gataaaaaa gcaagagggtg 8100
ccggttattt ctttgacgag gactgcaagg tttcgcacgg ggggacgatg gcagcctgag 8160
ccaattccca gatccccgag gaatcggcgt gagcggctcg aaaccatccg gcccggtaca 8220
aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc agggccgccc 8280
gcggcaacgc atcagggcag aagcaccgcc cgggtgaatc tggcaagogg ccgctgatcg 8340
aatccgcaaa gaatccccg aaccgcccgg agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc 8400
caaggcgac gagcaaccag atttttctgt tccgatgctc tatgacgtgg gcaccgcgca 8460
tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt ccgtctgctg aagcgtgacc gacgagctgg 8520

ES 2 619 279 T3

```

cgaggtgac cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg 8580
catggccagt gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc 8640
catgaaccga taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt 8700
tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaaag acgacctggt 8760
agaaacctgc attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa 8820
gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt 8880
aaagagcgaa accgggcccgc cggagtacat cgagatcgag cttagctgatt ggatgtaccg 8940
cgagatcaca gaaggcaaga acccggacgt gctgacgggt caccocgatt actttttgat 9000
cgatcccggc atcggcccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga 9060
agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgcgggag agttcaagaa 9120
gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa 9180
ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct agtcatgccc taccgcaacc tgatcgaggg 9240
cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaatg ccctagcagg 9300
ggaaaaaggt cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc 9360
gtacattggg aaccggaaacc cgtacattgg gaacccaaag cgtacattg ggaaccggtc 9420
acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt 9480
aaaacttatt aaaactctta aaaccgcct ggctgtgca taactgtctg gccagcgcac 9540
agccgaagag ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgcgcg 9600
ttcgcgtcgg cctatcgcg cgcctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa 9660
tctaccaggg cgcggacaag ccgcgcgcgc gccactcgac cgcggcgct gaggtctgcc 9720
tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca ggctgaatc gccccatcat ccagccagaa 9780
agtgaaggag ccacggttga tgagagcttt gtgtgaggtg gaccagttgg tgattttgaa 9840
cttttgcttt gccacggaac ggtctgcgtt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa 9900
ctcagcaaaa gttcgattta ttcaacaaag ccgccgtccc gtcaagtacg cgtaatgctc 9960
tgccagtgtt acaaccaatt aaccaattct gattagaaaa actcatcgag catcaaatga 10020
aactgaat tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag ccgtttctgt 10080
aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcgggtc 10140
gcgattccga ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaaaagg 10200
ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagctct 10260
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggttt cgtattgggc gctcttccgc 10320
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 10380
ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 10440
agcaaaaagg cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 10500
taggtccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtacga ggtggcgaaa 10560
cccagacgga ctataaagat accagcggtt tcccctgga agctccctcg tgcgctctcc 10620
tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg gaagcgtggc 10680
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct 10740
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 10800
tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 10860
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg gccctaacta 10920
cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 10980
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 11040
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 11100
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 11160
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttgatccgg aatta 11205

```

<210> 34

< 211> 10841

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> vector

<400> 34

attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cagcccttt 60
 taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatataatcc 120
 tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 180
 attaagggag tcacgttatg acccccgcg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttg 240
 aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaa tcaattgggc 300
 gcgtagctag cactagttaa ttccggacc aagcttgcat gcctgcagga attggccgca 360
 gggccattt aatcaattg ggcgcgtgog gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaa 420
 aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaaa 480

gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct 540
 gacagcccac tcaactatgc gtatgacgaa cgcagtgcag accacaaaac tcgagacttt 600
 tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 660
 tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 720
 aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtgtccc aaagatggac cccccccac 780
 gaggagcadc gtggaaaaa aagacgttcc aaccacgtct tcaagcaag tggattgatg 840
 tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatcccac tatcctctg caggtcagct 900
 ctaggagatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gagtattttt 960
 acaacaatta ccaacaacia caaacaacia acaacattac aattactatt tacaattaca 1020
 catatgcctc caacaccagc tactgtact ggagctgctg ctgctgctg tacaccagaa 1080
 catgctgcaa ggtcattccc tagagttggt cgcgttaacc ctaggctgta cagattccct 1140
 gttctgtcct tccatcatgt ggagcttgg tgtgctgatg cagctagtgc tgctggtcgt 1200
 ttcagctttg cacttggagc accacttgc gcaagatctg atctgtctac agggaaactca 1260
 gcacatgctt ctctcctact tcgatctgga gcattagcct tcctttttac cgctccttat 1320
 gctccacctc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattccctc cttttcagca 1380
 gatgctgcaa gaacctttgc tgcctgacat ggacttctg tcagatctgt tggagttagg 1440
 gttgctgatg cagctgaagc atttcgcgt agtgttctg gaggagcaag acctgctttt 1500
 gctccagcag atcttggta cggatttgg cttgctgaag tggagctgta tggagatgtg 1560
 gttctgagat tcgtgagcta tcctgacgaa actgacctac catttctcc aggatcgag 1620
 aggtttcaa gtcagggtgc agttgactac ggtttgactc gctttgacca cgttgttgg 1680
 aacgttccag aaatggctcc tbtcatcgac tacatgaag gattccttgg tttccacgag 1740
 ttcgctgaat tcacagcaga ggatgttgg accacagaat ctggactgaa cagtgtggtt 1800
 ctaggcaaca acagtgaagc tgttctctg ccattgaac agcctgttca tggaaaccaag 1860
 agacgatctc agatccaac ctactcgaa taccatggtg gaccaggagt tcaacacatc 1920
 gcattggctt ctacagatgt ctctgaact ctcagggaaa tgagagccag aactccaatg 1980
 ggagggttcg aatttatggc tcctccacia gccaaact atgaaggagt ccgtagaatc 2040
 gctggagatg tcttctcaga ggaacagatc aaggagtgc aagaactggg tgttatggtt 2100
 gatcgagcag atcaaggtgt gctactccag atcttcacca aaccagtgg tgatcgtccc 2160
 acttttttcc tcgaaatgat tcagcgaata ggatgcatgg agaaggatga agttgggcaa 2220
 gagtaccaga aaggtggatg tgggtgggtt ggaaagggga acttttccga gttgttcaa 2280
 tccatagagg actacgagaa gtcactggaa gtcaagcagt ctgtcgttgc tcagaagagc 2340
 taagagctct tcatatgacg atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa 2400
 tctgttggcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 2460
 aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagctcc 2520
 gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaactc aggataaatt 2580
 atcgcgcgog gtgtcatcta tgttactaga tcgcggaccg aagcttgcag gcctgcaggt 2640
 cgactctaga ggatctggga cccagctgct tgtggggacc agacaaaaaa ggaatggtgc 2700
 agaattgta ggccaccta caaaaagcat ctttgccttt attgcaaga taaagcagat 2760
 tcctctagt aagtgggga caaaaataac gtggaaaaga gctgtcctga cagcccactc 2820
 actaatgctg atgacgaacg cagtgcgac cacaaaaactc gagacttttc aacaaaaggt 2880
 aatattccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat 2940
 agtggaaaag gaaggtggct cctacaatg ccattctgc gataaaggaa aggtatcgt 3000
 tgaagatgac tctgcccaca gttgtcccaa agatggacc ccaccacga ggagcatcgt 3060
 ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagt gattgatgtg atatctccac 3120
 tgacgtaagg gatgacgaac aatcccacta tccttctgcc ggaccctcat gagcggagaa 3180
 ttaagggagt cacgttatga cccccgcga tgacgcggga caagccgttt tacgtttgga 3240
 actgacagaa ccgcaacgaa gctttggcag acaaaagtggc agacatactg tcccacaaat 3300
 gaagatgaa tctgtaaaaag aaaacgcgtg aaataatgct tctgacaaag gttaggtcgg 3360
 ctgcctttaa tcaataccaa agtggctcct accacgatgg aaaaactgtg cagtcgggtt 3420
 ggtttttct gacgaacaaa taagattcgt ggccgacag tgggggtcca ccatgtgaa 3480
 gcatctcag actccaataa tggagcaatg acgtaagggc ttacgaaata agtaagggta 3540
 gtttgggaaa tgtccactca cccgtcagtc tataaatact tagccctcc ctcattgta 3600
 agggagcaaa atctcagaga gatagtcta gagagagaaa gagagcaagt agcctagaag 3660
 tggatcccac catggctcaa gtttctagag ttcataacct tgctcaatct actcaattt 3720
 tcggacatc ttctaactct aacaagctta agtctgttaa ctctgtttct cttagacca 3780
 gactttgggg agcttctaag tctagaattc caatgcataa gaacggatct ttcattggaa 3840
 acttcaactg tggaaaggg aactctggag ttttcaaggt ttctgcttct gttgtgctg 3900
 ctgagaagcc atctactct ccagagattg ttcttgacc aattaaggat ttctctgaa 3960
 ctattactct tccaggatct aagtctcttt ctaacagaa tcttcttct gctgctctt 4020
 ctgagggaa tactgttgtt gataaccttc tttattctga ggatattcat tatatgctt 4080
 gtgctcttag aactcttgg acttagattg aggatgata gactactaag caagctattg 4140
 ttgagggatg cggaggactt ttcccactt ctaaggagtc taaggatgag attaacctt 4200
 tccttggaaa cgtggaatt gctatgagat ctctactgc tgctgtgtt gctgctggag 4260
 gaaacgcttc ttatgttct gatggagtcc caagaatgag agagagacca attggagatc 4320
 ttgtgctgag acttaagcaa cttggagctg atgttgattg cttccttgg aactaactgcc 4380

