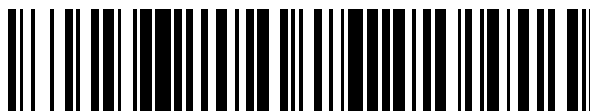


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 085**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010 PCT/EP2010/070578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10796070 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2516633**

54 Título: **Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD**

30 Prioridad:

**23.12.2009 EP 09015986**

**29.12.2009 US 290581 P**

**10.11.2010 EP 10190659**

**10.11.2010 US 412077 P**

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

**13.03.2018**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**

**(100.0%)**

**Alfred-Nobel-Strasse 10**

**40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**POREE, FABIEN;**

**LABER, BERND;**

**KNITTEL-OTTLEBEN, NATHALIE;**

**LANGE, GUDRUN;**

**SCHULZ, ARNO y**

**HAIN, RUEDIGER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 659 085 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD

**Introducción**

5 La presente invención se refiere a unas secuencias de ácidos nucleicos que codifican una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (EC 1.13.11.27, abreviada en el presente documento como HPPD) obtenida a partir de bacterias que pertenecen al género de *Rhodococcus*, a un gen quimérico que comprende una tal secuencia de ácido nucleico, y al uso de tales secuencias de ácidos nucleicos, proteínas o genes quiméricos para obtener plantas que son tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD.

**Antecedentes de la Invención**

10 Las HPPD son enzimas que catalizan la reacción en la que un parahidroxifenilpiruvato (abreviado en el presente documento como HPP), que es un producto de degradación de la tirosina, es transformado en un homogentisato (abreviado en el presente documento como HG), que es el precursor en plantas de tocoferol y plastoquinona (Crouch N.P. y col. (1997) Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, Fritze y col., (2004), Plant Physiology 134:1388-1400). El tocoferol actúa como un antioxidante asociado con membranas. La plastoquinona, en primer lugar actúa como un agente portador de electrones entre el PSII y el complejo de citocromo b6/f y en segundo lugar actúa como un cofactor redox para una fitoeno desaturasa, que está implicada en la biosíntesis de carotenoides.

Hasta el momento actual se anotaron más de 700 secuencias de ácidos nucleicos procedentes de diversos organismos presentes en la base de datos del NCBI como que codificaban una supuesta proteína que tenía un dominio de HPPD e incluían las secuencias descritas con los números de referencia Q0SC92 y Q0SF39 que se dan en la base de datos UniProtKB/TrEMBL así como con los números de referencia YP\_703002 y YP\_702005 que se dan respectivamente en la base de datos de proteínas del NCBI. Sin embargo, para la mayor parte de éstas, incluyendo las secuencias que corresponden a los números de referencia Q0SC92/YP\_703002 y Q0SF39/YP\_702005, no se ha probado que las proteínas tengan una actividad enzimática de HPPD o bien en un ensayo *in vitro* o en un enfoque *in planta*, ni que dicha proteína HPPD pueda conferir a los herbicidas inhibidores de las HPPD una tolerancia a herbicidas, cuando se exprese en una planta. Se han descrito en el estado de la técnica varias proteínas HPPD y sus secuencias primarias, en particular las proteínas HPPD de bacterias tales como *Pseudomonas* (Rüetschi y col., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, documento de solicitud de patente internacional WO 96/38567), de plantas tales como *Arabidopsis* (documento WO 96/38567, Genebank AF047834), zanahoria (documento WO 96/38567, Genebank 87257), *Avena sativa* (documento WO 02/046387), trigo (documento WO 02/046387), *Brachiaria platyphylla* (documento WO 02/046387), *Cenchrus echinatus* (documento WO 02/046387), *Lolium rigidum* (documento WO 02/046387), *Festuca arundinacea* (documento WO 02/046387), *Setaria faberi* (documento WO 02/046387), *Eleusine indica* (documento WO 02/046387), *sorgo* (documento WO 02/046387), *Coccicoides* (Genebank COITRP), de *Coptis japonica* (documento WO 06/132270), *Chlamydomonas reinhardtii* (documento de patente española ES 2275365), o de mamíferos tales como un ratón o un cerdo.

35 La mayor parte de las plantas sintetizan tirosina pasando por un arrogenato (Abou-Zeid y col. (1995), Applied Env Microb 41: 1298-1302; Bonner y col., (1995), Plant Cell Physiol. 36, 1013-1022; Byng y col., (1981), Phytochemistry 6: 1289-1292; Connely y Conn (1986), Z. Naturforsch 41c: 69-78; Gaines y col., (1982), Planta 156: 233-240). En estas plantas, el HPP se deriva solamente de la degradación de tirosina. Por otro lado, en organismos tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o la bacteria *Escherichia coli*, el HPP es un precursor de la tirosina y es sintetizado por la acción de una enzima, la preefenato deshidrogenasa (a la que en lo sucesivo se hace referencia como PDH), que convierte al preefenato en HPP (Lingens y col., (1967) European J. Biochem 1: 363-374; Sampathkumar y Morrisson (1982), Bioch Biophys Acta 701: 204-211). En estos organismos, la producción de HPP está por lo tanto conectada directamente con la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (ruta de shikimato) y no con la ruta de degradación de la tirosina.

45 La inhibición de una HPPD conduce a un desacoplamiento de la fotosíntesis, a una deficiencia en cuanto a pigmentos accesorios que aprovechan la luz y, lo que es sumamente importante, a la destrucción de clorofila por radiación UV (de ultravioletas) y de especies con oxígeno reactivas (blanqueo) debido a la falta de protección frente a la luz que es normalmente proporcionada por los carotenoides (Norris y col. (1995), Plant Cell 7: 2139-2149). El blanqueo de tejidos activos fotosintéticamente conduce a una inhibición del crecimiento y a una muerte de las plantas.

Algunas moléculas que inhiben a las HPPD, y que se fijan específicamente a la enzima con el fin de inhibir la transformación del HPP en homogentisato, han probado ser unos herbicidas selectivos muy efectivos.

En el momento actual, la mayor parte de los herbicidas inhibidores de las HPPD que están disponibles comercialmente pertenecen a una de estas cuatro familias químicas:

55 1) las tricetonas, por ejemplo sulcotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)benzoil]-1,3-ciclohexanodiona], mesotriona [es decir 2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanodiona]; tembotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)-3-[(2,2,2-trifluoroetoxi)metil]benzoil]-1,3-ciclohexanodiona]; tefuriltriona [es decir 2-[2-cloro-4-

(metilsulfonil)-3-[[tetrahydro-2-furanil]metoxi]metil]benzoil]-1,3-ciclohexanodiona]; biciclopirona [es decir 4-hidroxi-3-[[2-[(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridinil]-carbonil]biciclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona]; benzobicyclona [es decir 3-(2-cloro-4-mesilbenzoil)-2-feniltiobiciclo[3.2.1]oct-2-en-4-ona]

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

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

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

Estos herbicidas inhibidores de las HPPD se pueden usar contra malezas herbáceas y/o de hoja ancha en presencia de plantas cultivadas, que presentan una tolerancia metabólica, tales como las de maíz (*Zea mays*), en las que ellos son degradados rápidamente (Schulz y col., (1993). FEBS letters, 318, 162-166; Mitchell y col., (2001) Pest Management Science, Vol 57, 120-128; Garcia y col., (2000) Biochem., 39, 7501-7507; Pallett y col., (2001) Pest Management Science, Vol 57, 133-142). Con el fin de ampliar el alcance de estos herbicidas inhibidores de las HPDD, se han desarrollado varios esfuerzos con el fin de conferir a plantas, particularmente a plantas sin tolerancia metabólica o con una tolerancia metabólica de bajo rendimiento, un nivel de tolerancia que sea aceptable en condiciones agronómicas en el campo.

Junto con el intento de orillar y evitar la producción de homogentisato, mediada por una HPPD (documento de patente de los EE.UU. US 6.812.010), se ha realizado una sobreexpresión de la enzima sensible, de tal manera que se produzcan unas cantidades de la enzima diana en la planta que sean suficientes en relación con el herbicida (documento WO96/38567). Una sobreexpresión de una HPPD dio como resultado una mejor tolerancia antes del brote para el derivado de dicetonitrilo (DKN) del isoxaflutol (IFT), pero la tolerancia no era suficiente para tener una tolerancia a un tratamiento después del brote (Matringe y col., (2005), Pest Management Science 61: 269-276).

Una tercera estrategia consistió en mutar a la HPPD con el fin de obtener una enzima diana que, mientras que retiene sus propiedades de catalizar la transformación de HPP en homogentisato, es menos sensible a los agentes inhibidores de las HPPD que lo es la HPPD natural antes de la mutación.

Esta estrategia ha sido aplicada con éxito para la producción de plantas tolerantes a la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona y a la 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-diona (documento de patente europea EP496630), que son dos herbicidas inhibidores de las HPPD que pertenecen a la familia de los dicetonitrilos (documento WO 99/24585). Las Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Ile, y más particularmente Gly336Trp (las posiciones del aminoácido mutado se indican con referencia a la HPPD de *Pseudomonas*) se identificaron como unas mutaciones que son responsables de una tolerancia aumentada a un tratamiento antes del brote con estos herbicidas de dicetonitrilo, sin causar una alteración de la actividad de la enzima.

Más recientemente, se ha mostrado que la introducción de un gen de HPPD de *Pseudomonas* en el genoma de plastidios de tabaco y soja es más eficaz que una transformación nuclear, confiriendo incluso tolerancia a la aplicación después del brote de isoxaflutol (Dufourmantel y col., 2007, Plant Biotechnol J.5(1):118-33).

En el documento WO 04/024928, los autores de la invención han buscado aumentar la biosíntesis de prenilquinonas (por ejemplo, síntesis de plastoquinonas y tocoferoles) en las células de plantas por aumento del flujo del precursor de HPP dentro de las células de estas plantas. Esto se ha realizado conectando la síntesis de dicho precursor con la ruta de "shikimato" por sobreexpresión de una enzima PDH. Ellos han observado también que la transformación de plantas con un gen que codifica una enzima PDH hace posible aumentar la tolerancia de dichas plantas a agentes inhibidores de las HPPD.

En el documento de solicitud de patente WO 2009/144079, se describen una secuencia de ácido nucleico que codifica una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) mutada en la posición 336 de la proteína HPPD de *Pseudomonas fluorescens* y su uso para obtener plantas que son tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD.

En el documento WO 2002/046387, se han identificado varios dominios de proteínas HPPD que se originan a partir de plantas que pueden ser relevantes para conferir tolerancia a diversos herbicidas inhibidores de las HPPD pero no se han mostrado datos *in planta* ni bioquímicos que confirmen el impacto de las funciones de los dominios que se acaban de describir.

En el documento WO 2008/150473, se dio como ejemplo la combinación de dos distintos mecanismos de tolerancia – un gen de *Avena sativa* modificado que codifica una enzima HPPD mutante y un CYP450 de monooxigenasa de maíz (gen de *nsf1*) con el fin de obtener una tolerancia mejorada a herbicidas inhibidores de las HPPD, pero no se han descrito datos que demuestren los efectos sinérgicos basados en la combinación de ambas proteínas.

A pesar de estos éxitos obtenidos para el desarrollo de plantas que muestran tolerancia para diversos herbicidas inhibidores de las HPPD que se han descrito más arriba, todavía es necesario desarrollar y/o mejorar la tolerancia de plantas a unos agentes inhibidores de las HPPD más nuevos o a varios diferentes, particularmente a unos agentes inhibidores de las HPPD que pertenecen a las clases de las tricetonas (por ejemplo sulcotriona, mesotriona, tembotriona, benzobiciclona y biciclopirona) y de los pirazolinatos (por ejemplo, topramezona y pirasulfotol).

### **Descripción**

La presente invención se refiere por lo tanto a la generación de plantas transgénicas que contienen un gen que codifica una proteína HPPD obtenible u obtenida a partir de un organismo que pertenece al género de *Rhodococcus*, y variantes o mutantes del mismo, más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece a la especie *Rhodococcus* sp. y variantes o mutantes del mismo, que codifica una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un parahidroxifenilpiruvato en un homogentisato y cuyas plantas son menos sensibles a agentes inhibidores de las HPPD que unas plantas que contienen dicho transgén que codifica una HPPD.

Más especialmente, la presente invención se refiere por lo tanto a la generación de plantas transgénicas que contienen un gen obtenible u obtenido de un organismo que pertenece al género de *Rhodococcus*, más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece a la especie *Rhodococcus* sp., variantes o mutantes de la misma, incluso más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece a la cepa *Rhodococcus* sp., RH1a variantes o mutantes de la misma, lo más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece a los materiales aislados ro03041 o ro02040, variantes o mutantes de los mismos, que codifican una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un parahidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que son menos sensibles a agentes inhibidores de las HPPD que unas plantas que no contienen ninguno de tales transgenes de HPPD. Los genes procedentes de *Rhodococcus* sp., RH1a, lo más especialmente procedentes de los organismos que pertenecen a los materiales aislados ro03041 o ro02040, que codifican proteínas HPPD, fueron seleccionados como excelentes candidatos tolerantes a agentes inhibidores de las HPPD debido a sus altas divergencias en la composición de aminoácidos en unas posiciones relevantes para la tolerancia a los agentes inhibidores de las HPPD, tal como se determina de manera experimental y estructural en la proteína HPPD en comparación con la proteína HPPD de *Arabidopsis* sensible que se tomó como la molécula de referencia sensible a los herbicidas inhibidores de las HPPD. La divulgación se refiere a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de *Rhodococcus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y/o con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18, 19, 20 o 21, preferentemente de la SEQ ID NO: 20. La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD aislada de ro03041, denominada en el presente documento "la proteína HPPD ro03041 de esta invención" o "la proteína HPPD ro03041 de *Rhodococcus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y en que cualquiera de los aminoácidos desde la posición 207 hasta la posición 401 de la SEQ ID NO: 4 puede ser corregido por cualquier aminoácido presente en la naturaleza, de manera preferente puede ser cualquier sustitución conservativa. La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD aislada a partir del ro02040, denominada en el presente documento "la proteína HPPD ro02040 de esta invención" o "la proteína HPPD ro02040 de *Rhodococcus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, preferentemente de la SEQ ID NO: 20, y en que cualquiera de los aminoácidos desde la posición 208 hasta la posición 402 de la SEQ ID NO: 18 puede ser corregido por cualquier aminoácido presente en la naturaleza, de manera preferente puede ser cualquier sustitución conservativa. La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD, denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de *Rhodococcus* procedente del material aislado ro03041", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y que tiene uno o más de los siguientes aminoácidos en la posición definida por su número (que se relaciona con el número de la SEQ ID NO: 4) dado entre paréntesis, es decir His(205), Ser(248), Asn(263), Gln(287), His(288), Tyr(317), Gln(354), Phe(367), Glu(369), Gly(380), y Asn(383). La divulgación se refiere adicionalmente a una

5 proteína HPPD denominada en el presente documento “la proteína HPPD de esta invención” o “la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro03041”, que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (i) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (i).