ES 2 619 279 T3

caccagttag agttaacgga aagggaggac ttccaggagg aaaggttaag ctttctggat 4440
ctgtttcttc tcaatatctt actgctcttc ttatggctgc tccacttgct cttggagatg 4500
ttgagattga gattggtgat aagcttattt ctggttcctta tghtgagatg actcctaaagc 4560
ttatggagag attcggagtt tctggtgagc attctggaaa ctgggataga ttccctggtc 4620
atggaggaca aaagtataag tctccaggaa acgctttcgt tgagggagat gcttcttctg 4680
cttcttatct tcttgctgga gctgctatta ctggaggaaac tattactggt aacggatgcg 4740
gaacttcttc tcttcaagga gatgttaagt tgcgtgaggt tcttgagaag atgggagcta 4800
aggttacttg gtctgagaac tctgttactg tttctggacc accaagagat ttctctggaa 4860
gaaaggttct tagaggaatt gatgttaaca tgaacaagat gccagatggt gctatgactc 4920
ttgctggtgt tgctcttttc gctaaccggac caactgctat tagagatggt gcttcttgga 4980
gagttagga gactgagaga atgattgcta tttgactga gcttagaaag cttggagcta 5040
ctgttgagga gggaccagat tattgctgta ttactccacc agagaagcct aacgttactg 5100
ctattgatag ttatgatgat catagaatgg ctatggcttt ctctcttgct gcttgcgagg 5160
atgttccagt tactattaaa gatccaggat gcaactagaa gactttcca gattatttctg 5220
aggttcttga gagacttact aagcattaag tcgagctcta gatccccgaa ttccccgat 5280
cgttcaaaca ttggcaata aagtttctta agattgaatc ctggtgccgg tcttgcgatg 5340
attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 5400
acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg 5460
atagaaaaa caaatatagcg cgcaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg 5520
ttactagatc ggaattggg taccatgcc gggcgccag catggccgta tccgcaatgt 5580
gttattaagt tgcctaagcg caaattggt tacaccacaa tatatcctgc caccagccag 5640
ccaacagctc ccgaccggc agctcgccac aaaatcacca ctcgatcacg gcagcccatc 5700
agaattaatt ctcatggttg acagcttacc atcgactgca cgggtgacca atgcttctg 5760
cgtcaggcag ccacggaag ctgtggtatg gctgtgcagg tgcgtaaatca ctgcataatt 5820
cgtgtcgtc aaggcgact ccggttctgg ataattgttt ttgcccgcac atcataacgg 5880
ttctggcaaa tattctgaaa tgaactgttg acaattaatc atccgctcg tataatgtgt 5940
ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaacagac catgagggaa gcggtgatcg 6000
ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgtcat cgagcccat ctcgaaccga 6060
cgttgctggc cgtacatttg tacggctcgg cagtggatgg cggcctgaag ccacacagtg 6120
atattgattt gatggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga aacaacgagg cgagcttga 6180
tcaacgacct ttggaaact tccgctccc ctggagagag cgagatctc cgcgctgtag 6240
aagtcaccat tgttgtgac gcgacatca ttccgtggcg ttatccagct aagccggaac 6300
tgcaatttg agaattggc gcaatgaca ttcttgacag tatcttcgag ccagccacga 6360
tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga acatagcgtt gccttggtag 6420
gtccagcggc ggaggaactc ttgatccgg ttctgaaaca ggatctattt gaggcgctaa 6480
atgaaacctt aacgctatgg aactcggcgc ccgactgggc tggcgatgag cgaatgtgag 6540
tgcttacggt gtcccgcatt tggtagacgc cagtaaccgg caaaatcgcg ccgaaggatg 6600
tcgctgcccga ctgggcaatg gagcgcctgc cggcccagta tcagcccgtc atacttgaag 6660
ctagggcagg ttatcttggg caagaagatc gcttggcctc gcgcgcagat cagttggaag 6720
aatttcttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaagtagt cggcaataaa agctctagt 6780
gatctccgta cccgggtatc tggctcggcg cggcgcacag acgcccgggc gagaccatag 6840
gcgatctcct aatcaatag tagctgtaac ctogaagcgt ttcacttga acaacgattg 6900
agaatttttg tcataaaatt gaaatacttg gttcgcatt ttgtcatccg cggtcagccg 6960
caattctgac gaactgcca tttagctgga gatgattgta catccttcac gtgaaaattt 7020
ctcaagcgtt gtgaacaagg gttcagattt tagattgaaa ggtgagccgt tgaacacagt 7080
tcttcttctc gatgacgacg tgcctatgcg gcatcttatt attgaatacc ttacgatcca 7140
cgcttcaaaa gtgaccgagg tagccgacag caccagttc acaagagtac tctctccgc 7200
gacggtcgat gtctggttgg ttgatctaga tttaggtcgt gaagatgggc tcgagatcgt 7260
tcgtaatctg gcggcaagt ctgatattcc aatcataatt atcagtgggc accgccttga 7320
ggagacggat aaagtgttgg cactcgagct aggagcaagt gattttatcg ctaagccgtt 7380
cagtatcaga gatttctag cacgcattcg gttgcttg cggctgccc ccaacgttgt 7440
ccgctcaaaa gaccgacggt ctttttgtt tactgactgg acacttaatc tcaggcaacg 7500
tcgcttgatg tccgaagctg gcggtgaggt gaaacttac gcaggtgagt tcaatcttct 7560
cctcgcgttt ttagagaaac ccgcgacgt tctatcgcg gagcaacttc tcattgccag 7620
tcgagtacgc gacgagagg ttatgacag gagtatagat gttctcattt tgaggctgcg 7680
ccgcaactt gaggcagatc cgtcaagccc tcaactgata aaaacagcaa gaggtgccg 7740
ttatttctt gacgcgagc tgacggttgc gcacggggg acgatggcag cctgagccaa 7800
ttcccagatc cccgaggaat cggcgtgagc ggtcgcaaac catccggccc ggtacaaatc 7860
ggcgcgccgc tgggtgatga cctggtgag aagttgaagg ccgcccaggc cgcccagcgg 7920
caacgcatcg aggcagaagc acgcccgggt gaatcgtggc aagcggccgc tgatcgaatc 7980
cgcaagaat ccggcaacc gccggcagcc ggtgcgctg cgattaggaa gccgccaag 8040
ggcgacgagc aaccagattt tttogttcog atgctctatg acgtgggcac ccgcatagt 8100
cgcagcatca tggacgtggc cgttttccgt ctgtcgaagc gtgaccgacg agctggcag 8160
gtgatccgct acgagcttcc agaccggcac gtagaggttt ccgagggcc ggccggcatg 8220
gccagtgtgt gggattacga cctggtactg atggcggtt cccatctaac cgaatccatg 8280

ES 2 619 279 T3

```

aacggatacc  ggggaagggaa  ggggagacaag  cccggccgcg  tgttccgtcc  acacgttgcg  8340
gacgtactca  agttctgccc  gcgagccgat  ggcggaaagc  agaaagacga  cctggtagaa  8400
acctgcattc  ggttaaacac  cacgcacggt  gccatgcagc  gtacgaagaa  ggccaagaac  8460
ggccgcctgg  tgacgggtatc  cgagggtgaa  gccttgatta  gccgctacaa  gatcgtaaag  8520
agcgaaaccc  ggcggccgga  gtacatcgag  atcgagctag  ctgattggat  gtaccgagag  8580
atcacagaag  gcaagaaccc  ggacgtgctg  acggttcacc  ccgattactt  tttgatcgat  8640
cccggcatcg  gccgttttct  ctaccgctg  gcacgcccgc  ccgcaggcaa  ggcaagaagcc  8700
agatggttgt  tcaagacgat  ctacgaacgc  agtggcagcg  cgggagagtt  caagaagttc  8760
tgtttcaccg  tgcgcaagct  gatcgggtca  aatgacctgc  cggagtacga  tttgaaggag  8820
gagcgggggc  aggttgccc  gatcctagtc  atgcgctacc  gcaacctgat  cgagggcgaa  8880
gcatccgccc  gttcctaagt  tacggagcag  atgctagggc  aaattgccct  agcaggggaa  8940
aaagtgcgaa  aaggtctctt  tcctgtggat  agcacgtaca  ttgggaaccc  aaagccgtac  9000
attgggaacc  ggaacccgta  cattgggaac  ccaaagccgt  acattgggaa  ccggtcacac  9060
atgtaagtga  ctgatataaa  agagaaaaaa  ggcgattttt  ccgcctaaaa  ctcttataaa  9120
cttattaaaa  ctcttataaac  ccgcctggcc  tgtgcataac  tgtctggcca  gcgcacagcc  9180
gaagagctgc  aaaaagcggc  taccctcgg  tcgctgcgct  ccctacgccc  cggcgttcg  9240
cgctcgccta  tcgcccggc  tggccgctca  aaaaatggctg  gcctacggcc  aggcaatcta  9300
ccagggcgcg  gacaagccgc  gccgtcgca  ctgcaccgcc  ggcgctgagg  tctgcctcgt  9360
gaagaaggtg  ttgctgactc  ataccaggcc  tgaatcgccc  catcatccag  ccagaaagtg  9420
agggagccac  ggttgatgag  agctttgtg  tagtgaggac  agttggtgat  tttgaacttt  9480
tgctttgcca  cggaacggtc  tgcgtgtcg  ggaagatgcg  tgatctgatc  cttcaactca  9540
gcaaaagttc  gatttattca  acaaagccgc  cgtcccgtca  agtcagcgt  atgctctgcc  9600
agtgttacia  ccaattaacc  aattctgatt  agaaaaactc  atcgagcatc  aaatgaaact  9660
gcaattttatt  catatcagga  ttatcaatac  catatttttg  aaaaagccgt  ttctgtaatg  9720
aaggagaaaa  ctaccgagg  cagttccata  ggatggcaag  atcctggtat  cggctcgcga  9780
ttccgactcg  tccaacatca  atacaacct  ttaatttccc  ctctcaaaa  ataaggttat  9840
caagtgagaa  atcaccatga  gtgacgactg  aatccgggtg  gaatggcaaa  agctctgcat  9900
taatgaatcg  gccaacgcgc  ggggagaggc  ggtttgcgta  ttggcgctc  ttccgcttcc  9960
tcgctcactg  actcgctgcg  ctcggtcgtt  cggctgcggc  gagcggatc  agctcactca  10020
aaggcggtaa  tacggttatc  cacagaatca  ggggataacg  caggaaagaa  catgtgagca  10080
aaagccagc  aaaagccag  gaaccgtaaa  aaggccgcgt  tgctggcgtt  tttccatagg  10140
ctccgcccc  ctgacgagca  tcacaaaaat  cgacgctcaa  gtcagaggtg  gcgaaacccg  10200
acagactat  aaagatacca  ggcgtttccc  cctggaagct  ccctcgtgcg  ctctcctggt  10260
ccgaccctgc  cgcttaccgg  atacctgtcc  gcctttctcc  cttcgggaa  cgtggcgctt  10320
tctcatagct  cacgctgtag  gtatctcagt  tcggtgtagg  tcggtcgtc  caagctgggc  10380
tgtgtgcacg  aacccccctg  tcagcccagc  cgctgcgct  tatccggtaa  ctatcgtctt  10440
gagtccaacc  cggtaaagca  cgacttatcg  ccaactggcag  cagccactgg  taacaggatt  10500
agcagagcga  ggtatgtagg  cgggtctaca  ggttcttga  agtggtgccc  taactacggc  10560
tacactagaa  gaacagtatt  tggatctgct  gctctgctga  agccagttac  cttcgaaaa  10620
agagttggta  gctcttgatc  cggcaaaaa  accaccgctg  gtagcgtgg  tttttttgtt  10680
tgcaagcagc  agattacgcg  cagaaaaaaa  ggatctcaag  aagatccttt  gatcttttct  10740
acggggtctg  acgctcagtg  gaacgaaaac  tcacgttaag  ggattttggt  catgagatta  10800
tcaaaaagga  tcttcacct  gatccttttg  atccggaatt  a  10841

```

<210> 35

< 211> 9192

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> vector

<400> 35

```

aattcctgtg  gttggcatgc  acatacaaat  ggacgaacgg  ataaccttt  tcacgccctt  60
ttaaatatcc  gattattcta  ataaacgctc  ttttctcta  ggtttaccgc  ccaatatatc  120
ctgtcaaaaa  ctgatagttt  aaacgggacc  cggcgcgcca  tttaaatggt  accggtccgc  180
gatctagtaa  catagatgac  accgcgcgcg  ataatttctc  ctagtttgcg  cgctatattt  240
tgttttctat  cgcgtattaa  atgtataaatt  gcgggactct  aatcataaaa  acccatctca  300
taaataacgt  catgcattac  atgttaatta  ttacatgctt  aacgtaattc  aacagaaatt  360
atatgataat  catcgtaaga  cggcaacag  gattcaatct  taagaaactt  tattgcaaaa  420
tgtttgaacg  atcgtcatat  gaagagctct  tagctcttct  gagcaacgac  agactgcttg  480
acttccagtg  acttctcgta  gtcctctatg  gacttgaaca  actcggaaaa  gttccccctt  540
ccaaacccac  cacatccacc  tttctggtac  tcttgcccaa  cttcatcctt  ctccatgcat  600

```

ES 2 619 279 T3

cctattcgct gaatcatttc gaggaaaaaa gtgggacgat caccaactgg tttggtgaag 660
 atctggagta gcacaccttg atcgtctcga tcaacgagaa caccagtttc ttgacactcc 720
 ttgatctggt cctctgacaa gacatctcca gcgattctac ggactccttc atagtacttg 780
 gcttgaggag gagccataaa ttcgaaccct cccattggag ttctggctct catttcctctg 840
 agagttcgaa gcacatcggt agaagccaat gcgatgtgtt gaactcctgg tccaccatgg 900
 tattcgaggt aggtttggat ctgagatcgt ctcttggttc catgaacagg ctcgttcaat 960
 ggcagaagaa cagcttcact gttggtggct agaaccacac tgttcagtcc agattctgtg 1020
 gttccaacat cctctgctgt gaattcagcg aactcgtgga aaccaaggaa tccctcoatg 1080
 tagtogatga caggagccat ttctggaacg ttccaacaa cgtggtcaaa gcgagtcaaa 1140
 ccgtagtcaa ctgcacctgg acttgaaacc ctctcgaatc ctgggagaaa tggtaggtca 1200
 gttcgtcag gatagctcac gaatctcaga accacatctc catacagctc cacttcagca 1260
 agtccaaatc cgtgaccaag atctgctgga gcaaaagcag gtcttctctc tccagcaaca 1320
 ctaacgcgaa atgcttcagc tgcacagca accctaactc caacagatct gacagcaagt 1380
 ccattgtcag cagcaaaagt tcttgcaaga tctgctgaaa aggagggaat ggaagcagtt 1440
 gcagcagttg cagcttcttg tggagtgga gcataaagg cggtaaaaag gaaggctaatt 1500
 gctccagatc gaagtaggag agaagcatgt gctgagttcc ctgtagacag atcagatctt 1560
 gcagcaagtg gtgctccaag tgcmaaagctg aaacgaccag cagcactagc tgcacagca 1620
 caccaaagct ccacatgatg gaaggacaga acagggaatc tgtcagaact agggttaacg 1680
 cgaacaactc tagggaatga ccttgcaaga tgttctggtg taacggcagc agcagcagct 1740
 ccagttagcag tagctggtgt tggaggcata tgtgtaattg taaatagtaa ttgtaatggt 1800
 gtttgttgtt tgttgttgtt ggttaattgt gtaaaaatac tccaggtttc ctctccaaat 1860
 gaaatgaaat cctatattat aggatcctct agagtgcag tgcagaagga tagtgggatt 1920
 gttcgtcatc ccttacgtca gtggagatat cacatcaatc cacttgcttt gaagcgtgg 1980
 ttggaacgtc ttcttttcc acgatgctcc tctggtgggg ggtccatct ttgggaccac 2040
 tgtcggcaga ggcattctca acgatagcct ttcctttatc gcaatgatgg catttgtagg 2100
 agccaccttc cttttccact atcttcacaa taaagtgaca gatagctggg caatggaatc 2160
 cgaggagggt tccggatatt accctttggt gaaaagtctc gagttttgtg gtcgtcactg 2220
 cgttcgtcat acgcattagt gagtgggctg tcaggacagc tcttttccac gttattttgt 2280
 tcccacttg tactagagga atctgcttta tctttgcaat aaaggcaag atgcttttgg 2340
 taggtcgcgc taacaattct gcaaccctcc ttttttctc ggtccccaca agcagctgcg 2400
 gccgcacgcg cccaattgat ttaaattggc gctgcggcca attcctgcag gcatgcaagc 2460
 ttgggtccgg catgcatgca gggatccaca tggagtcaaa gattcaataa gaggacctaa 2520
 cagaactcgc cgtaaagact ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca 2580
 agaagaaaat cttcgtcaac atgggtggagc acgacacgct tgtctactcc aaaaatatca 2640
 aagatacagt ctcagaagac caaaggccaa ttgagacttt tcaacaagg gtaatatccg 2700
 gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 2760
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 2820
 cctctgccga cagtgtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag 2880
 aagacgttcc aaccacgtct tcaaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 2940
 gggatgacgc acaatcccac tatcctcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtcat 3000
 ttcatttgga gaggacacgc tgaatcact agtatgagcc cagaacgagc cccggccgac 3060
 atccgcccgt ccaccgaggc ggacatgccc gggctctgca ccactcgtcaa ccaactacatc 3120
 gagacaagca cggccaactt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcaggagtg gacggacgac 3180
 ctcgtccgtc tgccgggagc ctatccctgg ctcgctgcgc aggtggagcg cgaggtcgc 3240
 ggcatcgcct acgcccggcc ctggaaggca cgcaacgctc acgactggac ggccgagtcg 3300
 accgtgtacg tctccccccg ccaccagcgg acgggactgg gctccacgct ctacaccac 3360
 ctgctgaagt ccctggaggc acagggcttc aagagcgtgg tctgctgtcat cgggctgccc 3420
 aacgaccoga ccgtgcgat gcacgagcgc ctcggatatg ccccccgcg catgctgcgg 3480
 gcggccggct tcaagcagcg gaactggcat gacgtgggtt tctggcagct ggacttcagc 3540
 ctgcccgtac cgcctcgtcc ggtcctgccc gtcaccgaga tatgaactag tgatatcggc 3600
 gccatgggtc gacctgcaga tctgtcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 3660
 cctgttgccg gcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattactg taagcatgta 3720
 ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtccc 3780
 caattataca ttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta 3840
 tccgcgcgcg tgtcatctat gttactagat ctgctagccc tgcaggaaat ttaccgggtc 3900
 ccgggcccgc agcatggccg tatccgcaat gtgttattaa gttgtctaag cgtcaatttg 3960
 tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg gcagctcggc 4020
 acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagaattaa ttctcatggt tgacagctta 4080
 tcatcgactg cacgggtgcac caatgcttct ggcgtcagge agccatcgga agctgtggta 4140
 tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa tctgctcgc tcaaggcgca ctcccgttct 4200
 ggataatggt ttttgcccg acatcataac ggttctggca aatattctga aatgagctgt 4260
 tgacaattaa tcatccggct cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 4320
 caggaaaacag accatgaggg aagcgttgat ccgccgaagta tgcactcaac tatcagaggt 4380
 agttggcgtc atcagagccc atctcgaacc gacgttctgt gccgtacatt tgtacggctc 4440
 cgcagtggat ggcggcctga agccacacag tgatattgat ttgctggtta cggtgaccgt 4500

ES 2 619 279 T3

aaggcttgat gaaacaacgc ggcgagcttt gatcaacgac cttttggaaa cttcggcttc 4560
ccctggagag agcgagattc tccgcgctgt agaagtcacc attgttgtgc acgacgacat 4620
cattccgtgg cgttatccag ctaagcgcga actgcaattt ggagaatggc agcgcaatga 4680
cattccttga ggtatcttgc agccagccac gatcgacatt gatctggcta tcttgctgac 4740
aaaagcaaga gaacatagcg ttgccttggg aggtccagcg gcggaggaac tctttgatcc 4800
ggttcctgaa caggatctat ttgaggcgct aatgaaacc ttaacgctat ggaactcgcc 4860
gcccgactgg gctggcgatg agcgaaatgt agtgcttacg ttgtcccgca tttggtacag 4920
cgcagtaacc ggcaaaatcg cgcgaaagga tgtcgtgccc gactgggcaa tggagcgcc 4980
gccggcccag taccagcccg tcatacttga agctaggcag gcttatcttg gacaagaaga 5040
tcgcttggcc tcgcgcgag atcagttgga agaatttgtt cactacgtga aaggcgagat 5100
caccaaaagta gtcggcaaat aaagctctag tggatctccg taccagggga tctggctcgc 5160
ggcggacgca gcagccggg gcgagaccat aggcgatctc ctaaatcaat agtagctgta 5220
acctcgaagc gtttcaactg taacaacgat tgagaatttt tgcataaaa ttgaaatact 5280
tggttcgcat ttttgcctc cgcggtcagc cgcaattctg acgaaactgcc catttagctg 5340
gagatgattg tacatccttc acgtgaaat ttctcaagcg ctgtgaacaa gggttcagat 5400
tttagattga aaggtgagcc gttgaaacac gttcttcttg tcgatgacga cgtcgtatg 5460
cggcatctta ttattgaata ccttacgatc cacgccttca aagtgaccgc ggtagccgac 5520
agcaaccagt tcacaagagt actctcttcc gcgacggtcg atgtcgtggt tgttgatcta 5580
gatttagctc gtcgaagatg gctcgagatc gttcgtaatc tggcggcaaa gtctgatatt 5640
ccaatcataa ttatcagtg gcacccgctt gaggagacgg ataaagtgtg tgcactcgag 5700
ctaggagcaa gtagtttat cgtcaagccg ttcagtatca gagagtttct agcagcatt 5760
cgggttgcct tgcgctgcg cccaacggtt gtcgctcca aagaccgacg gtccttttgt 5820
ttactgact ggacacttaa tctcaggcaa cgtcgttga tgtccgaagc tggcggtag 5880
gtgaaactta cggcagtgta gttcaatctt ctctcgcgt ttttagagaa acccccgac 5940
gttctatcgc gcgagcaact tctcattgcc agtcgagtac gcgacgagga ggtttatgac 6000
aggagttag atgttctcat tttgaggctg cgcgcgcaac ttgaggcaga tccgtcaagc 6060
cctcaactga taaaacagc aagaggtgcc ggttatttct ttgacgcgga cgtgcaggtt 6120
tcgcacgggg gacgatggc agcctgagcc aattcccaga tcccagagga atcggcgtga 6180
cgggtcgcaa accatccggc ccggtacaaa tcggcgcggc gctgggtgat gacctggtg 6240
agaagtga aagccgcgag cgcgcccagc ggcaacgcag cgaggcagaa gcacgccc 6300
gtgaatcgtg gcaagcggcc gctgatcgaa tccgcaaaga atcccggcaa ccgcccggc 6360
cgggtgcgcc gtcgattagg aagccgcca agggcgacga gcaaccagat ttttctgctc 6420
cgtgctcta tgacgtggc acccgata gtcgagcat catggacgtg gccgttttcc 6480
gtctgtcgaa gcgtgacga cgagctggcg aggtgatccg ctacgagctt ccagacgggc 6540
acgtagaggt tccgcaggg ccggccggca tggccagtgt gtgggattac gacctggtac 6600
tgatggcggg tcccatcta accgaatcca tgaaccgata ccgggaaggg aagggagaca 6660
agcccggccg cgtgttccgt caacacgttg cggacgtact caagttctgc cggcgagccg 6720
atggcggaaa gcagaaagac gacctggtag aaacctgcat tcggttaaacc accacgcacg 6780
ttgccatgca gcgtacgaa aagcccaaga acggccgctt ggtgacggta tccgagggg 6840
aagccttgat tagccgctac aagatcgtaa agagcgaaac cgggcccggc gagtacatcg 6900
agatcgagct ggctatggg atgtaccgag agatcacaga aggcaagaac ccggacgtgc 6960
tgacggttca cccgatcac tttttgatcg atcccggcat cggccgtttt ctctaccgcc 7020
tggcacgccc cgcgcgagc aaggcagaag ccagatggtt gttcaagacg atctacgaac 7080
gcagtggcag cgcgggagag tccaagaagt tctgttccac cgtgcgcaag ctgatcgggt 7140
caaatgacct gccggagtag gatttgaagg aggagccggg gcaggctggc ccgatcctag 7200
tcatgcgcta ccgcaacctg atcgaggcg aagcatccgc cggttcctaa tgtacggagc 7260
agatgctagg gcaaattgcc ctgacggggg aaaaaggtcg aaaaggtctc tttcctgtg 7320
atagcacgta cattgggaac ccaaagccgt acattgggaa ccggaaccgg tacattggga 7380
acccaaagcc gtacattggg aacoggtcac acatgtaagt gactgatata aaagagaaa 7440
aaggcgattt tccgcctaa aactctttaa aacttattaa aactcttaa accccgctg 7500
cctgtgcata actgtctggc cagocacag ccgaagagct gcaaaaagcg cctacccttc 7560
ggtcgtgctg ctcctacgc cccgcccctt cgcgtcggcc tatcgcgcc gctggccgct 7620
caaaaatggc tggcctacgg ccaggcaatc taccagggcg cggacaagcc gcgcccgtc 7680
cactcgaccg ccggcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttctgac tcataaccag 7740
cctgaatcgc cccatcatcc agccagaag tgaggagcc acggttgatg agagctttgt 7800
tgtaggtgga ccagttggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt 7860
cggaagatg cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaagcc 7920
gccgtcccgt caagtacgag taatgctctg ccaggttac aaccaattaa ccaattctga 7980
ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 8040
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacoga ggcagttcca 8100
taggatggca agatcctggt atcggctgac gattccgact cgtccaacat caatacaacc 8160
tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagttag aaatcaccat gactgacgac 8220
tgaatccggt gagaatggca aaagctctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 8280
gcggtttgag tatggggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg 8340
ttcggctgag gcgagcggtg tcagctcact caaagccggt aatacgttga tccacagaat 8400