Tabla (i):

Amino-ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Val	207	Thr, Cys, Ala, Gly Phe, Tyr, Ile, Leu, Val, Ala, Gln, Glu, Asp, Gly, Thr,
Met	231	Ser, Arg, Lys
Ala	232	Ile, Trp, Leu, Ser, Arg, Lys, His, Asp, Glu, Pro, Gly, Asn
Phe	234	Val, Ile, Ala, Leu, Trp, Met, Gln, His
Leu	246	Met, Val
Lys	249	Ala, Val, Leu, Met, Ile, Arg, Gln, Tyr
Val	251	Leu, Met, Ile, Ala
Ser	252	Ala, Thr, Val, Arg, Lys, Glu, Leu, Ile, Met, His
Ala	386	Glu, Gln, Ser, Val, Phe, Thr
Leu	387	Arg

10 La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento “la proteína HPPD de esta invención” o “la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro03041”, que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (ii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (ii).

20 Tabla (ii):

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Glu	233	Ser, Thr, Tyr, Phe, His, Gln, Asn, Gly, Leu, Met, Val, Arg, Ile
Val	250	Ala, Thr
Pro	261	Ala, Val, Thr, Asn, Ile,
Leu	311	Met, Ile, Asn
Leu	343	Met
Ile	381	Cualquiera excepto Pro
Gly	382	Ala, Pro, Val, Thr, Met

25 La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento “la proteína HPPD de esta invención” o “la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro03041”, que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, preferentemente SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (iii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (iii).

30 Tabla (iii)

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Glu	233	Thr, Arg, Tyr, Ser
Val	250	Ala
Pro	261	Ala, Val, Thr
Leu	311	Met
Leu	343	Met

(continuación)

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Ile	381	Ala, Val, Leu, Lys
Gly	382	Ala

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD, denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro02040", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7, preferentemente de la SEQ ID NO: 6, y que tiene uno o más de los siguientes aminoácidos en la posición definida por su número (que se relaciona con el número de la SEQ ID NO: 4) dado entre paréntesis, es decir His(206), Ser(249), Asn(264), Gln(288), His(289), Tyr(318), Gln(355), Phe(368), Glu(370), Gly(381), y Asn(384). La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro02040", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (i) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (iv).

Tabla (iv):

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Val	208	Thr, Cys, Ala, Gly
Met	232	Phe, Tyr, Ile, Leu, Val, Ala, Gln, Glu, Asp, Gly, Thr, Ser, Arg, Lys
Ala	233	Ile, Trp, Leu, Ser, Arg, Lys, His, Asp, Glu, Pro, Gly, Asn
Phe	235	Val, Ile, Ala, Leu, Trp, Met, Gln, His
Leu	247	Met, Val
Lys	250	Ala, Val, Leu, Met, Ile, Arg, Gln, Tyr
Val	252	Leu, Met, Ile, Ala
Ala	253	Ser, Thr, Val, Arg, Lys, Glu, Leu, Ile, Met, His
Ala	387	Glu, Gln, Ser, Val, Phe, Thr
Leu	388	Arg

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro02040", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (ii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (v).

Tabla (v):

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Glu	234	Ser, Thr, Tyr, Phe, His, Gln, Asn, Gly, Leu, Met, Val, Arg, Ile
Val	251	Ala, Thr
Pro	262	Ala, Val, Thr, Asn, Ile,
Leu	312	Met, Ile, Asn
Leu	344	Met
Ala	382	Cualquiera excepto Pro
Gly	383	Ala, Pro, Val, Thr, Met

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de esta invención" o "la proteína HPPD de Rhodococcus procedente del material aislado ro02040", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID

NO:4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (ii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (vi).

Tabla (vi):

Amino ácido en SEQ ID No.4	Posición en SEQ ID No.4	Sustituciones
Glu	234	Thr, Arg, Tyr, Ser
Val	251	Ala
Pro	262	Ala, Val, Thr
Leu	312	Met
Leu	344	Met
Ala	382	Ile, Val, Leu, Lys
Gly	383	Ala

5 La divulgación incluye una proteína con aminoácidos sustituidos, suprimidos o añadidos en comparación con la  
 secuencia de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401 o de la SEQ  
 ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, tales como una proteína de  
 10 fusión con un péptido de tránsito, o una proteína con cambios de aminoácidos en la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o  
 de la SEQ ID NO: 18 que retiene la función enzimática de una proteína HPPD, y que todavía confiere una tolerancia  
 a las HPPD cuando se expresa en plantas, de manera preferible una tolerancia a las HPPD similar a la conferida por  
 la proteína de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 18. Esto incluye proteínas variantes o mutantes derivadas de la  
 proteína de la SEQ ID NO: 4, tales como cualquiera de las proteínas de las SEQ ID NO: 5, 6 o 7, o de la proteína de  
 la SEQ ID No 18, tales como cualquiera de las proteínas de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, particularmente aquella  
 15 mutante o variante que es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor  
 de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible aquella  
 mutante o variante que confiere una tolerancia a herbicidas agrónomicamente relevante a una planta hospedadora  
 que la expresa cuando un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas y/o  
 pirazolinatos, particularmente cualquiera tomado de mesotriona, tembotriona, isoxaflutol o biciclopirona es aplicado  
 20 sobre dichas plantas, más particularmente cuando es aplicado después del brote. Esto incluye también una proteína  
 que comprende una porción activa de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 18, cuya porción  
 confiere una tolerancia a agentes inhibidores de las HPPD cuando se expresa en plantas. Esto incluye una proteína  
 con sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO:  
 25 18, tal como una proteína con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 hasta 7 o de las  
 SEQ ID NO: 19 a 21. Esto incluye proteínas aisladas como se definen seguidamente, y también unas proteínas,  
 tales como la proteína de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 18, en las que ciertos aminoácidos han sido  
 reemplazados por unos similares aminoácidos como se definen seguidamente, de manera preferible sustituciones  
 conservativas de aminoácidos. También están incluidas en el presente contexto como proteínas HPPD de esta  
 invención unas proteínas HPPD que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la  
 30 posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401 o de la SEQ ID NO: 18 desde la posición de  
 aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, pero en las que 1-20, 1-15, 1-10 o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9  
 aminoácidos han sido suprimidos o han sido sustituidos por otros aminoácidos, particularmente una proteína tal que  
 retiene la actividad enzimática de las HPPD y que confiere tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD cuando  
 es expresada en una planta hospedadora. Están incluidas en el presente contexto unas proteínas HPPD codificadas  
 por unas secuencias de ADN homologas a las secuencias de ADN de la invención como se describen  
 35 seguidamente, o unas proteínas HPPD codificadas por una secuencia de ADN que se hibrida con por lo menos una  
 porción (de por lo menos 20-30 nucleótidos) del ADN de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 15, o que es obtenible  
 usando un cebador basado en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 15, o unas proteínas HPPD con una identidad  
 entre secuencias de por lo menos 80 % con la SEQ ID NO: 4 o con la SEQ ID NO: 18, que son codificadas por una  
 40 secuencia de ADN hallada en la secuencia del genoma de un microorganismo, tal como una bacteria, tal como un  
 microorganismo del género de *Rhodococcus*. Está incluida en el presente contexto como una proteína HPPD de  
 esta invención una proteína HPPD de *Rhodococcus* que confiere una tolerancia a herbicidas a unas plantas cuando  
 es expresada en tales plantas, en las que dicha tolerancia es a un agente inhibidor de las HPPD tal como  
 mesotriona, tembotriona, isoxaflutol o biciclopirona, particularmente dicha proteína HPPD es una proteína HPPD de  
 45 *Rhodococcus sp.*, tal como una proteína que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de  
 aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401 o de la SEQ ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta  
 la posición de aminoácido 402. Esto incluye las proteínas HPPD mutantes o variantes tal como se describen más  
 adelante

La presente divulgación incluye y proporciona un anticuerpo capaz de fijar específicamente a una proteína  
 sustancialmente purificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que  
 50 consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 18, 19, 20 o 21, o secuencias derivadas de la misma de acuerdo con un  
 reemplazo de aminoácidos tal como se describe en una o más de las Tablas (i), (ii) o (iii) anteriores.

Un aspecto adicional de la divulgación concierne a anticuerpos, moléculas monocatenarias que fijan antígenos, u  
 otras proteínas que se fijan específicamente a una o más de las moléculas de proteínas o péptidos de la invención y  
 sus compuestos homólogos, fusiones o fragmentos. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo se

fija específicamente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en las SEQ ID NO: 4-7 o 18-21 o un fragmento de la misma, o secuencias derivadas de la misma de acuerdo con un reemplazo de aminoácidos tal como se describe en una o más de las Tablas (i), (ii) o (iii) anteriores.

5 En otra realización, el anticuerpo se fija específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NO: 4-7 o 18-21, o un fragmento de las mismas, o secuencias derivadas de las mismas de acuerdo con un reemplazo de aminoácidos tal como se describe en una o más de las Tablas (i), (ii) o (iii) anteriores.

10 En otra divulgación, el anticuerpo se fija específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NO: 4-7 o 18-21, o un fragmento de las mismas, o secuencias derivadas de las mismas de acuerdo con un reemplazo de aminoácidos tal como se describe en una o más de las Tablas (i), (ii) o (iii) anteriores.

15 También se incluyen en el presente documento, como ADN de HPPD de esta invención, unas secuencias de ADN que codifican una proteína HPPD de la invención, cuyas secuencias de ADN han sido adaptadas para la expresión en microorganismos o plantas, tal como por reemplazo de codones nativos por unos codones más preferidos en una célula hospedadora, o en las que ciertos sitios de restricción han sido añadidos o retirados para conseguir facilidad de clonación, o una secuencia de ADN con un cierto número de nucleótidos añadidos, reemplazados o suprimidos. Esto incluye también secuencias de ADN aisladas y ADN's o ácidos nucleicos variantes, mutantes o sintéticos, como se describen más adelante.

20 En una realización particular, el ADN de HPPD de *Rhodococcus* de esta invención es expresado en plantas bajo el control de un promotor que permite la expresión de genes endógenos en plantas. En una realización particular adicional, en el extremo N terminal de la enzima de HPPD expresada de esta manera, está situado un péptido de señal, preferentemente un péptido de tránsito de plastidio, tal como un péptido de tránsito de cloroplastos con aproximadamente 120 aminoácidos (desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 120 aminoácidos) de manera sumamente preferible un doble péptido de tránsito, tal como un péptido de tránsito optimizado cuya primera parte se origina de girasol (*Helianthus annuus*) y cuya segunda parte se origina de *Zea mays* (maíz) (que ha sido descrito en el documento de patente US 5.188.642) o un péptido de tránsito de plastidio que se origina de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilasas/oxigenasa de plantas (RuBisCO ssu, acrónimo de ribulose biscoxilasas / oxigenasa small subunit), que cuando sea apropiado incluye unos pocos aminoácidos de la parte N terminal de la RuBisCO ssu madura (documento EP 189 707).

30 En una realización particular adicional, esta invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de esta invención que deriva o es obtenible de la SEQ ID NO: 1 y que está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.224 (que incluye las posiciones definidas) o que deriva o es obtenible de la SEQ ID NO: 15 y está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.227 (que incluye las posiciones definidas).

35 En otra divulgación particular adicional, esta invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de esta invención que deriva de la SEQ ID NO: 1 y que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.599 (que incluye las posiciones definidas).

40 En otra realización particular adicional, esta invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de esta invención que deriva de la SEQ ID NO: 15 y que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.602 (que incluye las posiciones definidas).

45 En una realización particular adicional, la HPPD de la invención, tal como la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401, o la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 hasta 7, es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, o a un herbicida inhibidor de las HPPD, seleccionado entre isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topramezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub>fenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> fenil)-propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona y pirazoxifeno.

50 En otra divulgación particular adicional, la HPPD, tal como la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, o la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18 hasta 21, es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, o a un herbicida inhibidor de las HPPD, seleccionado entre isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topramezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub>fenil)-



propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> fenil)-propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona y pirazoxifeno.

La divulgación incluye adicionalmente un ADN que codifica una proteína HPPD de esta invención que está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.224 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topramezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

La divulgación incluye adicionalmente un ADN que codifica una proteína HPPD de esta invención que deriva de la SEQ ID NO: 15 y que está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.227 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topramezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

En una realización particular adicional, esta invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD que deriva de la SEQ ID NO: 1 y que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.599 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topramezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

En una realización particular adicional, esta invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD deriva de la SEQ ID NO: 15 y que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.602 (que incluye las posiciones definidas), que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topramezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

En una realización particular adicional, esta invención se refiere a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden cualquiera de los ADN que codifican una proteína HPPD de la invención, que derivan de SEQ ID NO: 1 y que están optimizado para la expresión en *E. coli*, o que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.224 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.599 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora. Tales plantas incluyen, pero no se limitan a, plantas cultivadas en el campo, frutos y hortalizas tales como canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, col, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, frutos cítricos, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces. La divulgación también se refiere a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden cualquiera de los ADN que codifican una proteína HPPD de la invención, que derivan de la SEQ ID NO: 15 y que están optimizados para la expresión en *E. coli*, o que están optimizados para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.227 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 18 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1602 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora. Tales plantas incluyen, pero no se limitan a, plantas cultivadas en el campo, frutos y hortalizas tales como canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, col, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, frutos cítricos, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces.

En una realización más particular, esta invención se refiere a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden cualesquiera de los ADN que codifican una proteína HPPD de la invención que derivan de la SEQ ID NO: 1 y que están optimizados para la expresión en *E. coli*, o que están optimizados para la expresión en plantas tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.224 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.599 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora, y en las que las plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, patata, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y

colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces, incluso de manera más preferible tales plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en especies de soja, arroz, remolacha azucarera, trigo, algodón, canola, colza de semilla oleaginosa o maíz. La divulgación se refiere adicionalmente a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden cualesquiera de los ADN que codifican una proteína HPPD de la invención que derivan de la SEQ ID NO: 15 y que están optimizados para la expresión en *E. coli*, o que están optimizados para la expresión en plantas tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.227 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 17 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.602 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora, y en las que las plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, patata, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces, incluso de manera más preferible tales plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en especies de soja, arroz, remolacha azucarera, trigo, algodón, canola, colza de semilla oleaginosa o maíz. La proteína HPPD puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o de la SEQ ID NO: 21 y es menos sensible a un agente inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD tricetonas), tales como tembotriona, sulcotriona mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, particularmente tembotriona, o de la clase de los dicetonitrilos (isoxaflutol) o de la clase de los pirazolinatos (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD pirazolinatos), tales como pirasulfotol, pirazolato, topramezona, benzofenap en comparación con la HPPD no mutada endógena de una planta, particularmente la planta hospedadora en la que dicha HPPD de la invención es expresada o ha de ser expresada.