ES 2 619 279 T3

caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaggcc aggaaccgta 8460
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaa 8520
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 8580
cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 8640
ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca 8700
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 8760
accgctgocg cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccggtaga cacgacttat 8820
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 8880
cagagttcct gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 8940
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 9000
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaa 9060
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 9120
actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 9180
tgatccggaa tt 9192

<210> 36

< 211> 11205

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> vector

<400> 36

attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt 60
taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatatatcc 120
tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaacgac aatctgatca tgagcggaga 180
attaaggggag tcacgttatg acccccgcg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 240
aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaa tcaattggggc 300
gcgtacgtag cactagttaa ttccggacc aagcttgcag gcttgcagga attggccgca 360
gcggccattt aaatcaattg ggcgctgctg gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaa 420
aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaa 480
gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaa gagctgtcct 540
gacagcccac tcaactaatgc gtatgacgaa cgcagtgcag accacaaaac tcgagacttt 600
tcaacaaggg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 660
tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 720
aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtggctcc aaagatggac cccaccacc 780
gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg 840
tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatcccac tatocttctg caggctcgact 900
ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gagtatcttt 960
acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt tacaattaca 1020
catatgcttc caacaccagc tactgctact ggagctgctg ctgctgccgt tacaccagaa 1080
catgctgcaa ggtcattccc tagagttggt gcggttaacc ctaggtctga cagattccct 1140
gttctgtcct tccatcatgt ggagcttgg tgtgctgatg cagctagtgc tgctggtcgt 1200
ttcagctttg cacttggagc accacttgc gcaagatctg atctgtctac agggaaactca 1260
gcacatgctt ctctoctact togatctgga gcattagcct tcctttttac cgctccttat 1320
gctccacctc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattccctc cttttcagca 1380
gatgctgcaa gaacctttgc tgctgcacat ggacttgcctg tcagatctgt tggagttagg 1440
gttgctgatg cagctgaagc atttcgcgtt agtgttgcctg gaggagcaag acctgctttt 1500
gctccagcag atcttgggtca cggatttggg cttgctgaag tggagctgta tggagatgtg 1560
gttctgagat tctgtgagta tctgtacgaa actgacctac catttctccc aggattcgag 1620
agggtttcaa gtccagggtc agttgactac ggtttgactc gctttgacca cgttgttggg 1680
aacgttccag aaatggctcc tgtcatcgac tacatgaagg gattccttgg tttccacgag 1740
ttcgctgaat tcacagcaga ggatgttggg accacagaat ctggaatgaa cagtgtgggt 1800
ctagccaaca acagtgaagc tgttctctctg ccattgaacg agcctgttca tggaaaccaag 1860
agacatctc agatccaac ctacctgaa taccatggtg gaccagagt tcaacacatc 1920
gcattggctt ctaacgatgt gcttcgaact ctcaaggaaa tgagagccag aactccaatg 1980
ggagggttcg aatttatggc tctccacaa gccaaactat atgaaggagt ccgtagaatc 2040
gctggagatg tcttgtcaga ggaacagatc aaggagtgtc aagaactggg tgttatgggt 2100
gatcgagacg atcaagggtg gctactccag atcttcacca aaccagttgg tgatcgtccc 2160
acttttttcc tcgaaatgat tcagcgaata agaggtatga agttgggcaa 2220
gagtaccaga aagggtgatg tgggtgggtt ggaaagggga acttttccga gttgttcaag 2280
tccatagagg actacgagaa gtcactggaa gtcaagcagt ctgtcgttgc tcagaagagc 2340

ES 2 619 279 T3

taagagctct tcatatgacg atcgttcaaa catttgccaa taaagtttct taagattgaa 2400
 tcctggttgc ggtcttgaga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 2460
 aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc 2520
 gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaact aggataaatt 2580
 atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgcgggaccg aagcttgcat gcctgcagggt 2640
 cgactctaga ggatctggga cccagtc meta gattca meta gaggacctaa cagaactcgc 2700
 cgtaaagact ggcaacagc tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat 2760
 cttcgtcaac atggtggagc acgacacgct tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt 2820
 ctcaagaagc caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatocg gaaacctcct 2880
 cggattccat tgcaccagta tctgtcactt tattgtgaag atagtg meta aggaaagggtg 2940
 ctccatacaa tggccatcatt gcgataaaag aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga 3000
 cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gtgg meta aagacgttcc 3060
 aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc 3120
 acaatcccac tatccttcgc aagaccttc ctctataaa ggaagttcat ttcatttggga 3180
 gaggacacgc tgaatcact agtccaccat gtctccggag aggagaccag ttgagattag 3240
 gccagctaca gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaccatt acattgagac 3300
 gtctacagtg aactttagga cagagccaca aacacc meta gagtggattg atgatctaga 3360
 gaggttgcaa gatagatacc cttggttggt tgctgaggtt gagggtggtg tggctggtat 3420
 tgcttacgct aggttg meta aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt 3480
 ttacgtgtca cataggcatc aaaggttggg cctaggatcc acattgtaca cacatttgc 3540
 taagtctatg gaggcgcaag gttttaagtc tgggttgcct gttataggcc tcc meta 3600
 tccatctggt aggttgcatg aggctttggg atacacagc cggggtacat tgcgcgcagc 3660
 tggatacaag catgggtggat ggcgatgatg tggttttgg caaagggtt ttgagttgcc 3720
 agctcctcca aggccagtta gcccagttac ccagatctga actagtgata tggcgcctat 3780
 gggtcgacct gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 3840
 tgcggtctt cgatgatta tcatataatt tctggtgaat tacgttaagc atgtaataat 3900
 taacatgtaa tgcagatcgt tatttatgag atgggtttt atgattagag tcccgc aatt 3960
 atacatttaa tacgcgatag aaa meta atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 4020
 cgcggtgtca tctatgttac tagatccgga cccagctgct tgtggggacc ag meta 4080
 ggaatgtgc agaattgtta ggcgcacct ccaaaagcat ctttgccttt attg meta 4140
 taaagcagat tccctctagta caagtgggga a meta gtgg meta gctgtcctga 4200
 cagcccactc actaatgctg atgacgcaag cagtgcacgc cac meta gagacttttc 4260
 aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta 4320
 ttgtgaagat agtg meta gaaggtggct cct meta ccatcattgc gataaaggaa 4380
 aggcctatcgt tgaagatgcc tctgcccaca gtggtcccaa agatggacc ccaccacga 4440
 ggagcatcgt g meta gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagt gattgatgtg 4500
 atactccac tgacgtaagg gatgacgaac aatcccacta tccctctgcc ggaccctcat 4560
 gagcggagaa ttaagggtgac caggttatga cccccgcga tgacgcggga caagcgttt 4620
 tacgttttga actgacagaa ccgcaacgaa gctttggcag a meta agacatactg 4680
 tccc meta gaagatgaa tctg meta aaaacgcgtg aa meta tctg meta 4740
 gttagggtcgg tgcctttaa tcaatac meta agtggtccct acccagatgg a meta 4800
 cagtgcgttt ggcttttct gacga meta taagattcgt ggccgacagg tgggggtcca 4860
 ccatgtgaag gcactctcag actcc meta tggagcaatg acgtaagggc ttacg meta 4920
 agt meta gtttgg meta gtcccactca cccgtcagtc t meta tagccctcc 4980
 ctcattgtta agggag meta atctcagaga gatagtccta gagag meta gagagcaagt 5040
 agcctagaag tggatccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat taggccagct 5100
 acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgttaacc attacattga gacgtctaca 5160
 gtgaacttta ggacagagcc a meta caagagtgga ttgatgatct agagaggttg 5220
 caagatagat acccttggtt ggttgctgag gttgagggtg ttgtggctgg tattgcttac 5280
 gctgggcccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg 5340
 tcatatagc at meta gggcctagga tctacattgt acacacattt gcttaagtct 5400
 atggaggcgc aagggtttaa gtctgtggtt gctgttatag gcctt meta ccatcct 5460
 gttagggttc atgaggcttt gggatacaca gccggggtta cattgcgcgc agctggatac 5520
 aagcatggtg gatggcatga tgtttggttt tgg meta attttgagtt gccagctcct 5580
 ccaaggccag ttaggccagt taccagata tgagtcgagc tctagatccc cgaatttccc 5640
 cgatcgttca aacatttggc a meta cttagattg aatcctgttg ccggtcttgc 5700
 gatgattatc at meta tgttgaatta cgtaagcat gta meta acatgtaatg 5760
 catgacgtta ttatgagat gggttttat gattagatc ccgcaattat acatt meta 5820
 cgcgatagaa a meta agcgcg meta ctagg meta ttatcgcgcg cgggtgcctc 5880
 tatgttacta gatcgggaat tgggtacat gccggggcgg ccagcatggc cgtatccgca 5940
 atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc acaatatatc ctgccaccag 6000
 ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gc meta accactcgt acaggcagcc 6060
 catcagaatt aattctc atgttgacagct tcatcagac tgcacgggtg acca atgctt 6120
 ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggctgtaa atcactgcat 6180
 aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctgg meta ttttttgcgc cgacatcata 6240

ES 2 619 279 T3

acggttctg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatccgg ctcgtataat 6300
gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agaccatgag ggaagcgttg 6360
atcgccgaag tatcgactca actatcagag gtagtggcg tcacgcagcg ccatctcgaa 6420
ccgacgttgc tggccgtaca ttgttacggc tccgcagtg atggcggcct gaagccacac 6480
agtgatattg atttgctggt tacggtgacc gtaaggcttg atgaaacaac gcggcgagct 6540
ttgatcaacg accttttggg aacttcggct tcccctggag agagcgagat tctccgcgct 6600
gtagaagtca ccattgttgt gcaocgagac atcattccgt ggcgttatcc agctaagcgc 6660
gaactgcaat ttgggaaatg gcagcgcaat gacattcttg caggtatctt cgagccagcc 6720
acgatcgaca ttgatctggc tatcttctg acaaaagcaa gagaacatag cgttgccttg 6780
gtaggtccag cggcgggagga actccttggat ccggttcctg aacaggatct atttgaggcg 6840
ctaaatgaaa ccttaacgct atggaactcg ccgcccgaact gggctggcga tgagcgaaat 6900
gtagtctta cgttgcctcg catttggtag agcgcagtaa ccggcaaaat cgcgcgaaag 6960
gatgtcgtg ccgactgggc aatggagcgc ctgccggccc agtatcagcc cgtcatactt 7020
gaagctaggc aggttatct tggacaagaa gatcgccttg cctcgcgcgc agatcagttg 7080
gaagaatttg ttcactacgt gaaaggcag atcaccaaag tagtcggcaa ataaagctct 7140
agtggatctc cgtaccggg gatctggctc gcggcggacg cagcagcccg gggcgagacc 7200
ataggcgatc tcctaataca atagtagctg taacctcgaa cgcgttctact tgtaacaacg 7260
attgagaatt ttgtcataa aattgaaata ctgggtctgc atttttgtca tccgcggtca 7320
gccgcaattc tgacgacctg cccatttagc tggagatgat tgtacatctt tcacgtgaaa 7380
atltctcaag cgtgtgaac aagggttcag attttagatt gaaagtgag ccggtgaaac 7440
acgttctctc tgcgatgac gacgtcgtca tgcggcatct tattattgaa taccttacga 7500
tcccacgctt caagatgacc cggtagccg acagacccca gttcacaaag gtaactctct 7560
ccgcgacggt cgatgtcgtg gttggtgatc tagatttagg tctgtaagat gggctcgaga 7620
tcgttctgaa tctggcggca aagtctgata ttccaatcat aattatcagt ggcgacggcc 7680
ttgaggagac ggataaagtt gttgcaactg agctaggagc aagtgatctt atcgttaagc 7740
cagttcagat caagagttt ctagcacgca ttcgggttgc cttgcgcgtg cgcaccaacg 7800
ttgtccgctc caaagaccga cggctctttt gtttactga ctggacactt aatctcaggg 7860
aacgtcgtct gatgtccgaa gctggcggtg aggtgaaact tacggcaggt gagttcaatc 7920
ttctctcgc gtttttagag aaaocccgag acgttctatc gcgcgagcaa cttctcattg 7980
ccagtcagat acgcgacgag gaggtttatg acaggagtat agatgttctc attttgaggc 8040
tgcgcgcaa acttgaggca gatccgtcaa gcctcaact gataaaaaa gcaagaggtg 8100
ccggttattt ctttgacgcg gacgtgcaag tttcgcacgg ggggacgatg gcagcctgag 8160
ccaattccca gatccccgag aatcggcgt gacgggtcgc aaaccaatcc gcccggtaac 8220
aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc agggccgcca 8280
gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc cggtgatcgc tggcaagcgg ccgctgatcg 8340
aatccgcaaa gaatccccg aaccgcccgc agccggtgag ccgtcgatta ggaagccgcc 8400
caagggcgac gagcaaccag atttttcgt tccgatgctc atgacgtgg gcaaccgcca 8460
tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg 8520
cgaggtgatc cgtacgagc tccagacgg gcacgtagag gtttcccgag ggccggccgg 8580
catggccagt gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc 8640
catgaaacga taccgggaa ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacactg 8700
tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc cgatggcggg aagcagaaag acgacctggt 8760
gaaaacctgc attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaagggcaa 8820
gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt 8880
aaagagcgaa accgggcccg cggagtagat cgagatcgag cttagctgatt ggatgtaccg 8940
cgagatcaca gaaggcaaga acccgacggt gctgacggtt caccocgatt actttttgat 9000
cgatccccgc atcgccggtt ttctctaccg cctggcagcg cgcgcccag gcaaggcaga 9060
agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgcgggag agttcaagaa 9120
gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgcccggag acgatttgaa 9180
ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg 9240
cgaagcatcc gccggttctt aatgtacgga gcagatgcta gggcaaatg ccttagcagg 9300
ggaaaaaggt cgaaaaagtc tctttctgt ggatagcacg tacattggga acccaagcc 9360
gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg gaacccaag ccgtacattg ggaaccggctc 9420
acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgt ttttccgctt aaaactctt 9480
aaaacttatt aaaactctta aaaccgctt ggctgtgca taactgtctg gccagcgcac 9540
agccgaagag ctgcaaaaag gcctaccct tcggtcgtg cgtccctac gccccgccc 9600
ttcgcgctcg cctatcgcgg ccgctgccc ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa 9660
tctaccaggg cgcggacaag ccgcgcccgc gccactcgac cgcggcgct gaggtctgcc 9720
tcgtgaagaa ggtgttctg actcatacca ggctgaaatc gcccctcat ccagccagaa 9780
agtgagggag ccacggttga tgagagcttt gttgtaggtg gaccagttgg tgatttttaa 9840
cttttcttt gccacggaac ggtctgctt gtcggaaga tgcgtgatct gatccttcaa 9900
ctcagcaaaa gttogattta ttcaacaag ccgcccctcc gtaagtcag cgtaatgctc 9960
tgccagttt acaaccaatt aaccaattc gattagaaaa actcatcgag catcaaatga 10020
aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag ccggttctgt 10080
aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcggctc 10140

ES 2 619 279 T3

```

gcgattccga ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg 10200
ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagctct 10260
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc 10320
ttcctcgttc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 10380
ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgtg 10440
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcggtgctgg cgtttttcca 10500
taggtccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 10560
cccacagga ctataaagat accaggcgtt tcccctgga agctccctcg tgcgctctcc 10620
tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct gtccccttt ctccctcgg gaagcgtggc 10680
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct 10740
gggctgtgtg cacgaacccc ccggttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 10800
tcttagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 10860
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 10920
cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg 10980
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 11040
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 11100
ttctacgggg tctgacgctc agtgaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 11160
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttgatccgg aatta 11205

```

<210> 37

< 211> 9

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 37

```

Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val
 1           5

```

10 <210> 38

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 38

```

Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val
 1           5

```

<210> 39

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 39

```

Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
 1           5

```

25

<210> 40

< 211> 9

< 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 5 <400> 40
 His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 1 5
 <210> 41
 < 211> 9
 < 212> PRT
 10 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 41
 Asn Val Pro Glu Met Ala Pro Val Ile
 1 5
 15 <210> 42
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 42
 Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr
 1 5
 <210> 43
 < 211> 9
 25 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 43
 Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser
 30 1 5
 <210> 44
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 35 <220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 44
 Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val
 1 5
 <210> 45
 5 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 10 <400> 45
 Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu
 1 5
 <210> 46
 < 211> 9
 < 212> PRT
 15 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 46
 Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala Asn
 1 5
 20 <210> 47
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 47
 Leu Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn
 1 5
 <210> 48
 < 211> 9
 30 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 48

Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 1 5
 <210> 49
 < 211> 9
 < 212> PRT
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 49
Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu
 1 5
 10 <210> 50
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 50
Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val
 1 5
 <210> 51
 < 211> 9
 20 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 51
Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His
 1 5
 25 <210> 52
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 52
His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile
 1 5
 <210> 53

< 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 53
Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr
 1 5
 <210> 54
 < 211> 9
 10 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 54
Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His
 15 1 5
 <210> 55
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 55
Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 56
 25 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 30 <400> 56
Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser
 1 5 10
 <210> 57
 < 211> 9
 < 212> PRT
 35 < 213> Secuencia Artificial

<220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 57
 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln
 1 5
 5 <210> 58
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 58
 Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala
 1 5
 <210> 59
 < 211> 9
 15 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 59
 Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr
 20 1 5
 <210> 60
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 60
 Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg
 1 5
 <210> 61
 30 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 35 <400> 61

Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val
 1 5

<210> 62

< 211> 9

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 62

Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
 1 5

10 <210> 63

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 63

Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val
 1 5

<210> 64

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 64

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly
 1 5

25 <210> 65

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

30 <220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 65

Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg
 1 5

<210> 66

< 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 66
 Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile
 1 5
 <210> 67
 < 211> 9
 10 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 67
 Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly
 1 5
 15 <210> 68
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 68
 Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly
 1 5
 <210> 69
 25 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 30 <400> 69
 Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 1 5
 <210> 70
 < 211> 9
 < 212> PRT
 35 < 213> Secuencia Artificial

<220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 70
 Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 1 5

5 <210> 71
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

10 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 71
 Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu
 1 5

<210> 72
 < 211> 9

15 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 72

20 Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys
 1 5

<210> 73
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial

25 <220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 73

Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser
 1 5

<210> 74

30 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

35 <400> 74

Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr
 1 5
 <210> 75
 < 211> 9
 < 212> PRT
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 75
 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu
 1 5
 10 <210> 76
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 76
 Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp
 1 5 10
 <210> 77
 < 211> 10
 20 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 77
 His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln
 1 5 10
 25 <210> 78
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa
 <400> 78
 Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln
 1 5
 <210> 79

< 211> 12

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 79

Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro
1				5					10		

<210> 80

< 211> 10

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

<400> 80

Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys
1				5					10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD que tiene actividad enzimática de HPPD, donde dicho polinucleótido deriva de una planta y donde dicho polipéptido de HPPD vegetal codificado por dicho polinucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con SEC ID NO: 27 y comprende la secuencia de aminoácidos G(I,V)LVD(R,K)D (SEC ID NO: 30), donde la L se sustituye por M.
2. El polinucleótido según la reivindicación 1, donde dicho polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD vegetal que tiene actividad enzimática de HPPD comprende además al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:
- 10 a) RFDHVGVNV (SEC ID NO: 38), donde la primera V se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- b) FEFMAPPQA (SEC ID NO: 58), donde la primera A se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- c) GVRRIAGDV (SEC ID NO: 61), donde la I se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- d) GGCGGFGKG (SEC ID NO: 68), donde la cuarta G se sustituye por cualquier otro aminoácido; o
- e) GFGKGNFSE (SEC ID NO: 70), donde la tercera G se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 15 3. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la secuencia nucleotídica está optimizada para la expresión en una planta.
4. Un polipéptido codificado por el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un casete de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, enlazado operablemente a un promotor que dirige la expresión en una planta o célula vegetal.
- 20 6. El casete de expresión de la reivindicación 5 que comprende además una secuencia polinucleotídica enlazada operablemente que codifica un polipéptido que confiere un rasgo deseable.
7. El casete de expresión de la reivindicación 6, donde dicho rasgo deseable es la resistencia o tolerancia a un herbicida.
8. El casete de expresión de la reivindicación 7, donde dicho rasgo deseable es la resistencia o tolerancia a un inhibidor de HPPD, glifosato o glufosinato.
- 25 9. El casete de expresión de la reivindicación 6, donde dicho polipéptido que confiere un rasgo deseable es un citocromo P450 o una variante del mismo.
10. El casete de expresión de la reivindicación 6, donde dicho polipéptido que confiere un rasgo deseable es una EPSPS (5-enol-pirovil-chiquimato-3-fosfato-sintasa).
- 30 11. El casete de expresión de la reivindicación 6, donde dicho polipéptido de confiere un rasgo deseable es una fosfinotricin acetil transferasa.
12. Un vector que comprende un casete de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
13. El vector de la reivindicación 12, donde dicho vector comprende un polinucleótido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID NOs: 33, 34, 35 o 36.
- 35 14. Un método para conferir resistencia o tolerancia a un inhibidor de HPPD en una planta, comprendiendo dicho método introducir en dicha planta al menos un casete de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
15. Una célula vegetal transformada que comprende al menos un casete de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
- 40 16. La célula vegetal de la reivindicación 15, donde dicha célula vegetal es una célula vegetal de arroz, cebada, patata, boniato, canola, girasol, centeno, avena, trigo, maíz, haba de soja, remolacha azucarera, tabaco, pasto *Miscanthus*, pasto varilla, cártamo, árboles, algodón, mandioca, tomate, sorgo, alfalfa, remolacha azucarera o caña de azúcar.
17. La célula vegetal de la reivindicación 16, donde dicha célula vegetal es una célula vegetal de haba de soja.
- 45 18. Una planta, parte de una planta, o semilla que comprende la célula vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