La actividad enzimática de las proteínas HPPD puede ser medida por cualquier procedimiento que haga posible ya sea medir la disminución en la cantidad de los substratos de HPP o de O<sub>2</sub>, o medir la acumulación de cualquiera de los productos derivados de la reacción enzimática, es decir homogentisato o CO<sub>2</sub>. En particular, la actividad de HPPD puede ser medida por medio del procedimiento descrito en las citas de García y col. (1997), *Biochem. J.* 325, 761-769 o García y col. (1999), *Plant Physiol.* 119, 1507-1516, que son incorporadas en el presente contexto por su referencia.

De acuerdo con la invención, un agente inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas (o que se denomina agente inhibidor de las HPPD tricetona) significa un agente inhibidor de las HPPD que tiene un esqueleto de tricetona. Como un ejemplo de dichos agentes inhibidores de las HPPD tricetona, se pueden citar las moléculas sulcotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)-benzoil]-1,3-ciclohexanodiona], mesotriona [es decir 2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanodiona], y tembotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonil)-3-[(2,2,2-trifluoroetoxi)metil]benzoil]-1,3-ciclohexanodiona], tefuriltriona [es decir 2-[2-cloro-4-metil-3-[(RS)-tetrahydro-2-furilmetoximetil]-benzoil]ciclohexano-1,3-diona], biciclopirona [es decir 4-hidroxi-3-[2-[(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridilcarbonil]bicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona], benzobiciclona [es decir 3-(2-cloro-4-metilbenzoil)-2-feniltibicyclo[3.2.1]oct-2-en-4-ona].

De acuerdo con la invención, un agente inhibidor de las HPPD de la clase de los pirazolinatos (o agente inhibidor de las HPPD pirazolinato) significa un agente inhibidor de las HPPD que tiene un radical pirazol. Como un ejemplo de tales agentes inhibidores de las HPPD pirazolinatos, se pueden citar las moléculas topramezona [es decir [3-(4,5-dihidro-3-isoxazolil)-2-metil-4-(metilsulfonil)fenil]-(5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona] y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il)-(2-metil-4-trifluorometilfenil)metanona].

La presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico, particularmente un ADN aislado, de manera preferible un gen quimérico expresable en plantas, que codifica la HPPD de *Rhodococcus* y secuencias adaptadas de la misma.

La presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima HPPD de esta invención que retiene sus propiedades de catalizar la conversión de parahidroxifenilpiruvato en homogentisato y que es menos sensible a los agentes inhibidores de las HPPD de la clase de las tricetonas tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos tales como pirasulfotol y topramezona, tefuriltriona, biciclopirona, benzobiciclona que la HPPD endógena no mutada de la planta, y cuya secuencia codificada de aminoácidos muestra una identidad entre secuencias con la SEQ ID NO: 4 o con la SEQ ID NO: 18 de por lo menos 75 %, 80 %, particularmente de por lo menos 85 %, de manera preferible de por lo menos 90 %, de manera más preferible de por lo menos 95 %, incluso de manera más preferible de por lo menos 98 % y de manera sumamente preferible de por lo menos 99 %.

En una realización más particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención codifica una enzima HPPD que es menos sensible a un agente inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona, mesotriona, biciclopirona y tefuriltriona, de la clase de los pirazolinatos (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD pirazolinatos), tales como pirasulfotol, pirazolato, topramezona, benzofenap, de la clase de los isoxazoles tales como isoxaflutol o de la clase de las dicetonas tales como dicetonitrilo, que la HPPD endógena de la planta hospedadora.

De acuerdo con la presente invención, se entiende que una "secuencia de ácido nucleico" es una secuencia de

nucleótidos que puede ser del tipo de ADN o de ARN, de manera preferible del tipo de ADN, y en particular de doble hebra, ya sea de origen natural o sintético, en particular una secuencia de ADN en la que los codones que codifican la HPPD de acuerdo con la invención han sido optimizados de acuerdo con el organismo hospedador en el que ella ha de ser expresada (por ejemplo, reemplazando unos codones por aquellos codones que son más preferidos o sumamente preferidos en tablas de trato con codones de dicho organismo hospedador o el grupo al que dicho organismo hospedador pertenece, en comparación con el organismo original o de fuente). El concepto de "un(a) ácido nucleico/ADN/proteína aislado/a", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un(a) ácido nucleico/ADN/proteína que no se presenta en la naturaleza (tal como un ADN artificial o sintético con una secuencia de nucleótidos que es diferente que la del ADN que se presenta en la naturaleza, o una proteína modificada) o que ya no se encuentra en el entorno natural en el que originalmente estaba presente, por ejemplo una secuencia que codifica un ADN, asociada con un elemento regulador heterólogo (tal como una secuencia codificante bacteriana conectada operativamente a un promotor expresable en una planta) en un gen quimérico, un ADN transferido dentro de otra célula hospedadora, tal como una célula de planta transgénica.

A la vista de una realización particular de la invención y de la solución buscada, es decir una HPPD que es menos sensible a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetona o pirazolinato, la medición del nivel de tolerancia es analizada usando el procedimiento extensamente descrito en el documento WO 2009/14407 tal como se describe seguidamente, usando un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetona, isoxazol o pirazolinato, particularmente un agente inhibidor de las HPPD seleccionado entre tembotriona, mesotriona, pirasulfotol, topramezona sulcotriona, biciclopirona, dicetonitrilo, benzofenap, pirazolato y tefuriltriona.

La terminología de un ADN o una proteína "que comprende" una cierta secuencia "X", tal como se usa a lo largo del texto, se refiere a un ADN o una proteína que incluye o que contiene por lo menos la secuencia "X", de manera tal que otras secuencias de nucleótidos o de aminoácidos pueden estar incluidas junto a los extremos 5' (o N terminal) y/o 3' (o C terminal), por ejemplo (la secuencia de nucleótidos de) una proteína marcadora seleccionable, (la secuencia de nucleótidos de) un péptido de tránsito, y/o una secuencia conductora en 5' o una secuencia de remolque en 3'. Similarmente, debería entenderse que el uso de las expresiones "comprende", "que comprende" o "comprende" a lo largo del texto y en las reivindicaciones de esta solicitud, implica la inclusión de una señalada parte entera o etapa o de un señalado conjunto de partes enteras o etapas, pero no la exclusión de cualquier otra parte entera o etapa o conjunto de partes enteras o etapas. Las regiones codificantes que codifican una HPPD comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica unas proteínas con las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEC ID NO: 4, 5, 6 y 7, tales como las secuencias de nucleótidos de las SEC ID NO: 1, 2 y 3. Las regiones codificantes que codifican una HPPD comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica unas proteínas con las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEC ID NO: 18, 19, 20 y 21, tales como las secuencias de nucleótidos de las SEC ID NO: 15, 16 y 17.

Sin embargo, resultará evidente que las variantes de estas secuencias de nucleótidos, incluyendo inserciones, supresiones y sustituciones de las mismas, se pueden usar también con el mismo efecto. Igualmente, se pueden usar unas secuencias homólogas a las secuencias de nucleótidos mencionadas, procedentes de especies diferentes de la *Rhodococcus* sp.

Unas variantes de la secuencia de nucleótidos que se ha descrito tendrán una identidad entre secuencias que será de manera preferible de por lo menos alrededor de 80 %, o de 85 o 90 % o de por lo menos 95 % con unas secuencias de nucleótidos identificadas que codifican unas enzimas HPPD tales como las identificadas en la lista de secuencias.

Una proteína que tiene "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" que una proteína como se describe en la invención, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una proteína que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos 90 %, particularmente de por lo menos 95 %, de manera preferible de por lo menos 97 % con una proteína de acuerdo con la invención, en donde el porcentaje de identidad entre secuencias es determinado usando la matriz de calificación blosum62 en el programa GAP del paquete de Wisconsin de GCG (Madison, Wisconsin, EE.UU.) versión 10.0 (se usaron defectos de GCG). El concepto de "identidad entre secuencias", tal como se usa a lo largo de esta solicitud, cuando se relaciona con proteínas, se refiere al porcentaje de aminoácidos idénticos cuando se usa este análisis especificado. La "identidad entre secuencias", tal como se usa en el presente contexto, cuando se relaciona con secuencias de ADN, es determinada usando la matriz de calificación nwsgapdna en el programa GAP del paquete de Wisconsin de GCG (Madison, Wisconsin, EE.UU.) versión 10.0 (se usaron defectos de GCG).

Para la finalidad de esta invención, la "identidad entre secuencias" de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias, alineadas de una manera óptima, que tienen restos idénticos (x 100) dividido por el número de posiciones que se han comparado. Un intersticio, es decir una posición en una alineación en la que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, es considerado como una posición con restos no idénticos. La alineación de las dos secuencias es realizada por el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch 1970). La anterior alineación de secuencias asistida por ordenador, se puede realizar convenientemente usando un programa lógico (software) clásico, tal como el GAP que es parte del paquete de Wisconsin Package Versión 10.1 (de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, EE.UU.) usando la matriz de calificación por defecto con una penalización

por creación de un intersticio de 50 y una penalización por prolongación de un intersticio de 3.

Unas secuencias de nucleótidos homologas con las secuencias de nucleótidos que codifican una enzima HPPD de acuerdo con la invención pueden ser identificadas por un análisis *in silico* (en ordenador) de datos de secuencias genómicas.

- 5 Una secuencia de nucleótidos homóloga puede ser identificada y aislada también por hibridación en condiciones rigurosas usando como sondas unas secuencias de nucleótidos identificadas que codifican unas enzimas HPPD de acuerdo con la invención o partes de las mismas. Dichas partes deberán tener de manera preferible una secuencia de nucleótidos que comprenda por lo menos 40 nucleótidos consecutivos procedentes de la región de codificación de secuencias de genes que codifican las HPPD de acuerdo con la invención, procedentes de manera preferible de la región de codificación de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17. Sin embargo, las sondas pueden comprender regiones más largas de secuencias de nucleótidos que derivan de los ácidos nucleicos que codifican las HPPD, tal como aproximadamente 50, 60, 75, 100, 200 o 500 nucleótidos consecutivos procedentes de cualquiera de los genes de HPPD que se han mencionado. De manera preferible, la sonda debería comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una región conservada en alto grado, que puede ser identificada por alineación de las diferentes proteínas HPPD.

El concepto de “unas condiciones de hibridación rigurosas” tal como se usa en el presente contexto, significa que una hibridación se realizará generalmente si hay una identidad entre secuencias de por lo menos 95 % y de manera preferible por lo menos de 97 % entre la sonda y la secuencia diana. Ejemplos de condiciones rigurosas de hibridación son una incubación durante una noche en una solución que comprende 5xSSC (150 mM de NaCl, 15 mM citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (de pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de un ADN portador cortado y desnaturalizado tal como un ADN de esperma de salmón, seguido por un lavado del soporte de hibridación en 0,1xSSC a aproximadamente 65 °C, de manera preferible dos veces durante alrededor de 10 minutos. Otras condiciones de hibridación y de lavado son bien conocidas y se dan como ejemplo en la cita de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Clonación molecular, un manual de laboratorio], Segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente el capítulo 11.

Dichas secuencias variantes se pueden obtener también mediante una amplificación de ADN usando unos oligonucleótidos específicos para genes de HPPD que codifican enzimas como cebadores, tales como, pero sin limitarse a, unos oligonucleótidos que comprenden desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 nucleótidos consecutivos seleccionados entre las secuencias de nucleótidos de las SEC ID NO: 1, 2, 3, 15, 16, 17 o su complemento.

La divulgación comprende también unas enzimas de HPPD variantes que son unas secuencias de aminoácidos similares a la secuencia de aminoácidos de HPPD de las SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 18 en las que uno o más aminoácidos se han introducido, suprimido o sustituido. En el presente contexto, las variantes de una secuencia de aminoácidos se refieren a aquellos/as polipéptidos, enzimas o proteínas que tienen una actividad catalítica similar a la de las secuencias de aminoácidos que en el presente documento se describen, a pesar de cualesquiera sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que se realicen en ellas. De manera preferible, la secuencia variante de aminoácidos tiene una identidad entre secuencias de por lo menos aproximadamente 80 %, o de 85 o 90 % o 95 % con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 18. También de manera preferible, un polipéptido que comprende la secuencia variante de aminoácidos tiene la actividad enzimática de las HPPD. Unos procedimientos para determinar la actividad enzimática de las HPPD son bien conocidos en la especialidad e incluyen unos ensayos que se describen extensamente en el documento WO 2009/144079 o en el documento WO 2002/046387.

Unas sustituciones comprenden unas alteraciones de aminoácidos en las que un aminoácido es reemplazado por un resto de aminoácido diferente presente en la naturaleza o uno no convencional. Dichas sustituciones se pueden clasificar como “conservativas” cuando un resto de aminoácido contenido en una proteína HPPD de esta invención es reemplazado por otro aminoácido presente en la naturaleza que tiene un carácter similar, por ejemplo Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln o Phe↔Trp↔Tyr. Unas sustituciones comprendidas por la presente invención pueden también ser “no conservativas”, cuando un resto de aminoácido que está presente en una proteína HPPD de esta invención es sustituido por un aminoácido que tiene propiedades diferentes, tal como un aminoácido presente en la naturaleza procedente de un diferente grupo (por ejemplo por sustitución de un aminoácido cargado o hidrófobo por alanina). Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos singulares, pero pueden ser también de restos múltiples, ya sea arracimados o dispersados. Las supresiones de aminoácidos serán usualmente del orden de aproximadamente 1-10 restos de aminoácidos, mientras que las inserciones pueden ser de cualquier longitud. Las supresiones e inserciones se pueden hacer en el extremo N terminal, en el extremo C terminal, o pueden ser supresiones o inserciones internas. Generalmente, unas inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán menores que unas fusiones en los extremos amino o carboxilo terminal y del orden de 1 a 4 restos de aminoácidos. El concepto de “aminoácidos similares”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unos aminoácidos que tienen unas similares cadenas de aminoácidos, es decir unos aminoácidos que tienen cadenas laterales polares, no polares o prácticamente neutras. El concepto de “aminoácidos no similares”, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a unos aminoácidos que tienen diferentes cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo un aminoácido con una cadena lateral polar no es similar a un aminoácido con una

cadena lateral no polar. Las cadenas laterales polares tienden usualmente a estar presentes sobre la superficie de una proteína cuando ellas pueden interactuar con el entorno acuoso hallado en células (aminoácidos “hidrófilos”). Por otra parte, los aminoácidos “no polares” tienden a residir dentro del centro de la proteína en donde ellos pueden interactuar con vecinos no polares similares (aminoácidos “hidrófobos”). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina (todos ellos hidrófilos, excepto la cisteína que es hidrófoba). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina y triptófano (todos ellos hidrófobos, excepto la glicina que es neutra).

La presente divulgación también comprende anticuerpos que reconocen específicamente a una enzima HPPD de acuerdo con la invención.