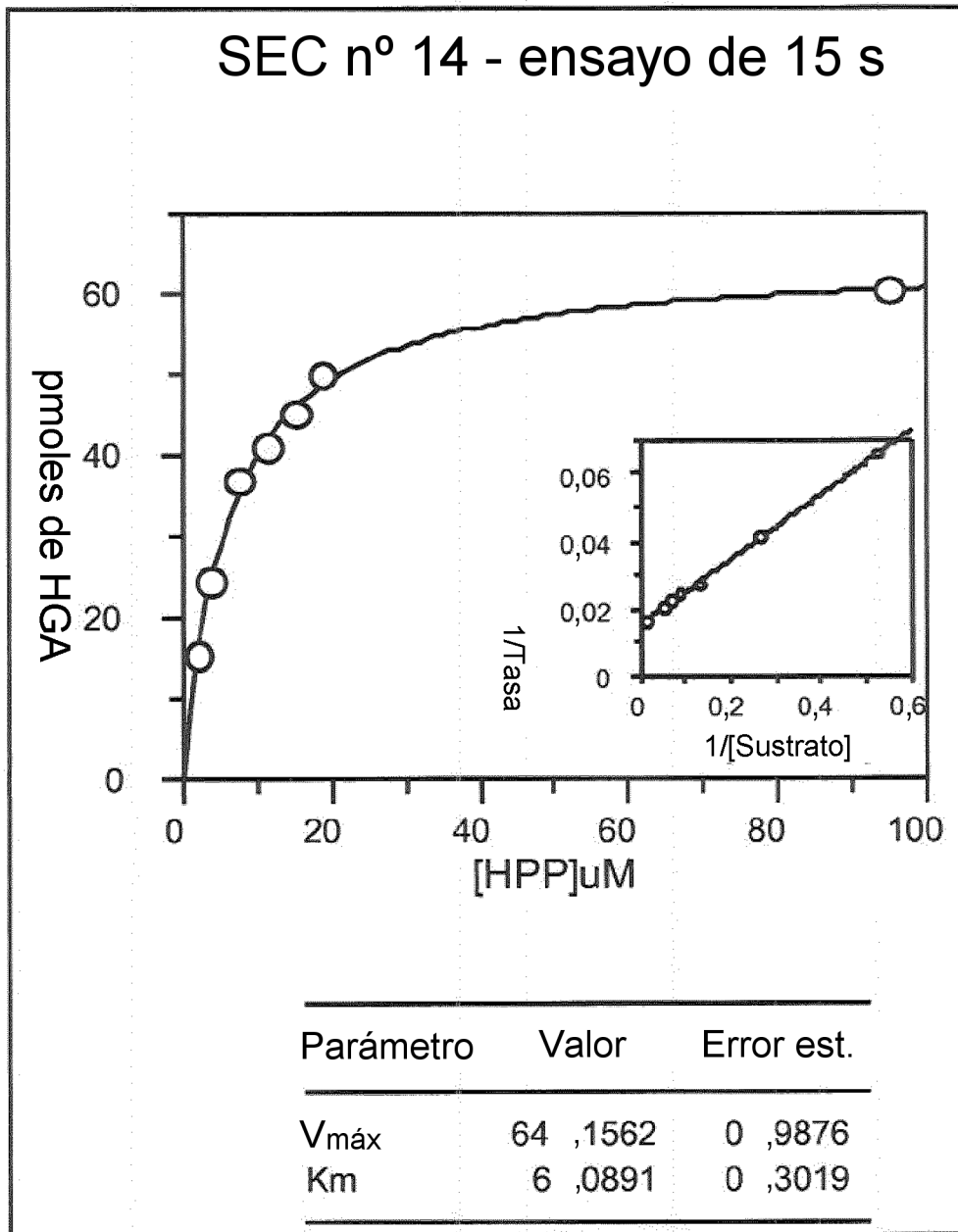


FIG. 1

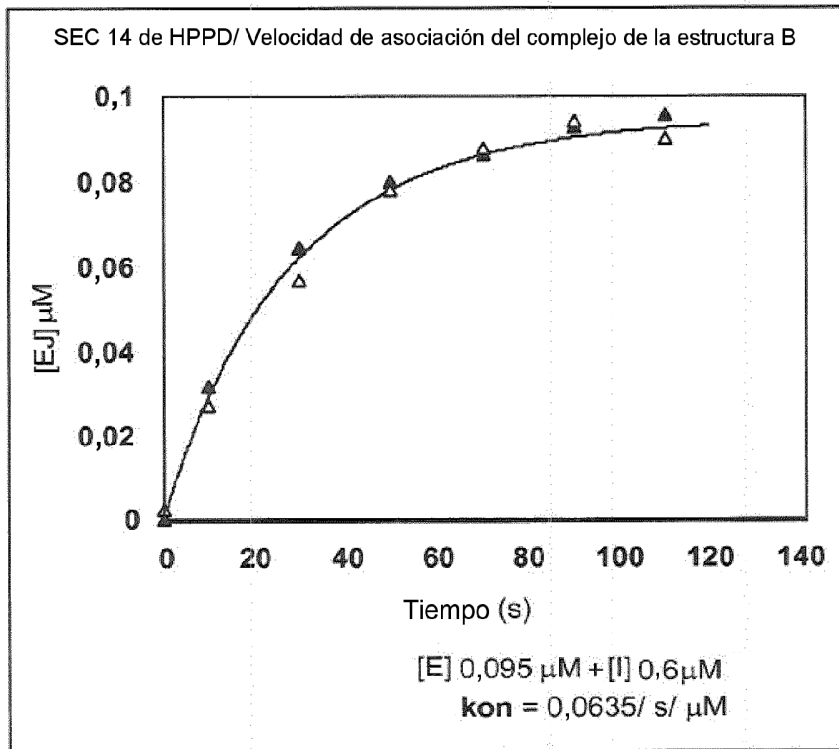


FIG. 2A

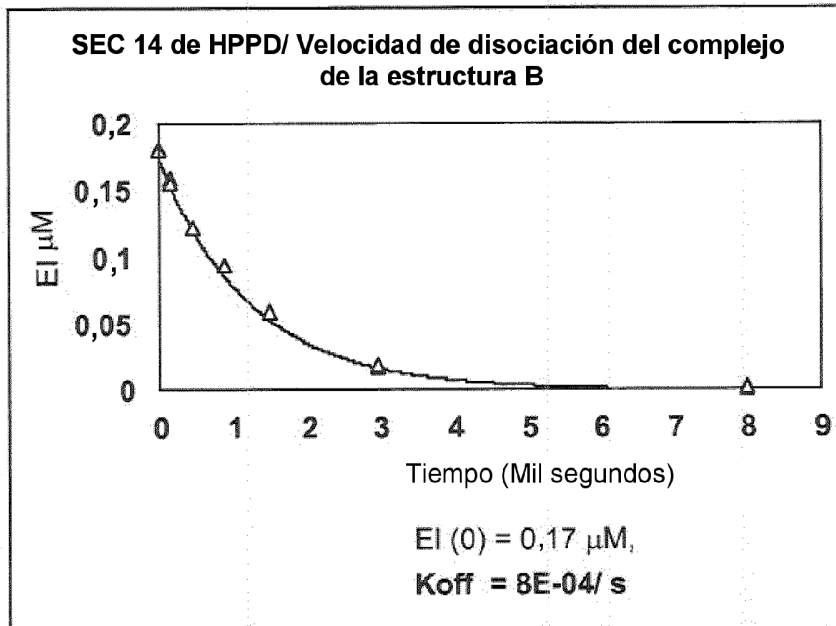


FIG. 2B

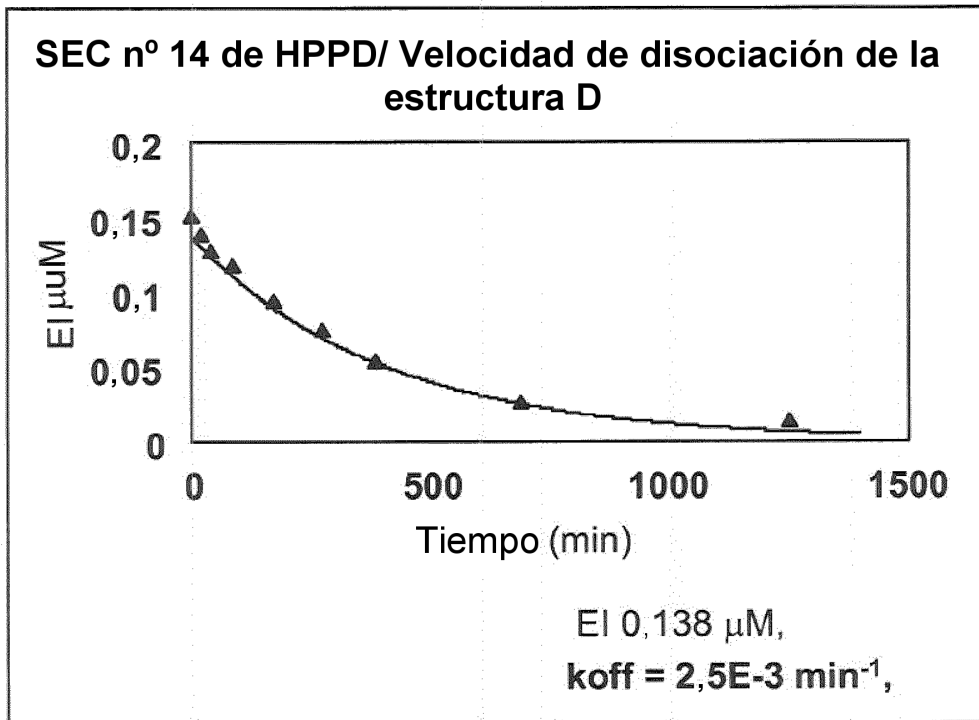


FIG. 3

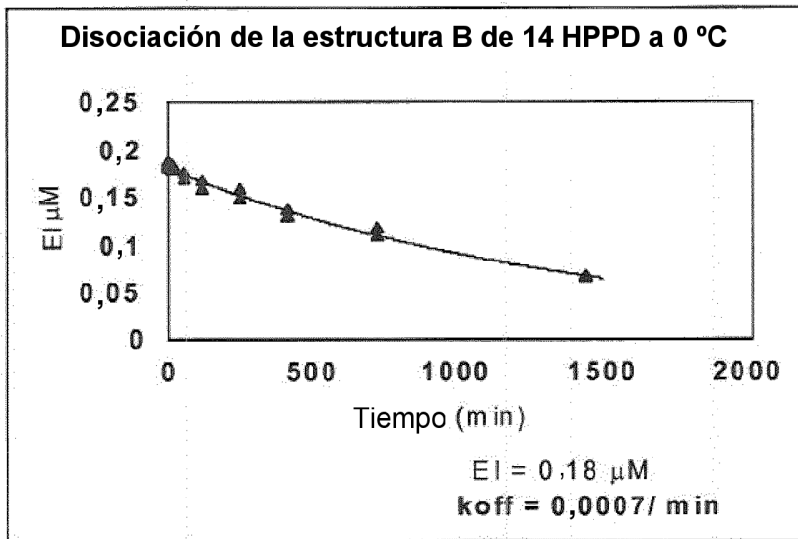


FIG. 4A

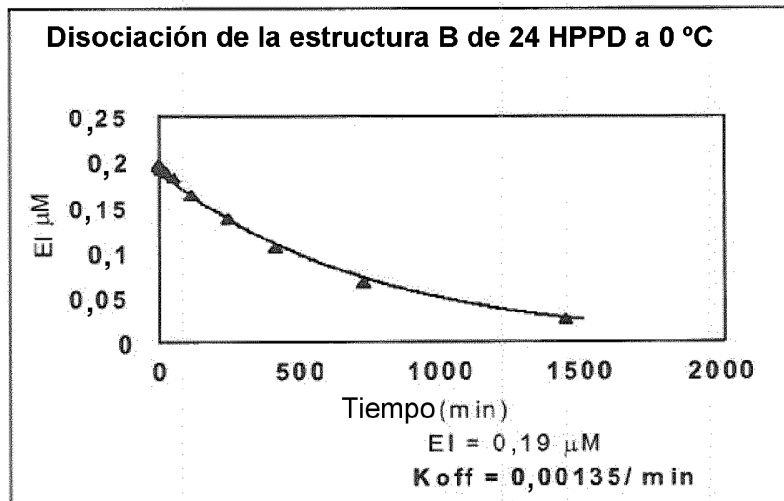


FIG. 4B

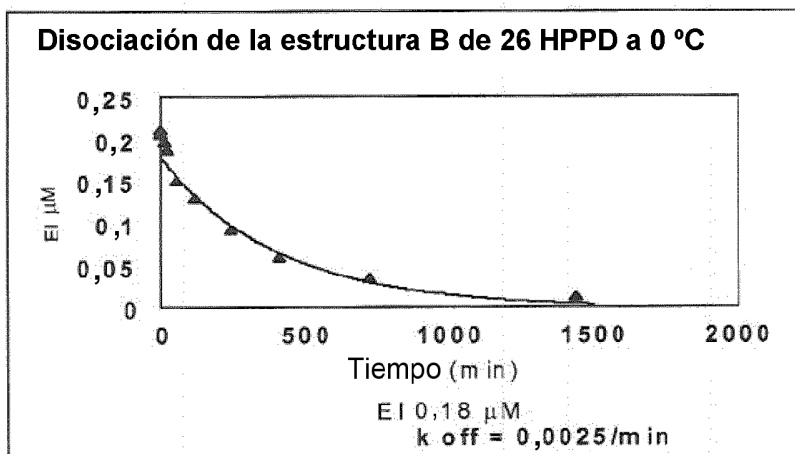