La divulgación también se refiere al uso, en un procedimiento para transformar plantas, de un ácido nucleico que codifica una HPPD de acuerdo con la invención como un gen marcador o como una secuencia codificante que hace posible conferir a la planta una tolerancia a herbicidas que son agentes inhibidores de las HPPD, y al uso de los agentes inhibidores de las HPPD en plantas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de acuerdo con la invención.

En una realización de esta invención, en dicho uso los agentes inhibidores de las HPPD son tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona o sulcotriona, biciclopirona y tefuriltriona. Desde luego, se entiende que esta secuencia se puede usar también en combinación con uno/una(s) otro/otra(s) marcador(es) de genes y/o secuencia(s) que codifica(n) una o más proteínas con propiedades agrícolas útiles.

En la producción comercial de plantas cultivadas, es deseable, dentro de una administración confiable de plaguicidas, eliminar plantas indeseadas (es decir “malezas”) desde un campo de plantas cultivadas. Un tratamiento ideal sería uno que se podría aplicar a un campo completo, pero que eliminaría solamente las plantas indeseadas mientras que dejaría sin afectar a las plantas cultivadas. Uno de dichos sistemas de tratamiento podría implicar el uso de plantas cultivadas que son tolerantes a un herbicida de tal manera que cuando el herbicida es rociado sobre un campo de plantas cultivadas tolerantes a herbicidas, las plantas cultivadas continuarán prosperando mientras que unas malezas no tolerantes a herbicidas fueron aniquiladas o dañadas gravemente. Idealmente, dichos sistemas de tratamiento aprovecharán las ventajas de propiedades herbicidas variables de tal manera que una represión de malezas podría proporcionar la mejor combinación posible de flexibilidad y economía. Por ejemplo, unos herbicidas individuales tienen diferentes longevidades en el campo, y algunos herbicidas persisten y son eficaces durante un período de tiempo relativamente largo después de que ellos hayan sido aplicados a un campo, mientras que otros herbicidas son descompuestos rápidamente para dar otros compuestos distintos y/o no activos. Un sistema de tratamiento ideal podría permitir el uso de diferentes herbicidas de tal manera que los criadores podrían seleccionar a medida de los deseos la elección de herbicidas para una situación particular.

Mientras que un cierto número de plantas cultivadas tolerantes a herbicidas están actualmente disponibles comercialmente, un tema que ha surgido para muchos/as herbicidas comerciales y combinaciones de herbicidas y plantas cultivadas, consiste en que los herbicidas individuales tienen típicamente un espectro incompleto de actividades contra especies de malezas corrientes. Para la mayor parte de los herbicidas individuales que han estado usándose desde hace algún tiempo, unas poblaciones de especies de malezas y biotipos resistentes a herbicidas han resultado más prevalecientes (véase por ejemplo, Tranel y Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen y Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Se han descrito unas plantas transgénicas que son resistentes a más de un herbicida (véase por ejemplo, el documento W02005/012515). Sin embargo, se están demandando continuamente unas mejoras en cualquiera de los aspectos de la producción de plantas cultivadas, opciones de represión de malezas, prolongación de la represión de malezas residuales, y un mejoramiento en el rendimiento de plantas cultivadas.

La proteína o el gen de HPPD de la divulgación se combina ventajosamente en plantas con otros genes que codifican proteínas o ARN's que confieren útiles propiedades agronómicas a dichas plantas. Entre los genes que codifican proteínas o ARN's que confieren útiles propiedades agronómicas a las plantas transformadas, se puede hacer mención de las secuencias de ADN que codifican unas proteínas que confieren tolerancia a uno o más herbicidas que, de acuerdo con su estructura química, difieren de los herbicidas inhibidores de las HPPD, y de otros que confieren tolerancia a ciertos insectos, de los que confieren tolerancia a ciertas enfermedades, ADN's que codifican ARN's que proporcionan represión de nematodos o insectos.

Dichos genes se describen en particular en las solicitudes de patentes PCT publicadas WO 91/02071 y WO95/06128.

Entre las secuencias de ADN que codifican unas proteínas que confieren tolerancia a ciertos herbicidas en las células de plantas y las plantas transformadas, se puede hacer mención de un gen de bar o PAT o del gen de *Streptomyces coelicolor* que se ha descrito en el documento WO2009/152359 que confiere tolerancia a herbicidas, un gen que codifica una apropiada EPSPS (acrónimo de Enol Pyruvyl Shikimate Phosphate Syntasa, enolpiruvilshikimato fosfato sintasa) que confiere tolerancia a herbicidas que tienen una EPSPS como una diana, tales como glifosato y sus sales (documentos US 4.535.060, US 4.769.061, US 5.094.945, US 4.940.835, US 5.188.642, US 4.971.908, US 5.145.783, US 5.310.667, US 5.312.910, US 5.627.061, US 5.633.435), o un gen que codifica una glifosato oxidoreductasa (documento US 5.463.175).

Entre las secuencias de ADN que codifican una apropiada EPSPS que confiere tolerancia a los herbicidas que

5 tienen una EPSPS como una diana, se hará mención más particularmente del gen que codifica una EPSPS de planta, en particular una EPSPS de maíz, particularmente una EPSPS de maíz que comprende dos mutaciones, particularmente una mutación en la posición de aminoácido 102 y una mutación en la posición de aminoácido 106 (documento WO 2004/074443), y que se describe en la solicitud de patente del documento US 6566587, que se denomina en lo sucesivo EPSPS doble mutante de maíz o 2mEPSPS, o del gen que codifica una EPSPS aislada de *Agrobacterium* y que se describe por las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 del documento de patente US 5.633.435, que se denomina también CP4.

10 Entre las secuencias de ADN que codifican una apropiada EPSPS que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen una EPSPS como una diana, se hará mención más particularmente del gen que codifica una EPSPS GRG23 procedente de *Arthrobacter globiformis*, pero también las mutantes GRG23 ACE1, GRG23 ACE2, o GRG23 ACE3, particularmente las mutantes o variantes de GRG23 tal como se describen en el documento WO2008/100353, tales como GRG23(ace3)R173K de la SEQ ID NO: 29 en el documento WO2008/100353.

15 En el caso de las secuencias de ADN que codifican una EPSPS, y más particularmente que codifican los anteriores genes, la secuencia que codifica estas enzimas es precedida ventajosamente por una secuencia que codifica un péptido de tránsito, en particular el "péptido de tránsito optimizado" que se describe en el documento de patente US 5.510.471 o 5.633.448.

20 En el documento WO 2007/024782, se describen unas plantas que son tolerantes a glifosato y por lo menos a un agente inhibidor de ALS (acetolactato sintasa). Más específicamente, se describen unas plantas que contienen genes que codifican a polipéptido GAT (Glifosato - N-Acetil Transferasa) y un polipéptido que confiere resistencia a agentes inhibidores de ALS.

En el documento de patente US 6.855.533, se describieron plantas transgénicas de tabaco que contienen genes mutados de *Arabidopsis* ALS/AHAS.

25 En el documento de patente US 6.153.401, se describen unas plantas que contienen genes que codifican 2,4-D monooxigenasas que confieren tolerancia al 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) por metabolización.

En los documentos US 2008/0119361 y US 2008/0120739, se describen unas plantas que contienen genes que codifican dicamba monooxigenasas que confieren tolerancia a dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) por metabolización.

Todos los rasgos de tolerancia a herbicidas, que antes se mencionan, pueden ser combinados con los que desarrollan una tolerancia a las HPPD que son objeto de esta invención.

30 Entre las secuencias de ADN que codifican unas proteínas que conciernen a propiedades de tolerancia a insectos, se hará mención más particularmente a las proteínas Bt ampliamente descritas en la bibliografía y bien conocidas para los expertos en la especialidad. Se hará mención también a unas proteínas extraídas de bacterias tales como *Photobacterium* (documentos WO 97/17432 & WO 98/08932).

35 Entre dichas secuencias de ADN que codifican proteínas de interés que confieren nuevas propiedades de tolerancia a insectos, se hará mención más particularmente a las proteínas Bt Cry o VIP, ampliamente descritas en la bibliografía y bien conocidas por los expertos en la especialidad. Éstas incluyen la proteína Cry1F o híbridos derivados de una proteína Cry1F (por ejemplo, las proteínas híbridas Cry1A-Cry1F que se describen en los documentos US 6.326.169; US 6.281.016; US 6.218.188, o fragmentos tóxicos de las mismas), las proteínas del tipo Cry1A o fragmentos tóxicos de las mismas, de manera preferible la proteína Cry1Ac o híbridos derivados de la proteína Cry1Ac (por ejemplo, la proteína híbrida Cry1Ab-Cry1Ac que se describe en el documento US 5.880.275) o la proteína Cry1Ab o Bt2 o fragmentos insecticidas de la misma tal como se describen en el documento EP451878, las proteínas Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag tal como se describen en el documento WO02/057664 o fragmentos tóxicos de la misma, la proteína Cry1A.105 que se describe en el documento WO 2007/140256 (SEQ ID NO: 7) o un fragmento tóxico de la misma, la proteína VIP3Aa19 con el número de registro al NCBI ABG20428, la proteína VIP3Aa20 con el número de registro al NCBI ABG20429 (SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2007/142840), las proteínas VIP3A producidas durante los sucesos en algodón COT202 o COT203 (documentos WO 2005/054479 y WO 2005/054480, respectivamente), las proteínas Cry que se describen en el documento WO01/47952, la proteína VIP3Aa o un fragmento tóxico de la misma, tal como se describen tal como se describen en la cita de Estruch y col. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28;93(11):5389-94 y en el documento US 6.291.156, las proteínas insecticidas procedentes de *Xenorhabdus* (as que se describen en el documento WO98/50427), de *Serratia* (particularmente procedentes de *S. entomophila*) o de cepas de *Photobacterium* especies, tales como las proteínas Tc procedentes de *Photobacterium* tal como se describen en el documento WO98/08932 (por ejemplo, en las citas de Watercamp y col., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; y de Ffrench-Constant y Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5):828-33). También se incluyen en el presente contexto cualesquiera variantes o mutantes de cualquiera de estas proteínas que difieren en algunos (1-10, de manera preferible 1-5) aminoácidos con respecto de cualquiera de las anteriores secuencias, particularmente la secuencia de su fragmento tóxico, o que están fusionadas con un péptido de tránsito, tales como un péptido de tránsito de plastidio, u otra/o proteína o péptido.

60 La presente invención también se refiere a un gen quimérico (o casete de expresión) que comprende una secuencia codificante así como los elementos reguladores heterólogos en las posiciones 5' y/o 3', por lo menos en la posición 5', que son capaces de funcionar dentro de un organismo hospedador, en particular de células de plantas o plantas, con la secuencia codificante que contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD como antes se ha definido.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un gen quimérico como antes se ha descrito, en el que el organismo hospedador se selecciona entre bacterias, levaduras, *Pichia*, hongos, baculovirus, células in vitro, protoplastos, células de plantas, plantas, partes de plantas, y semillas de estas plantas.

5 En otra realización particular, la presente invención se refiere a un gen quimérico tal como se ha descrito con anterioridad, en que el gen quimérico contiene, en la posición 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de acuerdo con la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito de planta, estando dispuesta esta secuencia entre la región de promotor y la secuencia que codifica la HPPD de acuerdo con la invención de tal manera que se permite la expresión de una proteína de fusión de péptido de tránsito/HPPD.

10 En otra realización adicional particular, la presente invención se refiere al uso de herbicidas inhibidores de las HPPD en plantas, partes de plantas o semillas de plantas que comprenden un gen tolerante a las HPPD de acuerdo con la invención, o al uso de herbicidas inhibidores de las HPPD en una tierra en la que dichas plantas, partes de plantas o semillas han de crecer o se han de sembrar, ya sea a solas o en combinación con uno o más otros herbicidas conocidos que actúan de una manera diferente de la de los inhibidores de las HPPD. En una realización más particular, el herbicida inhibidor de las HPPD que se emplea es seleccionado entre el conjunto que consiste en  
 15 tricetonas (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD tricetonas), tales como tembotriona, sulcotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, particularmente tembotriona, en la clase de las dicetonas tales como dicetonitrilos de la clase de los isoxazoles tales como isoxaflutol o en la clase de los pirazolinatos (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD pirazolinatos), tales como pirasulfotol, pirazolato, topramezona, benzofenap; incluso más específicamente, la presente invención se refiere a la aplicación de tembotriona, mesotriona,  
 20 dicetonitrilo, biciclopirona, tefuriltriona, benzofenap, pirasulfotol, pirazolato y sulcotriona a dichas plantas, partes de plantas o semillas de plantas que son tolerantes a dichos agentes inhibidores de las HPPD.

Como una secuencia reguladora que funciona como un promotor en células de plantas y en plantas, se puede hacer uso de cualquier secuencia de promotor de un gen que sea expresado de modo natural en plantas, en particular de un promotor que sea expresado especialmente en las hojas de plantas, tal como por ejemplo de promotores  
 25 "constitutivos" de origen bacteriano, vírico o vegetal, o de promotores "dependientes de la luz", tales como el de un gen de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilasas/oxigenasa de plantas (RuBisCO) o de cualquier apropiado gen conocido expresable por promotores, que se pueda usar. Entre los promotores de origen vegetal, se hará mención a los promotores de histona como se describen en el documento EP 0 507 698 A1, el promotor de actina de arroz (documento US 5.641.876), o un promotor de ubiquitina vegetal (documento US 5.510.474).

30 Entre los promotores de un gen de virus vegetal, se hará mención a los del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 19S o 35S, Sanders y col. (1987), *Nucleic Acids Res.* 15(4):1543-58.), los del circovirus (documento de patente australiana AU 689 311) o los del virus de mosaico de vena de Cassava (CsVMV, US 7.053.205).

En una realización de esta invención, se puede usar una secuencia de promotor específica para particulares regiones o tejidos de plantas con el fin de expresar las proteínas HPPD de la invención, tales como promotores  
 35 específicos para semillas (Datla, R. y col., 1997, *Biotechnology Ann. Rev.* 3, 269-296), especialmente el promotor de napina (documento EP 255 378 A1), el promotor de faseolina, el promotor de glutenina, el promotor de heliantinina (documento WO 92/17580), el promotor de albúmina (documento WO 98/45460), el promotor de oleosina (documento WO 98/45461), el promotor de SAT1 o el promotor de SAT3 (documento PCT/US98/06978).

Se puede hacer uso también de un promotor inducible escogido ventajosamente entre los promotores de fenilalanina amoniaco liasa (PAL), de la HMG-CoA reductasa (HMG), de quitinasa, de glucanasa, del inhibidor de proteinasa (PI), de genes de la familia PR1, de nopalina sintasa (nos) y de vspB (documento US 5 670 349, Tabla 3), el promotor de HMG2 (documento US 5 670 349), el promotor de beta-galactosidasa de manzana (ABG1) y el promotor de aminociclopropano carboxilato sintasa de manzana (ACC sintasa) (documento WO 98/45445).