FIG. 4C

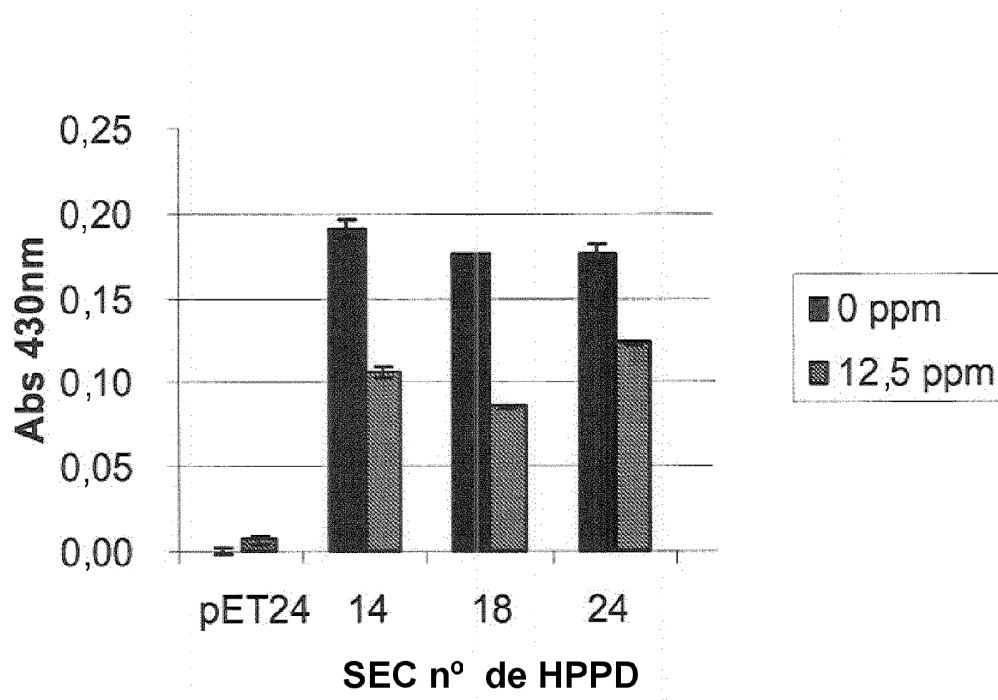


FIG. 5

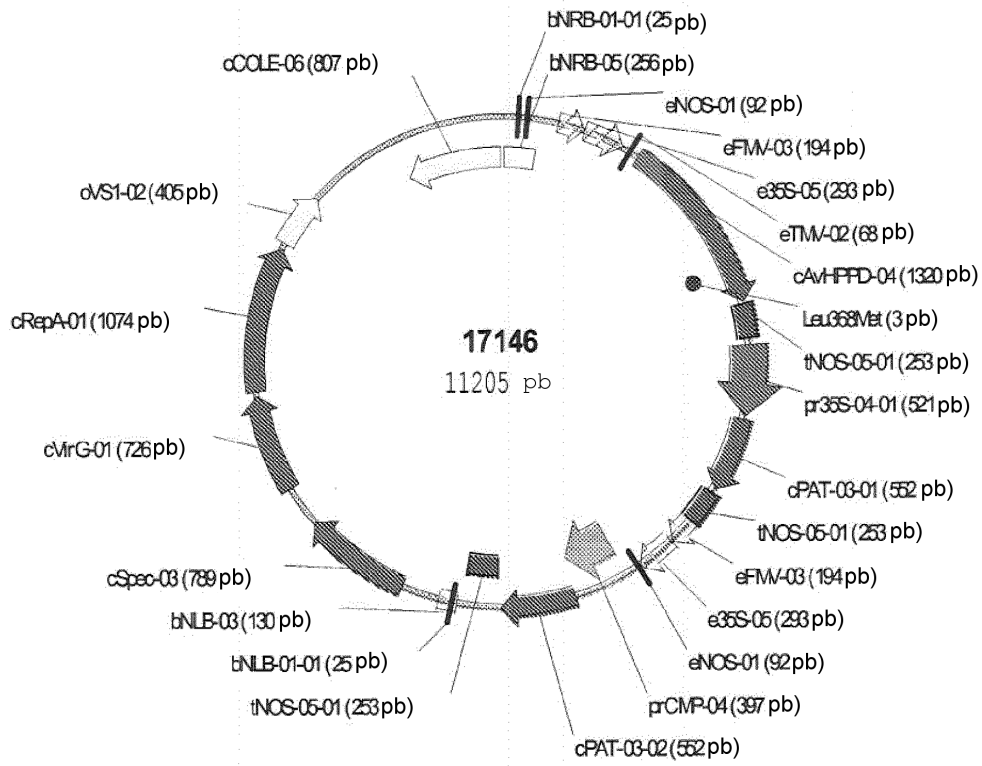


FIG. 6

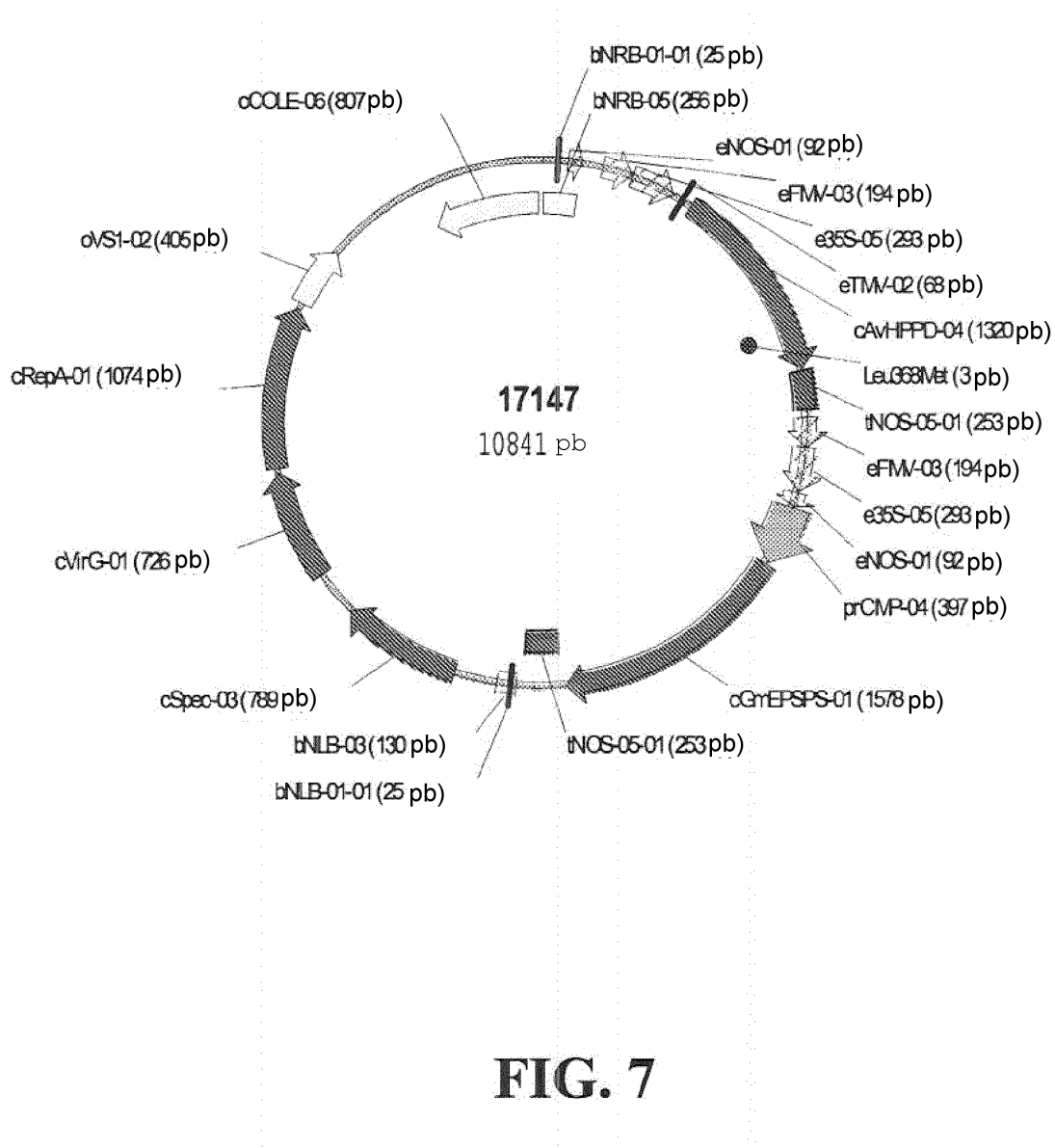


FIG. 7

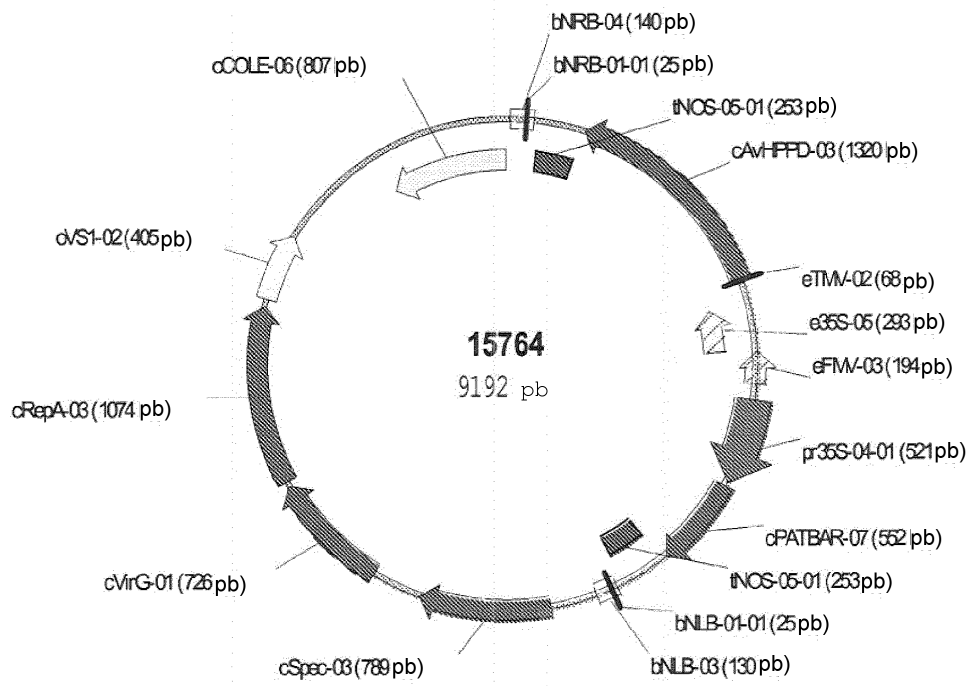


FIG. 8

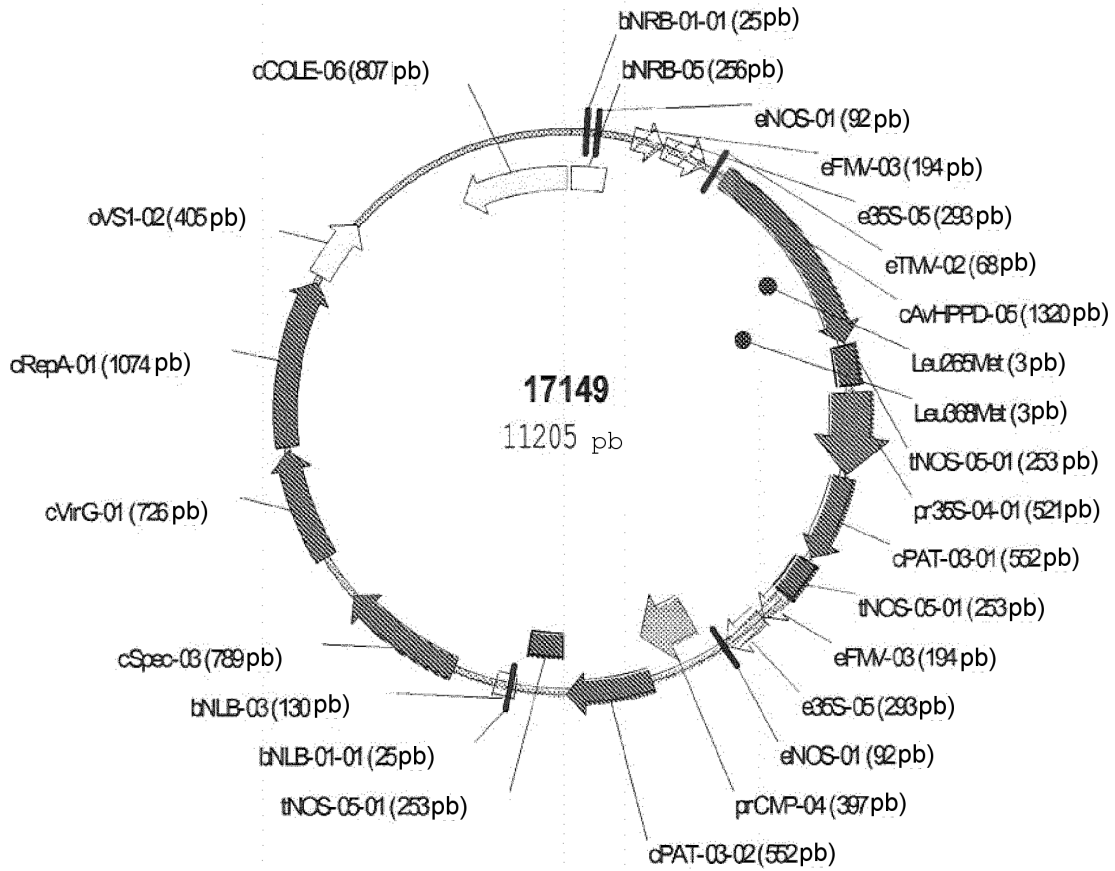


FIG. 9

Inhibición por B de SEC ID NO: 14 de HPPD