De acuerdo con la invención, se puede hacer uso también, en combinación con el promotor, de otras secuencias reguladoras, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como unos activadores de la transcripción ("intensificadores"), por ejemplo el activador de la traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV), que se describe en el documento de solicitud WO 87/07644, o del virus del grabado del tabaco (TEV) que se ha descrito por Carrington & Freed 1990, *J. Virol.* 64: 1590-1597, por ejemplo, o intrones tales como el intrón adh1 de maíz o el intrón 1 de actina de arroz.

50 En una realización particular adicional, el gen de la invención está presente en plantas en múltiples copias, preferentemente en dos copias, cada una de ellas controlada por un promotor expresable de planta diferente.

En una realización particular adicional, el gen quimérico de la invención puede combinarse con cualquier gen quimérico adicional que codifica una proteína HPPD, preferentemente estos diferentes genes están controlados por diferentes elementos reguladores que son activos en las plantas. El gen quimérico de la invención se puede  
 55 combinar con un gen de monooxigenasa (gen nsf1) de Maíz CYP450, que está bajo el control de un promotor expresable de planta idéntico o diferente.

Como una secuencia terminadora de regulación o de poliadenilación se puede hacer uso de cualquier correspondiente secuencia de origen bacteriano, tal como por ejemplo la del terminador nos de *Agrobacterium*

*tumefaciens*, de origen vírico, tal como por ejemplo la del terminador de CaMV 35S, o de origen vegetal, tal como por ejemplo la de un terminador de histona tal como se describe en la solicitud de patente publicada EP 0 633 317 A1.

El término "gen" tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una región que codifica un ADN, flanqueada por secuencias reguladoras en 5' y/o 3', que permiten que sea transcrito un ARN que puede ser traducido en una proteína, que comprende típicamente por lo menos una región de promotor. Un "gen quimérico", cuando se refiere a un ADN que codifica una HPPD de esta invención, se refiere a una secuencia de un ADN que codifica una HPPD que tiene unas secuencias reguladoras en 5' y/o 3' diferentes de las secuencias reguladoras en 5' y/o 3' bacterianas presentes en la naturaleza que impulsan la expresión de la proteína HPPD en su célula hospedadora natural (que también se citan como "promotor heterólogo" o "secuencias reguladoras heterólogas").

Los términos "ADN/proteína que comprende la secuencia X" y "ADN/proteína con la secuencia que comprende secuencia X", tal como se usan en el presente contexto, se refieren a un ADN o a una proteína que incluye o que contiene por lo menos la secuencia X en su secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, de tal manera que otras secuencias de nucleótidos o de aminoácidos pueden ser incluidas en el extremo 5' (o N terminal) y/o 3' (o C terminal), por ejemplo, un péptido de tránsito o de señal N terminal. El término "que comprende", tal como se usa en el presente contexto, es una modalidad de lenguaje de extremo abierto en el significado de "incluir", lo que significa que otros elementos distintos de los citados específicamente pueden también estar presentes. El término "que consiste en", tal como se usa en el presente contexto, es una modalidad de lenguaje de extremo cerrado, es decir que solamente están presentes los elementos que se citan específicamente. El término "ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia X", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un ADN que comprende una secuencia codificante, que después de una transcripción y traducción, da como resultado una proteína que contiene por lo menos una secuencia de aminoácidos X. Un ADN que codifica una proteína no necesita ser un ADN presente en la naturaleza y puede ser un ADN semisintético, plenamente sintético o artificial y puede incluir intrones y regiones flanqueadoras en 5' y/o 3'. El término "secuencia de nucleótidos" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de una molécula de ADN o ARN, que puede estar en la forma de una sola hebra (monocatenaria) o de doble hebra (bicatenaria).

Las proteínas HPPD pueden ser equipadas con un péptido de señal de acuerdo con procesos bien conocidos en la especialidad, véase, p. ej., la solicitud de patente PCT publicada WO 96/10083, o pueden ser reemplazadas por otros péptidos, tales como un péptido de tránsito de cloroplastos (por ejemplo, Van Den Broeck y col., 1985, Nature 313, 358, o un péptido de tránsito de cloroplastos modificado del documento de patente US 5.510.471) que causa un transporte de la proteína a los cloroplastos, por un péptido de señal secretora o por un péptido que dirige a la proteína a la diana de otros plastidios, mitocondrios, de los ER, u otros orgánulos, o pueden ser reemplazadas por un aminoácido metionina o por un dipéptido de metionina-alanina. Unas secuencias de señal para la dirección hacia orgánulos intracelulares o para la secreción fuera de la célula de planta o hacia la pared de la célula, se hallan en proteínas dirigidas a dianas o segregadas de modo natural, de manera preferible las descritas por Klösgen y col. (1989, Mol. Gen. Genet. 217, 155-161), Klösgen y Weil (1991, Mol. Gen. Genet. 225, 297-304), Neuhaus & Rogers (1998, Plant Mol. Biol. 38, 127-144), Bih y col. (1999, J. Biol. Chem. 274, 22884-22894), Morris y col. (1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, 328-333), Hesse y col. (1989, EMBO J. 8 2453-2461), Tavladoraki y col. (1998, FEBS Lett. 426, 62-66), Terashima y col. (1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 516-523), Park y col. (1997, J. Biol. Chem. 272, 6876-6881), Shcherban y col. (1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92, 9245-9249), todas cuyas citas son incorporadas en el presente contexto por su referencia, particularmente las secuencias de péptidos de señal procedentes de proteínas dirigidas a dianas o segregadas de maíz, algodón, soja o arroz. Una secuencia de ADN que codifica dicho péptido de señal de planta puede ser introducida en el gen quimérico que codifica la proteína HPPD para la expresión en plantas.

A menos que se señale otra cosa distinta en los ejemplos, todos los procesos para producir y manipular un ADN recombinante se llevan a cabo por los procedimientos clásicos descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989), y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel y col. (1994) Current Protocols en Molecular Biology [Protocolos actuales en biología molecular], Current Protocols, USA. Materiales y procedimientos clásicos para el trabajo en biología molecular se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.R.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications (UK). Procesos para la tecnología de PCR (acrónimo de Polymerase Chain Reaction = reacción en cadena de la polimerasa) se pueden hallar en "PCR protocols: a guide to methods and applications" [Protocolos de PCR: una guía para procedimientos y aplicaciones], compilado por M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Academic Press, Inc., 1990).

Los términos "tolerancia", "tolerante" o "menos sensible" se usan intercambiamente y significan los niveles relativos de tolerancia inherente de la HPPD escrutada de acuerdo con un fenotipo indicador visible de la cepa o de la planta transformada con un ácido nucleico que comprende el gen que codifica la respectiva proteína HPPD en la presencia de diferentes concentraciones de los diversos agentes inhibidores de las HPPD. Unas respuestas a dosis y unos desplazamientos relativos en las respuestas a dosis asociadas con estos fenotipos indicadores (formación de color pardo, inhibición del crecimiento, blanqueo, efecto herbicida, etc) se expresan convenientemente en términos, por ejemplo, de valores de la GR50 (concentración para una reducción de 50 % del crecimiento) o de la MIC (concentración inhibitoria mínima) en que unos aumentos en los valores corresponden a unos aumentos en la tolerancia inherente de la HPPD expresada, de la manera normal basada en un daño causado a plantas, síntomas



de blanqueo meristemático, etc., en una gama de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos pueden ser expresados en términos de, por ejemplo, valores de GR50 derivados de las curvas de dosis/respuesta que tienen “una dosis” representada gráficamente en el eje de las x y “un porcentaje de destrucción”, “un efecto herbicida”, “números de plantas verdes que brotan”, etc., representados en el eje de las y, en que unos valores de GR50  
5 aumentados corresponden a unos niveles aumentados de tolerancia inherente de la HPPD expresada. Los herbicidas pueden ser aplicados de manera apropiada antes del brote o después del brote. De manera similar, el nivel de tolerancia del ácido nucleico o del gen que codifica una proteína HPPD de acuerdo con la invención o la proteína HPPD de la invención es escrutado mediante una transgénesis, una regeneración, una crianza y un ensayo por rociada de una planta de ensayo tal como una de tabaco, o una planta cultivada tal como una de soja o algodón,  
10 y de acuerdo con estos resultados, dichas plantas son por lo menos 2-4 veces más tolerantes a agentes inhibidores de la HPPD, tales como tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo y/o biciclopirona, que unas plantas que no contienen ningún gen exógeno que codifique una proteína HPPD, o que unas plantas que contienen un gen que codifica un ADN de HPPD de *Arabidopsis thaliana*, bajo el control del mismo promotor que el del ADN de HPPD de la invención.

Se entiende que un “organismo hospedador” u “hospedador” es cualquier organismo heterólogo unicelular o multicelular dentro del cual se puede introducir un ácido nucleico o un gen quimérico de acuerdo con la invención,  
15 con la finalidad de producir una HPPD de acuerdo con la invención. Estos organismos son, en particular, bacterias, por ejemplo, de *E. coli*, levaduras, en particular de los géneros *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, *Pichia*, hongos, en particular *Aspergillus*, un baculovirus o, preferentemente, células de plantas y plantas.

Se entiende que una “célula de planta”, de acuerdo con la invención, es cualquier célula que deriva de, o que se halla en, una planta, y que es capaz de formar, o que es parte de, tejidos no diferenciados, tales como callos, tejidos diferenciados tales como embriones, partes de plantas, plantas o semillas. Esto incluye protoplastos y polen, células  
20 de plantas cultivadas o protoplastos que han crecido in vitro, y células de plantas que se pueden regenerar para dar una planta completa.

Se entiende que una “planta”, de acuerdo con la invención, es cualquier organismo multicelular diferenciado que es capaz de realizar la fotosíntesis, en particular, un organismo monocotiledóneo o dicotiledóneo, más especialmente plantas cultivadas que están destinadas o no están destinadas a la nutrición de animales o seres humanos, tales como maíz o maíz en grano, trigo, plantas de *Brassica spp.* tales como de *Brassica napus* o *Brassica juncea*,  
25 especies de soja, arroz, caña de azúcar, raíz de remolacha, tabaco, algodón, plantas de hortalizas tales como las de pepino, puerro, zanahoria, tomate, lechuga, pimientos, melón, sandía, etc. El término “plantas transgénicas”, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a plantas que comprenden un gen ajeno o heterólogo introducido establemente en su genoma.

En una realización, la invención se refiere a la transformación de plantas. Cualquier secuencia de promotor de un gen que es expresado de modo natural en plantas, o cualquier híbrido o combinación de elementos promotores de genes expresados de modo natural en plantas, incluyendo promotores de *Agrobacterium* o de virus de plantas, o cualquier promotor que sea apropiado para controlar la transcripción de un gen de tolerancia a herbicidas en plantas,  
35 se puede usar como la secuencia de promotor en las plantas de la invención (denominado “promotor expresable en plantas” en el presente contexto). Ejemplos de dichos promotores expresados en plantas se han descrito anteriormente. En una realización de esta invención, dichos promotores expresables en plantas están conectados operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína HPPD de la invención para formar un gen quimérico de HPPD de esta invención.

De acuerdo con la invención, es también posible usar, en combinación con la secuencia reguladora de promotor, otras secuencias reguladoras que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como secuencias de intrones, o activadores de la transcripción (intensificadores). Anteriormente se han descrito ejemplos de dichas secuencias reguladoras apropiadas.

Cualquier correspondiente secuencia de origen bacteriano o vírico, tal como el terminador nos procedente de *Agrobacterium tumefaciens*, o de origen vegetal, tal como un terminador de histona tal como se describe en el documento de solicitud EP 0 633 317 A1, se puede usar como secuencia reguladora de terminación de la transcripción (y de la poliadenilación).

En una realización particular de la invención, se emplea una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito en 5' (corriente arriba) de la secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD exógena de acuerdo con la invención, estando dispuesta esta secuencia de péptido de tránsito entre la región de promotor y la secuencia que codifica la HPPD exógena, de tal manera que se permite la expresión de una proteína de fusión del péptido de tránsito y de la HPPD, tal como la proteína de las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID No 21. El péptido de tránsito hace posible dirigir a las HPPD dentro de los plastidios, más especialmente de los cloroplastos,  
55 siendo disociada la proteína de fusión entre el péptido de tránsito y la proteína HPPD de la invención cuando esta última entra en el plastidio. El péptido de tránsito puede ser un único péptido, tal como un péptido de tránsito de EPSPS (que se describe en el documento de patente US 5.188.642) o un péptido de tránsito de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilasa/oxigenasa de plantas (RuBisCO ssu) que, cuando sea apropiado, incluye unos pocos aminoácidos de la parte N terminal de la RuBisCO ssu madura (documento EP 189 707 A1), o bien puede ser una fusión de varios péptidos de tránsito tales como un péptido de tránsito que comprende un primer péptido de  
60

tránsito de una planta que está fusionado con una parte de la secuencia N terminal de una proteína madura que tiene una localización en plastidio, siendo esta parte a su vez fusionada con un segundo péptido de tránsito de una planta, tal como se describe en el documento de patente EP 508 909 A1, y, más especialmente, el péptido de tránsito optimizado que comprende un péptido de tránsito de la RuBisCO ssu de girasol fusionado con 22 aminoácidos del extremo N terminal de la RuBisCO ssu de maíz, a su vez fusionado con el péptido de tránsito de la RuBisCO ssu de maíz, tal como se describe, con su secuencia codificante, en el documento de patente EP 508 909 A1.

La presente invención también se refiere a la proteína de fusión de un péptido de tránsito y una HPPD y a un ácido nucleico o un gen quimérico expresable en plantas que codifica dicha proteína de fusión, en que los dos elementos de esta proteína de fusión son tal como se han descrito anteriormente. La presente invención también se refiere a un vector de clonación, de transformación y/o de expresión, cuyo vector contiene por lo menos un gen quimérico tal como se ha definido anteriormente. Además del anterior gen quimérico, este vector puede contener un origen de replicación. Este vector puede ser un plásmido o una porción de un plásmido, un cósmido, o un bacteriófago o un virus que ha sido transformado por introducción del gen quimérico de acuerdo con la invención. Unos vectores de transformación son bien conocidos para la persona experta y han sido ampliamente descritos en la bibliografía. El vector de transformación que se puede usar, en particular, para transformar células de plantas o plantas puede ser un virus, que se puede emplear para transformar células de plantas o plantas y que adicionalmente contiene sus propios elementos de replicación y expresión. De acuerdo con la invención, el vector para transformar células de plantas o plantas, es de manera preferible un plásmido tal como un plásmido Ti desarmado de *Agrobacterium*.