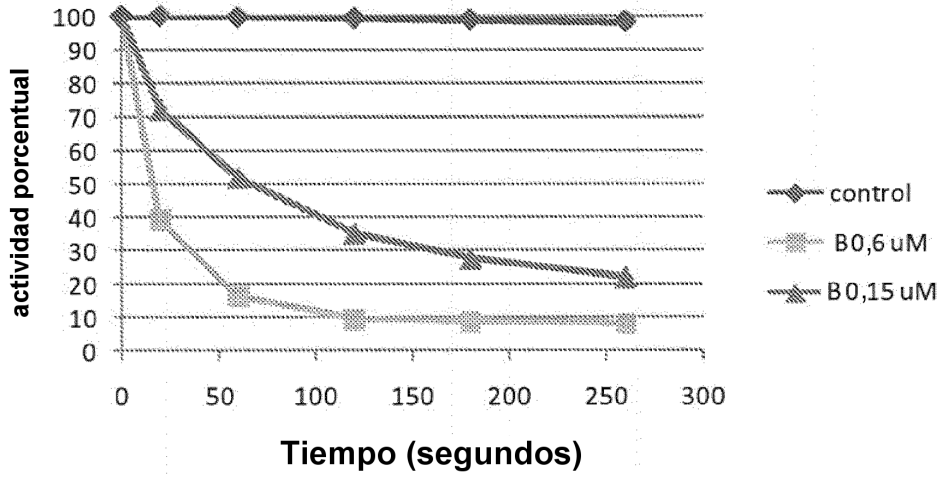


FIG. 10A

Inhibición por B de la HPPD mutante G408A

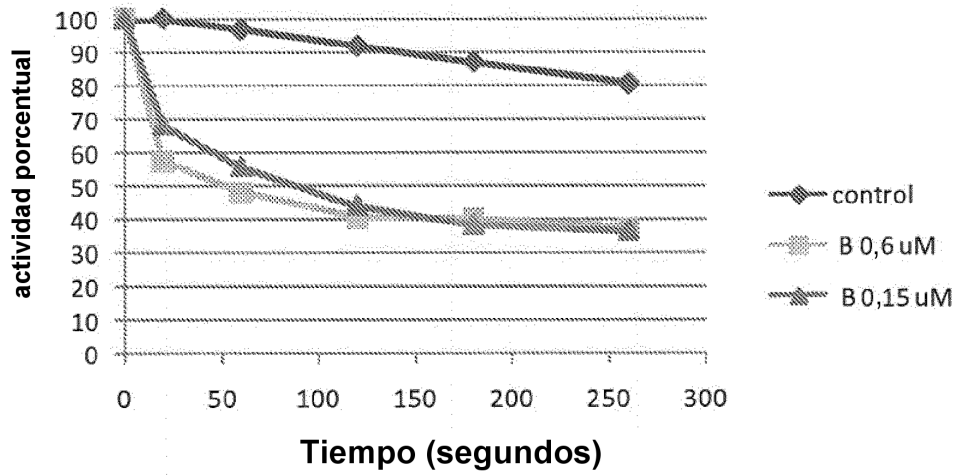


FIG. 10B

Inhibición por C de SEC ID NO: 14 de HPPD

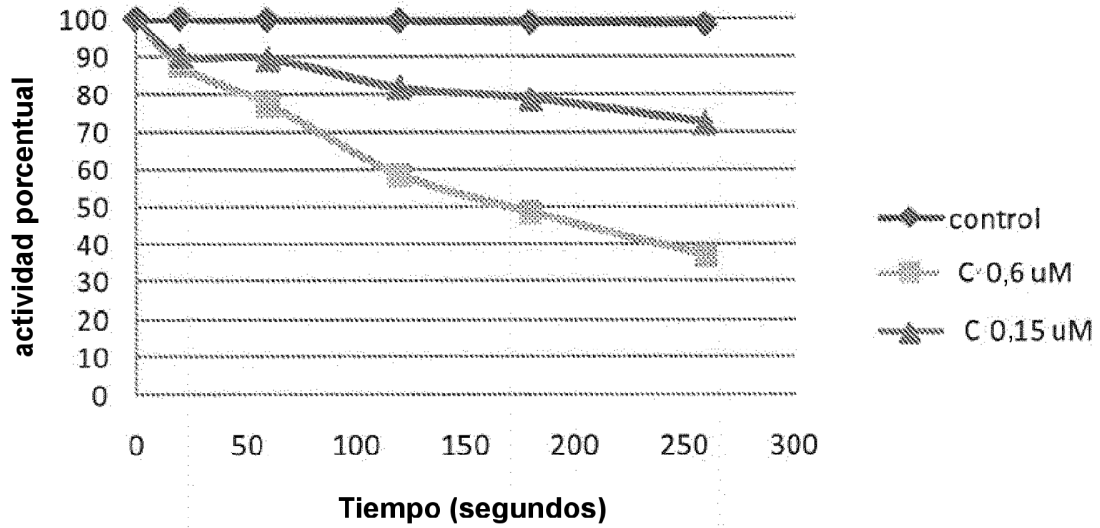


FIG. 10C

Inhibición por C de la HPPD mutante 408A

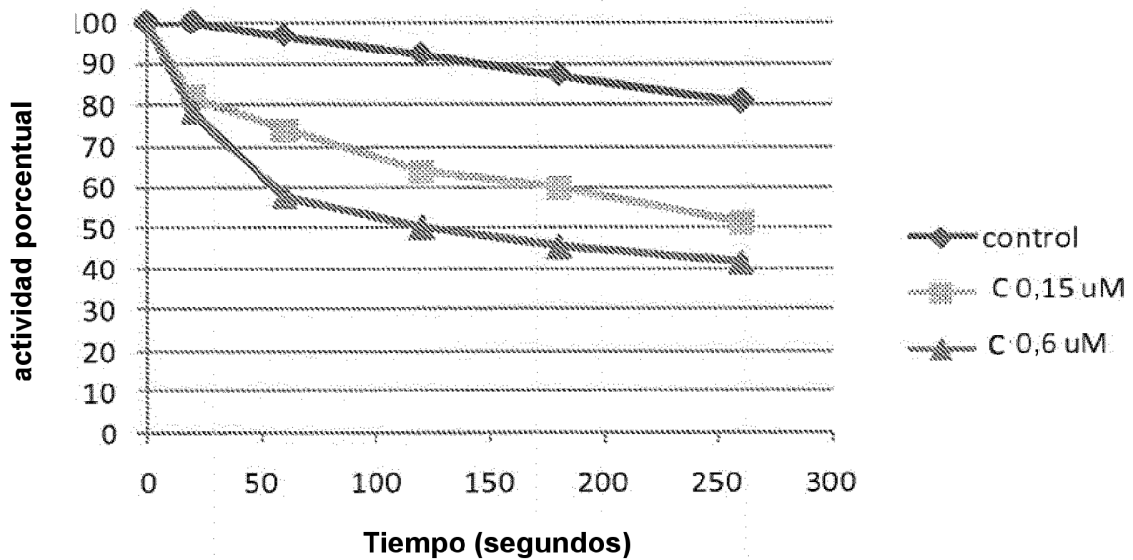


FIG. 10D