La presente divulgación también se refiere a los organismos hospedadores, en particular a las células de plantas, semillas o plantas que comprenden un gen quimérico el cual comprende a su vez una secuencia que codifica una proteína HPPD de la invención, tal como una proteína que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 18, o de las SEC ID NO:5, 6, 7, 19, 20, o 21, tal como se ha definido anteriormente, y al uso de las plantas o semillas de la invención en un campo para hacer crecer una planta cultivada y cosechar un producto vegetal, por ejemplo especies de soja, granos de arroz, trigo, cebada o maíz o cápsulas de algodón, en que, en una realización, dicho uso implica la aplicación de un herbicida inhibidor de las HPPD a dichas plantas para reprimir malezas. En una realización de esta invención, en dicho uso, los agentes inhibidores de las HPPD son tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuriltriona, particularmente tembotriona.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un organismo hospedador, en particular a una célula de planta, una semilla o una planta, que está caracterizado porque contiene por lo menos un gen quimérico de la HPPD tal como antes se ha descrito, o por lo menos una secuencia de ácido nucleico de HPPD tal como anteriormente se ha descrito.

La divulgación se refiere a una célula de planta o una planta, que está caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HPPD de esta invención, que retiene sus propiedades de catalizar la conversión de un parahidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que hace a la planta más tolerante, que las plantas de la misma especie que no comprenden dicha proteína HPPD de la presente invención, particularmente a tricetonas, o a pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuriltriona, particularmente tembotriona, y tales plantas que contienen la HPPD de la invención tienen una tolerancia agrónomicamente aceptable a un herbicida inhibidor de las HPPD, particularmente a tricetonas, o a pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuriltriona, particularmente tembotriona.

En otra forma particular de realización, la presente invención se refiere a una célula de planta o a una planta caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de esta invención, que retiene sus propiedades de catalizar la conversión de un parahidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que es menos sensible a un agente inhibidor de las HPPD que la HPPD endógena de la planta hospedadora, tal como la HPPD procedente de *Arabidopsis thaliana*, particularmente la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 (desde la posición de aminoácido 126 hasta la posición de aminoácido 568), o que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID No.11 o SEQ ID NO: 12 (desde la posición de aminoácido 134 hasta la posición de aminoácido 575).

En una realización particular, la presente invención se refiere a una célula de planta hospedadora, a una semilla de planta hospedadora o a una planta hospedadora, caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de la invención tal como se ha definido en el presente contexto, en que la HPPD de la invención es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los/las isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, más especialmente isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, biciclopirona, tefuriltriona, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub>fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> fenil)propano-1,3-diona, incluso más particularmente tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo, biciclopirona, topamezona, pirazolato, benzofenap, sulcotriona, tefuriltriona, y pirasulfotol, de manera sumamente particular tembotriona, mesotriona y biciclopirona.

En otra realización particular, la presente invención se refiere a una célula de planta o a una planta, caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia del ácido nucleico que codifica una HPPD de la invención tal como se ha descrito con anterioridad, y además un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas tal

como se ha descrito más arriba, conectado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima PDH (prefenato deshidrogenasa) (documento US 2005/0257283).

La presente invención también se refiere a las plantas que contienen células transformadas, en particular a las plantas que son regeneradas a partir de las células transformadas, y a plantas de progeñie o semillas de las mismas, que comprenden el gen quimérico de HPPD de la invención. La regeneración se puede obtener por cualquier procedimiento apropiado, siendo el procedimiento dependiente de la naturaleza de la especie, tal como se ha descrito, por ejemplo, en las referencias anteriores. Se pueden citar las siguientes patentes y solicitudes de patentes, en particular, con respecto a los procedimientos para transformar células de plantas y regenerar plantas:

documentos US 4.459.355, US 4.536.475, US 5.464.763, US 5.177.010, US 5.187.073, EP 267.159 A1, EP 604 662 A1, EP 672 752 A1, US 4.945.050, US 5.036.006, US 5.100.792, US 5.371.014, US 5.478.744, US 5.179.022, US 5.565.346, US 5.484.956, US 5.508.468, US 5.538.877, US 5.554.798, US 5.489.520, US 5.510.318, US 5.204.253, US 5.405.765, EP 442 174 A1, EP 486 233 A1, EP 486 234 A1, EP 539 563 A1, EP 674 725 A1, WO 91/02071 y WO 95/06128.

La presente invención también se refiere a las plantas transgénicas o a partes de las mismas, que se obtienen cultivando y/o cruzando las anteriores plantas transgénicas, y a las semillas de las plantas transgénicas, que comprenden el gen quimérico de HPPD de la invención.

La presente invención también se refiere a los productos finales tales como la harina o el aceite, que se obtienen de las plantas, de partes de las mismas o de las semillas de la invención.

Las plantas transformadas que se pueden obtener de acuerdo con la invención pueden ser del tipo monocotiledóneo, tales como las de trigo, cebada, caña de azúcar, arroz, cebolla, y maíz o grano de maíz, o del tipo dicotiledóneo, tales como tabaco, especies de soja, alfalfa, *Brassica spp.*, plantas tales como colza de semilla oleaginosa, algodón, remolacha azucarera, trébol, hortalizas, etc.

La invención se refiere a un procedimiento para transformar organismos hospedadores, en particular células de plantas o plantas, por integración en dichos organismos de por lo menos una secuencia de ácido nucleico o de un gen quimérico tal como antes se ha definido, en el que es posible obtener la transformación por cualesquiera medios conocidos apropiados, cuyos medios se describen ampliamente en la bibliografía especialista y, en particular, en las referencias citadas en la presente solicitud, por ejemplo por uso del vector de acuerdo con la invención.

Un procedimiento de transformación de acuerdo con esta invención comprende bombardear células, protoplastos o tejidos con partículas sólidas o líquidas a las cuales se ha añadido un ADN, o que contienen un ADN. Otro procedimiento de transformación comprende usar, como el medio para transferir a la planta, un gen quimérico que es introducido en un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Se pueden usar otros procedimientos tales como una microinyección o electroporación, o dirigir de otro modo la transferencia del gen usando PEG. La persona experta puede seleccionar cualquier procedimiento apropiado para transformar el organismo hospedador que se ha de elegir, en particular la célula de planta o la planta, tal como por ejemplo, la tecnología para la transformación de soja ha sido descrita extensamente en los ejemplos 1 hasta 3 divulgados en el documento EP 1186666 A1. Para el arroz, se podrían realizar una transformación mediada por *Agrobacterium* (Hiei y col., 1994 Plant J 6:271-282, y Hiei y col., 1997 Plant Mol Biol. 35:205-21, incorporadas en el presente contexto por su referencia), una electroporación (documentos US 5.641.664 y US 5.679.558) o un bombardeo (Christou y col., 1991, Biotechnology 9:957 incorporada en el presente contexto por su referencia). Una apropiada tecnología para la transformación de plantas monocotiledóneas, y particularmente de arroz, se describe en el documento WO 92/09696, incorporado en el presente contexto por su referencia. Para el algodón, se han descrito una transformación mediada por *Agrobacterium* (Gould J.H. y Magallanes-Cedeno M., 1998 Plant Molecular Biology reporter, 16:1-10 y Zapata C., 1999, Theoretical Applied Genetics, 98(2):1432-2242), transformación mediada por polibreno y/o por tratamiento (Sawahel W.A., 2001, - Plant Molecular Biology reporter, 19:377a-377f).

En una realización particular de la invención, la HPPD de la invención es dirigida hacia una diana dentro del cloroplasto. Esto se puede hacer fusionando una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HPPD de la invención para obtener un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión tal como antes se ha descrito.

Alternativamente, la HPPD de la invención se puede expresar directamente en los plastidios tales como los cloroplastos, usando una transformación del plastidio, tal como el genoma de cloroplastos. Un procedimiento apropiado comprende el bombardeo de células o tejidos vegetales con partículas sólidas revestidas con el ADN o con partículas líquidas que comprenden el ADN, y la integración del gen introducido que codifica la proteína de la invención por recombinación homóloga. Unos apropiados vectores y sistemas de selección son conocidos para la persona experta en la especialidad. Un ejemplo de medios y procedimientos que se pueden usar para dicha integración en el genoma de cloroplastos de plantas de tabaco se da en el documento WO 06/108830, cuyo contenido es incorporado por la presente por su referencia.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para obtener una planta tolerante a un agente inhibidor de las HPPD, caracterizado porque la planta es transformada con un gen quimérico de HPPD de la invención, tal

como se ha descrito con anterioridad.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para obtener una planta tolerante a un agente inhibidor de las HPPD, caracterizado porque la planta contiene un gen quimérico de HPPD de la invención que comprende una secuencia codificante así como un elemento regulador heterólogo en la posición 5' y opcionalmente en la posición 3', que son capaces de funcionar en un organismo hospedador, caracterizado porque la secuencia codificante comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico que define un gen que codifica una HPPD de la invención tal como se ha descrito con anterioridad.

En una realización de esta invención, el agente inhibidor de las HPPD en el procedimiento anterior es un herbicida del tipo de tricetona o pirazolinato, de manera preferible tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, pirasulfotol, pirazolato, dicetonitrilo, benzofenap o sulcotriona, particularmente tembotriona.

De acuerdo con esta invención, se proporciona también un procedimiento para obtener una planta tolerante a un agente inhibidor de las HPPD tal como se ha descrito más arriba, caracterizado porque se obtiene una planta que comprende un primer transgén, que es un gen quimérico de HPPD de la invención, y un segundo transgén, que es un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas, conectado operativamente a un ácido nucleico que codifica una enzima PDH (prefenato deshidrogenasa). Una planta que comprende dichos dos transgenes se puede obtener transformando una planta con un transgén, y luego volviendo a transformar esta planta transgénica con el segundo transgén, o transformando una planta con los dos transgenes simultáneamente (en el mismo ADN o vector o en 2 diferentes ADN's o vectores de transformación), o cruzando una planta que comprende el primer transgén con una planta que comprende el segundo transgén, tal como es bien conocido en la especialidad.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para eliminar selectivamente malezas o impedir la germinación de malezas en un campo en el que se han de plantar plantas o en el que se han de sembrar semillas, o en un cultivo de plantas, por aplicación de un agente inhibidor de las HPPD a dicho campo o cultivo de plantas, en particular un herbicida inhibidor de las HPPD tal como se ha definido con anterioridad, cuyo procedimiento está caracterizado porque este herbicida inhibidor de las HPPD es aplicado a plantas que han sido transformadas de acuerdo con la invención, ya sea antes de sembrar la planta cultivada (lo que se denomina en lo sucesivo aplicación antes de plantar), antes del brote de la planta cultivada (lo que se denomina en lo sucesivo aplicación antes del brote), o después del brote de la planta cultivada (lo que se denomina en lo sucesivo aplicación después del brote).

La presente invención también se refiere a un procedimiento para cultivar las plantas que han sido transformadas con un gen quimérico de acuerdo con la invención, cuyo procedimiento comprende plantar semillas que comprenden un gen quimérico de la invención, en una zona de un campo que es apropiada para cultivar dichas plantas, y aplicar, si están presentes malezas, una dosis, que es tóxica para las malezas, de un herbicida cuya diana es la HPPD antes definida a dicha zona de dicho campo, sin afectar significativamente a dichas semillas transformadas ni a dichas plantas transformadas, y luego cosechar las plantas cultivadas o las partes de plantas, cuando éstas alcanzan la etapa deseada de madurez y, cuando sea apropiado, separar las semillas con respecto de las plantas cosechadas.

En los procedimientos anteriores, el herbicida cuya diana es la enzima de HPPD se puede aplicar de acuerdo con la invención, ya sea antes de sembrar la planta cultivada, antes de que la planta cultivada brote o después de que la planta cultivada brote.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para obtener un aceite, particularmente un aceite de soja spp, maíz o algodón, o una harina, que comprende hacer crecer una planta cultivada, particularmente una planta cultivada de soja spp, expresar una proteína HPPD de la invención, opcionalmente tratar dicha planta cultivada con un herbicida inhibidor de las HPPD, cosechar los granos y moler los granos para producir una harina y extraer el aceite. También las semillas o los granos, ya sea enteras/os, rotas/os o trituradas/os, que comprenden el gen quimérico de la invención, son parte de esta invención.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un aceite o una harina, que comprende hacer crecer una planta transformada tal como antes se ha descrito, opcionalmente tratar dicha planta con un herbicida inhibidor de las HPPD, cosechar los granos y moler estos granos para producir una harina y extraer el aceite.

Se proporcionan adicionalmente en esta invención los anteriores procedimientos que implican a un herbicida inhibidor de las HPPD seleccionado entre isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, pirasulfotol, sulcotriona, biciclopirona, tefuriltriona, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonyl)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)-propano-1,3-diona.

También se proporcionan en el presente contexto los anteriores procedimientos de la invención que implican a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona.

Dentro del significado de la presente invención, se entiende que un "herbicida" es una sustancia activa como herbicida por sí misma o tal sustancia que está combinada con un aditivo que altera su eficacia tal como, por ejemplo, un agente que aumenta su actividad (un agente sinérgico) o que limita su actividad (un antídoto). Desde luego, se ha de entender que, para su aplicación en la práctica, los anteriores herbicidas son combinados, de una manera que es de por sí conocida, con los agentes coadyuvantes de formulación que habitualmente se emplean en

la química agrícola.

Unos herbicidas inhibidores de las HPPD tales como los de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionada entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, tienen una actividad herbicida sobresaliente contra un amplio espectro de plantas dañinas anuales monocotiledóneas y dicotiledóneas económicamente importantes. Las sustancias activas también actúan eficientemente sobre plantas dañinas perennes que producen vástagos a partir de rizomas, cepellones, tallos leñosos u otros órganos perennes, y que son difíciles de reprimir.

La presente divulgación por lo tanto también se refiere a un procedimiento de reprimir plantas indeseadas o para regular el crecimiento de las plantas en cultivos de plantas que comprenden una HPPD de acuerdo con la invención, en el que uno o más herbicidas inhibidores de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionados entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, se aplica(n) a las plantas (por ejemplo plantas dañinas tales como malezas o plantas cultivadas indeseadas monocotiledóneas o dicotiledóneas), a las semillas (por ejemplo granos, semillas o propágulos vegetativos tales como tubérculos o partes de vástagos con pimpollos) o a la zona en la que crecen las plantas (por ejemplo la zona sometida a cultivación). En este contexto, un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, se puede aplicar por ejemplo antes de plantar (si fuese apropiado también por incorporación dentro de la tierra), antes del brote o después del brote. Ejemplos de representantes individuales de las malezas monocotiledóneas y dicotiledóneas que se pueden reprimir con un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionada entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, se mencionan seguidamente, sin que esta mención esté pensada como una limitación a ciertas especies solamente:

Plantas dañinas monocotiledóneas de los géneros: *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*, *Avena*, *Brachiaria*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Commelina*, *Cynodon*, *Cyperus*, *Dactyloctenium*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleocharis*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Festuca*, *Fimbristylis*, *Heteranthera*, *Imperata*, *Ischaemum*, *Leptochloa*, *Lolium*, *Monochoria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Rottboellia*, *Sagittaria*, *Scirpus*, *Setaria*, *Sorgo*.

Malezas dicotiledóneas de los géneros: *Abutilon*, *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Anoda*, *Anthemis*, *Aphanes*, *Artemisia*, *Atriplex*, *Bellis*, *Bidens*, *Capsella*, *Carduus*, *Cassia*, *Centaurea*, *Chenopodium*, *Cirsium*, *Convolvulus*, *Datura*, *Desmodium*, *Emex*, *Erysimum*, *Euphorbia*, *Galeopsis*, *Galinsoga*, *Galium*, *Hibiscus*, *Ipomoea*, *Kochia*, *Lamium*, *Lepidium*, *Lindernia*, *Matricaria*, *Mentha*, *Mercurialis*, *Mullugo*, *Myosotis*, *Papaver*, *Pharbitis*, *Plantago*, *Polygonum*, *Portulaca*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Rotala*, *Rumex*, *Salsola*, *Senecio*, *Sesbania*, *Sida*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sonchus*, *Sphenoclea*, *Stellaria*, *Taraxacum*, *Thlaspi*, *Trifolium*, *Urtica*, *Veronica*, *Viola*, *Xanthium*.

En plantas cultivadas transgénicas de acuerdo con la invención, que comprenden una proteína HPPD, un ADN o un gen quimérico de acuerdo con la invención y que también pueden mostrar una o más adicionales resistencias a herbicidas contra herbicidas que difieren de los herbicidas inhibidores de las HPPD, se prefiere el uso de un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, en plantas cultivadas transgénicas económicamente importantes de plantas útiles y ornamentales, por ejemplo de cereales tales como trigo, cebada, centeno, avena, sorgo y mijo, arroz y maíz o bien plantas cultivadas de remolacha azucarera, algodón, especies de soja, colza de semilla oleaginosa, patata, tomate, guisantes y otras hortalizas.

En lo que se refiere a unas propiedades de las plantas, distintas de la tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD tal como se describen en la presente invención, unas vías convencionales para la producción de nuevas plantas, que en comparación con las plantas existentes presentan propiedades modificadas, consisten por ejemplo en procedimientos tradicionales de cultivación y procreación y en la generación de mutantes. Alternativamente, se pueden generar nuevas plantas con propiedades modificadas con la ayuda de procedimientos recombinantes (véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0221044 A1 y EP-A-0131624 A1). Se han descrito, por ejemplo, en varios casos las siguientes:

- modificaciones recombinantes de plantas cultivadas, para las finalidades de modificar el almidón sintetizado en las plantas (por ejemplo, los documentos WO 92/11376, WO 92/14827 y WO 91/19806),
- plantas cultivadas transgénicas, que son resistentes a ciertos herbicidas del tipo de glufosinato (compárense, por ejemplo los documentos EP-A-0242236, EP-A-0242246) o del tipo de glifosato (documento WO 92/00377) o del tipo de las sulfonil-ureas (documentos EP-A-0257993 y US-A-5013659),

- plantas cultivadas transgénicas, por ejemplo de maíz, algodón o especies de soja, que son capaces de producir toxinas de *Bacillus thuringiensis* (toxinas de Bt), o híbridos o mutantes de las mismas, que hacen a las plantas resistentes contra determinadas plagas (documento EP-A-0193259),
- 5 - plantas cultivadas transgénicas con una composición modificada de ácidos grasos (documento WO 91/13972),
- plantas cultivadas modificadas genéticamente con nuevas sustancias constitutivas o metabolitos secundarios, por ejemplo nuevas fitoalexinas, que establecen una resistencia aumentada contra las enfermedades (documentos EPA 309862, EPA 0464461),
- 10 - plantas modificadas genéticamente con una fotorrespiración reducida, que presentan más altos rendimientos de cosechas y una más alta tolerancia frente al estrés, (documento EPA 0305398),
- plantas cultivadas transgénicas, que producen proteínas importantes farmacéutica o diagnósticamente (en inglés "molecular pharming" = farmacología molecular),
- plantas cultivadas transgénicas, que se distinguen por más altos rendimientos de cosechas o por una mejor calidad,
- 15 - plantas cultivadas transgénicas, que se distinguen por una combinación de nuevas propiedades tal como una combinación de las nuevas propiedades arriba mencionadas (en inglés "gene stacking" = amontonamiento de genes).

Un gran número de técnicas de biología molecular, por medio de las cuales se pueden generar nuevas plantas transgénicas con propiedades modificadas, son conocidas en principio; véanse por ejemplo las citas de I. Potrykus y G. Spangenberg (coordinadores de edición) *Gene Transfer to Plants*, Springer Lab Manual [Transferencia de genes a plantas. Manual de laboratorio de Springer] (1995), editorial Springer Berlín, Heidelberg, o de Christou, "Trends in Plant Science" [Tendencias en la ciencia de plantas] 1 (1996) 423-431.

Para llevar a cabo tales manipulaciones recombinantes, es posible introducir en plásmidos unas moléculas de ácidos nucleicos, que permitan una mutagénesis o una modificación de las secuencias por recombinación de secuencias de ADN. Con la ayuda de procedimientos clásicos, se pueden llevar a cabo por ejemplo sustituciones de bases, se pueden eliminar secuencias parciales o se pueden añadir secuencias naturales o sintéticas. Para la unión de los fragmentos de ADN unos con otros, es posible adosar adaptadores o engarzadores a los fragmentos; véanse, por ejemplo, las citas de Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [Clonación molecular, un manual de laboratorio], 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; o de Winnacker "Gene und Klone" [Genes y clones], VCH Weinheim 2ª edición de 1996.

La generación de células de plantas con una actividad disminuida de un producto génico se puede conseguir por ejemplo mediante la expresión de por lo menos un correspondiente ARN antisentido, de un ARN del mismo sentido para conseguir un efecto de supresión conjunta, o de una combinación de ARN tanto de antisentido como del mismo sentido que forma una molécula de ARN silenciosa de doble hebra (ARNi), o mediante la expresión de por lo menos una ribozima correspondientemente construida, que disocia específicamente a transcritos del producto génico antes mencionado. Para hacer esto, es posible en primer lugar usar unas moléculas de ADN, que comprenden la totalidad de la secuencia codificante de un producto génico, inclusive cualesquiera secuencias flanqueadoras que puedan estar presentes, o también moléculas de ADN, que comprenden solamente partes de la secuencia codificante, siendo necesario que estas partes sean lo suficientemente largas como para establecer en las células un efecto antisentido. Es posible también usar unas secuencias de ADN que tienen un alto grado de homología con respecto a las secuencias codificantes de un producto génico, pero que no son totalmente idénticas.

Cuando se expresan moléculas de ácidos nucleicos en plantas, la proteína obtenida puede estar localizada en cualquier compartimiento de la célula vegetal. Sin embargo, con el fin de conseguir la localización en un compartimiento particular, es posible, por ejemplo, engarzar la región codificante con unas secuencias de ADN, que garantizan la localización en un compartimiento específico. Tales secuencias son conocidas para un experto en la especialidad (véanse, por ejemplo, las citas de Braun y col., *EMBO J.* 11 (1992), 3219-3227; de Wolter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 846-850; y de Sonnewald y col., *Plant J.* 1 (1991) 95-106). Sin embargo, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser expresadas también en los orgánulos de las células de plantas.

Las células de plantas transgénicas se pueden regenerar de acuerdo con técnicas conocidas para dar plantas intactas. En principio, las plantas transgénicas pueden ser plantas de cualquier especie de plantas, incluyendo plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

Así, se pueden obtener unas plantas transgénicas que - además del gen quimérico de HPPD de la invención - tienen propiedades modificadas como el resultado de una sobreexpresión, supresión o inhibición de genes o secuencias de genes homólogos/as (= naturales) o de una expresión de genes o secuencias de genes heterólogos/as (= ajenos).

En las plantas, células de plantas o semillas de la invención, se prefiere emplear el herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona en plantas cultivadas transgénicas que son también resistentes a agentes reguladores del crecimiento tales como, por ejemplo, dicamba, o contra herbicidas que inhiben a esenciales enzimas vegetales, por ejemplo acetolactato sintasas (ALS), EPSP sintasas, glutamina

sintasas (GS) o hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), o contra herbicidas tomados del conjunto que consiste en las sulfonilureas, glifosato, glufosinato o benzoilisoxazoles y sustancias activas análogas.

La invención por lo tanto también se refiere al uso de herbicidas aplicados a estas plantas tolerantes a las HPPD de acuerdo con la invención para reprimir plantas dañinas (es decir malezas) que también se extiende a plantas cultivadas transgénicas que comprenden una segunda o más resistencia(s) a herbicidas además de la resistencia contra herbicidas inhibidores de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, de la clase de los isoxazoles tales como isoxaflutol o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionados entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona.

10 Los herbicidas inhibidores de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionados entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona, se pueden emplear en las formulaciones habituales en la forma de polvos humectables, concentrados emulsionables, soluciones atomizables, polvos para espolvorear o granulados.

15 Los herbicidas inhibidores de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionados entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona. Ejemplos de posibles formulaciones son polvos humectables (WP), polvos solubles en agua (SP), concentrados solubles en agua, concentrados emulsionables (EC), emulsiones (EW), tales como emulsiones de los tipos de aceite en agua y de agua en aceite, soluciones atomizables, concentrados para suspensión (SC), dispersiones basadas en aceites o agua, soluciones miscibles con aceites, suspensiones para encapsular (CS), polvos para espolvorear (DP), productos desinfectantes de semillas, granulados para la aplicación por esparcimiento y sobre el suelo, granulados (GR) en forma de microgranulados, de granulados formados por atomización, granulados revestidos y granulados formados por adsorción, granulados dispersables en agua (WG), granulados solubles en agua (SG), formulaciones ULV (de volumen ultra-bajo), microcápsulas y ceras.

Estos tipos individuales de formulaciones son conocidos en principio y se describen, por ejemplo, en las obras de: Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" (Tecnología química), tomo 7, editorial C. Hanser, Múnich, 4ª edición de 1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations" (Formulaciones de plaguicidas), Marcel Dekker, N.Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying Handbook" (Manual del secado por atomización), 3ª edición de 1979, G. Goodwin Ltd, Londres.

Los agentes auxiliares requeridos para las formulaciones, tales como materiales inertes, agentes tensioactivos, disolventes y otros materiales aditivos, son asimismo conocidos y se describen, por ejemplo, en las obras de: Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers" (Manual de diluyentes y vehículos para polvos finos insecticidas), 2ª edición, Darland Books, Caldwell N.J.; H.v. Olphen "Introduction to Clay Colloid Chemistry" (Introducción a la química de los coloides de arcillas), 2ª edición, J. Wiley & Sons, N.Y.; C. Marsden, "Solvents Guide" (Guía de disolventes), 2ª edición, Interscience, N.Y. 1963; "Detergents and Emulsifiers Annual" (Anual de detergentes y emulsionantes) de McCutcheon, MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley y Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents" (Enciclopedia de agentes tensioactivos), Chem. Publ. Co. Inc., N.Y. 1964; Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte" (Aductos con óxido de etileno interfacialmente activos), Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" (Tecnología química), tomo 7, editorial C. Hanser Munich, 4ª edición de 1986.

Basándose en estas formulaciones, es posible también preparar combinaciones con otras sustancias activas como plaguicidas, tales como, por ejemplo insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, y con antidotos, agentes fertilizantes y/o reguladores del crecimiento, por ejemplo, en forma de una formulación acabada (en inglés *ready mix*) o tal como una mezcla en depósito (en inglés *tank mix*).

Los polvos humectables son preparaciones dispersables uniformemente en agua y que, junto a la sustancia activa, comprenden también agentes tensioactivos de tipos iónicos y/o no iónicos (agentes humectantes, agentes dispersantes), por ejemplo alquil-fenoles poli(oxietilados), alcoholes grasos poli(oxietilados), aminas grasas poli(oxietiladas), (alcohol graso)-poliglicol-éter-sulfatos, alcano-sulfonatos, alquil-benceno-sulfonatos, un lignosulfonato de sodio, un 2,2'-dinaftilmetano-6,6'-disulfonato de sodio, un dibutilnaftaleno-sulfonato de sodio o también un oleoil-metil-taurato de sodio, junto a una sustancia diluyente o inerte. Para preparar los polvos humectables, las sustancias activas como herbicidas se muelen finamente, por ejemplo en equipos usuales tales como molinos de martillos, molinos de soplate y molinos de chorros de aire y, simultáneamente o a continuación, se mezclan con los agentes auxiliares para formulaciones.

55 Los concentrados emulsionables se preparan por disolución de la sustancia activa en un disolvente orgánico, por ejemplo butanol, ciclohexanona, dimetil-formamida, xileno o también compuestos aromáticos o hidrocarburos de punto de ebullición más alto o mezclas de los disolventes orgánicos, con adición de uno o varios agentes tensioactivos de tipos iónicos y/o no iónicos (agentes emulsionantes). Ejemplos de agentes emulsionantes que se pueden usar son: alquil-aril-sulfonatos de calcio tales como dodecil-benceno-sulfonato de Ca, o emulsionantes no

iónicos, tales como ésteres de poliglicoles con ácidos grasos, alquil-aril-poliglicol éteres, (alcohol graso) poliglicol éteres, condensados de óxido de propileno y óxido de etileno, alquil poliéteres, ésteres de sorbitán tales como, por ejemplo, ésteres con ácidos grasos de sorbitán, o poli(oxietilen)-ésteres de sorbitán, tales como, por ejemplo, poli(oxietilen)-ésteres con ácidos grasos de sorbitán.

- 5 Los polvos para espolvorear se obtienen mediante molienda de la sustancia activa con materiales sólidos finamente divididos, por ejemplo, talco, arcillas naturales tales como caolín, bentonita y pirofilita, o tierra de diatomeas.

Los concentrados para suspensión pueden estar basados en agua o en aceites. Ellos se pueden preparar por ejemplo por molienda en húmedo mediante molinos de perlas disponibles comercialmente, si fuese apropiado con adición de agentes tensioactivos, tal como ya se han enumerado por ejemplo, más arriba en los casos de los otros tipos de formulaciones.

10 Las emulsiones, por ejemplo las emulsiones del tipo de aceite en agua (EW), se pueden preparar por ejemplo mediante agitadores, molinos de coloides y/o mezcladores estáticos mediando uso de disolventes orgánicos acuosos y si fuese apropiado, de agentes tensioactivos, tal como ellos se han mencionado ya por ejemplo, más arriba para los otros tipos de formulaciones.

15 Los granulados se pueden preparar o bien por pulverización de la sustancia activa sobre un material inerte granulado, capaz de adsorción, o por aplicación de concentrados de sustancias activas sobre la superficie de materiales de soporte, tales como arena, caolinitas, o un material inerte granulado con la ayuda de agentes adhesivos, por ejemplo un poli(alcohol vinilo), un poli(acrilato de sodio) o también aceites minerales. También se pueden granular sustancias activas apropiadas del modo que es usual para la producción de gránulos de agentes fertilizantes, si se desea en mezcla con agentes fertilizantes.

20 Los granulados dispersables en agua se preparan por regla general por procedimientos usuales, tales como desecación por atomización, granulación en lecho fluidizado, granulación en bandejas, mezcladura con agitadores de alta velocidad y extrusión sin ningún material inerte sólido.

25 Para preparar granulados en bandejas, granulados en lecho fluidizado, granulados en extrusor y granulados por atomización, véanse, por ejemplo, los procedimientos expuestos en las obras "Spray-Drying Handbook" (Manual del secado por atomización), 3ª edición de 1979, G. Goodwin Ltd., Londres; J.E. Browning, "Agglomeration" (Aglomeración), Chemical and Engineering 1967, páginas 147 y siguientes; "Perry's Chemical Engineer's Handbook" (Manual del ingeniero químico de Perry), 5ª edición, McGraw-Hill, Nueva York 1973, páginas 8-57,

30 Para más detalles acerca de la formulación de agentes para la protección de plantas cultivadas, véanse, por ejemplo, las obras de G.C. Klingman, "Weed Control as a Science" (Represión de malas hierbas como ciencia), John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1961, páginas 81-96 y de J.D. Freyer, S.A. Evans, "Weed Control Handbook" (Manual de la represión de malas hierbas), 5ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968, páginas 101-103.

35 Por regla general, las formulaciones agroquímicas comprenden de 0,1 a 99 % en peso, en particular de 0,1 a 95 % en peso, de compuestos conformes a la invención. En polvos humectables, la concentración de una sustancia activa es por ejemplo, de aproximadamente 10 a 90 % en peso, el resto hasta 100 % en peso se compone de los usuales constituyentes de formulaciones. En el caso de los concentrados emulsionables, la concentración de una sustancia activa puede ser de aproximadamente 1 a 90, de modo preferido de 5 a 80 % en peso. Las formulaciones en forma de polvos para espolvorear contienen de 1 a 30 % en peso de una sustancia activa, de modo preferido en la mayor parte de los casos de 5 a 20 % en peso de una sustancia activa, y las soluciones atomizables comprenden de aproximadamente 0,05 a 80, de modo preferido de 2 a 50 % en peso de una sustancia activa. En el caso de granulados dispersables en agua, el contenido de una sustancia activa depende en parte de si el compuesto activo se presenta en forma líquida o sólida, y de cuáles sean los agentes auxiliares de granulación, materiales de carga y relleno y similares, que se usen. En el caso de los granulados dispersables en agua, por ejemplo, el contenido de una sustancia activa está situado entre 1 y 95 % en peso, de modo preferido entre 10 y 80 % en peso.

45 Por añadidura, las mencionadas formulaciones de sustancias activas comprenden, si fuese apropiado, los agentes auxiliares que son convencionales en cada caso, tales como agentes adhesivos, humectantes, dispersantes, emulsionantes, penetrantes, conservantes, protectores frente a las heladas y disolventes, materiales de carga y relleno, materiales de soporte y colorantes, antiespumantes, inhibidores de la evaporación y agentes que influyen sobre el valor del pH y sobre la viscosidad.

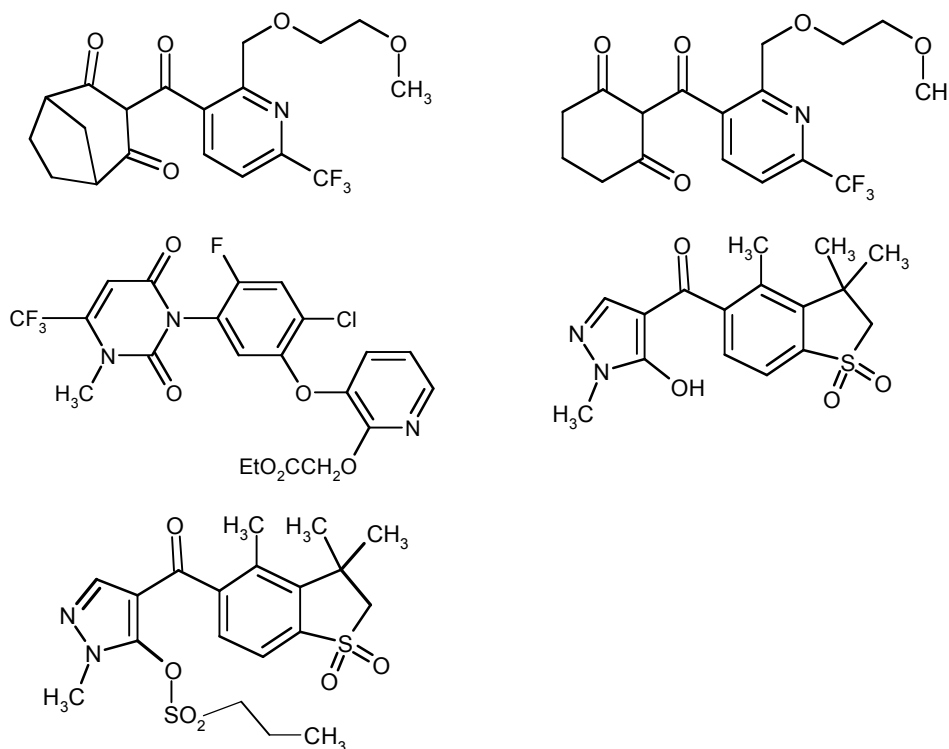
55 Basándose en estas formulaciones, es también posible preparar combinaciones de un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefultriona y mesotriona, más particularmente tembotriona con otras sustancias activas como plaguicidas, tales como, por ejemplo, insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, y con antidotos, agentes fertilizantes y/o reguladores del crecimiento, por ejemplo en forma de una formulación acabada (en inglés ready mix) o tal como una mezcla en depósito (en inglés tank mix), que se ha de aplicar a las plantas tolerantes a las HPPD de acuerdo con la invención.



Sustancias activas que pueden ser aplicadas a plantas tolerantes a las HPPD de acuerdo con la presente invención en combinación con un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona en formulaciones mixtas o en una mezcla en depósito, son, por ejemplo, sustancias activas conocidas, que se basan en la inhibición de, por ejemplo, acetolactato sintasa, acetil-CoA carboxilasa, celulosa sintasa, enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, glutamina sintetasa, p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, fitoeno desaturasa, fotosistema I, fotosistema II, protoporfirinógeno oxidasa, tal como se describen por ejemplo, en Weed Research 26 (1986) 441-445, o en el manual "The Pesticide Manual" [El manual de los plaguicidas], 14ª edición, The British Crop Protection Council and the Royal Soc. of Chemistry, 2003 y la bibliografía allí citada. Conocidos agentes herbicidas o reguladores del crecimiento de las plantas, que se pueden combinar con los compuestos conformes a la invención, son, por ejemplo, las siguientes sustancias activas (los compuestos son designados o bien por el nombre común (en inglés "common name") de acuerdo con la International Organization for Standardization (ISO) (= Organización Internacional para Normalización) o por el nombre químico, si fuese apropiado junto con el número de código) y comprenden siempre todas las formas de uso, tales como ácidos, sales, ésteres e isómeros tales como estereoisómeros e isómeros ópticos. En este contexto se mencionan a modo de ejemplo una forma de uso y en parte también varias formas de uso:

acetocloro; acibenzolar, acibenbenzolar-S-metilo, acifluorfenó, acifluorfenó-sodio, aclonifenó, alacloro, alidocloro, aloxidim, aloxidim-sodio, ametrina, amicarbazona, amidocloro, amidosulfurón, aminociclopiraclo, aminopiraldida, amitrol, sulfamato de amonio, ancimidol, anilofos, asulam, atrazina, azafenidina, azimsulfurón, aziprotrina, BAH-043, BAS-140H, BAS-693H, BAS-714H, BAS-762H, BAS-776H, BAS-800H, beflubutamida, benazolina, benazolina-etilo, bencarbazona, benfluralina, benfuresato, bensulida, bensulfurón-metilo, bentazona, benzofendizona, benzobiciclona, benzofenap, benzofluoro, benzoilprop, bifenox, bilanafos, bilanafos-sodio, bispiribac, bispiribac-sodio, bromacilo, bromobutida, bromofenoxima, bromoxinilo, bromurón, buminafos, busoxinona, butacloro, butafenacilo, butamifos, butenacloro, butralina, butroxidim, butilato, cafenstrol, carbetamida, carfentrazona, carfentrazona-etilo, clometoxifeno, cloramben, clorazifop, clorazifop-butilo, clorobromurón, clorobufam, clorfenac, clorfenac-sodio, clorfenprop, cloroflurenol, cloroflurenol-metilo, cloridazona, clorimurón, clorimurón-etilo, cloromequat-cloruro, cloronitrofenó, cloroftalim, clortal-dimetilo, clorotolurón, clorosulfurón, cinidon, cinidon-etilo, cinmetilina, cinosulfurón, cletodim, clodinafop, clodinafop-propargilo, clofencet, clomazona, clomeprop, cloprop, clopiraldida, cloransulam, cloransulam-metilo, cumilurón, cianamida, cianazina, ciclanilida, cicloato, ciclosulfamurón, cicloxidim, ciclurón, cihalofop, cihalofop-butilo, ciperquat, ciprazina, ciprazol, 2,4-D, 2,4-DB, daimurón/dimron, dalapon, daminozida, dazomet, n-decanol, desmedifam, desmetrina, detosil-pirazolato (DTP), di-alato, dicamba, diclobenilo, diclorprop, diclorprop-P, diclofop, diclofop-metilo, diclofop-P-metilo, diclosulam, dietatilo, dietatilo-etilo, difenoxurón, difenzoquat, diflufenican, diflufenzopir, diflufenzopir-sodio, dimefurón, dikegulac-sodio, dimefurón, dimepiperato, dimetacloro, dimetametrina, dimetenamida, dimetenamida-P, dimetipina, dimetrasulfurón, dinitramina, dinoseb, dinoterb, difenamida, dipropetrina, diquat, diquat-dibromuro, ditiopir, diurón, DNOC, eglinazina-etilo, endotal, EPTC, esprocarb, etalfuralina, etamsulfurón-metilo, etefon, etidimurón, etiozina, etofumesato, etoxifeno, etoxifeno-etilo, etoxisulfurón, etobenzanida, F-5331, es decir N-[2-cloro-4-fluoro-5-[4-(3-fluoro-propil)-4,5-dihidro-5-oxo-1H-tetrazol-1-il]-fenil]-etano-sulfonamida, fenoprop, fenoxaprop, fenoxaprop-P, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo, fentrazamida, fenurón, flamprop, flamprop-M-isopropilo, flamprop-M-metilo, flazasulfurón, florasulam, fluzifop, fluzifop-P, fluzifop-butilo, fluzifop-P-butilo, fluzolato, flucarbazona, flucarbazona-sodio, flucetosulfurón, flucloalinala, flufenacet (tiafluamida), flufenpir, flufenpir-etilo, flumetralina, flumetsulam, flumiclorac, flumiclorac-pentilo, flumioxazina, flumipropina, fluometurón, fluorodifeno, fluoroglicofeno, fluoroglicofeno-etilo, flupoxam, flupropacilo, flupropanato, flupirsulfurón, flupirsulfurón-metil-sodio, flurenol, flurenol-butilo, fluridona, flurocloridona, fluroxipir, fluroxipir-meptilo, flurprimidol, flurtamona, flutiacet, flutiacet-metilo, flutiamida, fomesafeno, foramsulfurón, forclorofenurón, fosamina, furiloxifeno, ácido giberélico, glufosinato, L-glufosinato, L-glufosinato-amonio, glufosinato-amonio, glifosato, glifosato-isopropilamonio, H-9201, halosafeno, halosulfurón, halosulfurón-metilo, haloxifop, haloxifop-P, haloxifop-etoxietilo, haloxifop-P-etoxietilo, haloxifop-metilo, haloxifop-P-metilo, hexazinona, HNPC-9908, HOK-201, HW-02, imazametabenz, imazametabenz-metilo, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquina, imazetapir, imazosulfurón, inabenfida, indanofan, ácido indol-acético (IAA), ácido 4-indol-3-il-butírico (IBA), yodosulfurón, yodosulfurón-metil-sodio, ioxinilo, isocarbamida, isopropalina, Isoproturón, isourón, isoxabeno, isoxaclortol, isoxaflutol, isoxapirifop, KUH-043, KUH-071, karbutilato, ketospiradox, lactofeno, lenacilo, linurón, hidrazida de ácido maleico, MCPA, MCPB, MCPB-metilo, -etilo y -sodio, mecoprop, mecoprop-sodio, mecoprop-butilo, mecoprop-P-butilo, mecoprop-P-dimetilamonio, mecoprop-P-2-etil-hexilo, mecoprop-P-potasio, mefenacet, mefluidida, mepiquat-cloruro, mesosulfurón, mesosulfurón-metilo, metabenzotiazurón, metam, metamifop, metamitron, metazacloro, metazol, metoxifenona, metildimron, 1-metil-ciclopropeno, isotiocianato de metilo, metobenzurón, metobenzurón, metobromurón, metolacloro, S-metolacloro, metosulam, metoxurón, metribuzina, metsulfurón, metsulfurón-metilo, molinato, monalida, monocarbamida, monocarbamida dihidrógeno sulfato, monolinurón, monosulfurón, monurón, MT 128, MT-5950, es decir N-[3-cloro-4-(1-metil-etil)-fenil]-2-metil-pentanamida, NGGC-011, naproanilida, napropamida, naptalam, NC-310, es decir 4-(2,4-dicloro-benzoil)-1-metil-5-benciloxi-pirazol, neburón, nicosulfurón, nipiraclofeno, nitralina, nitrofenó, nitrofenolato-sodio (mezcla de isómeros), nitrofluorfenó, ácido nonanoico, norflurazona, orbencarb, ortosulfamurón, orizalina, oxadiargilo, oxadiazona, oxasulfurón, oxaziclomefona, oxifluorfenó, paclobutrazol, paraquat, paraquat dicloruro, ácido pelargónico (ácido nonanoico), pendimetalina, pendralina, penoxsulam,

pentanocloro, pentoxazona, perfluidona, petoxamida, fenisofam, fenmedifam, fenmedifam-etilo, picloram,  
 picolinafeno, pinoxaden, piperofos, pirifenop, pirifenop-butilo, pretilacloro, primisulfurón, primisulfurón-metilo,  
 probenazol, profluzazol, prociagina, prodiamina, prifluralina, profoxidim, prohexadiona, prohexadiona-calcio,  
 5 prohidrojasmona, prometón, prometrina, propacloro, propanilo, propaquizafop, propazina, profam, propisocloro,  
 propoxicarbazona, propoxicarbazona-sodio, propizamida, prosulfalina, prosulfocarb, prosulfurón, prinacloro,  
 piraclonilo, piraflufeno, piraflufeno-etilo, pirasulfotol, pirazolinato (pirazolato), pirazosulfurón-etilo, pirazoxifeno,  
 piribambenz, piribambenz-isopropilo, piribenzoxima, piributicarb, piridafol, piridato, piriftalida, piriminobac,  
 piriminobac-metilo, pirimisulfano, piritiobac, piritiobac-sodio, piroxasulfona, piroxsulam, quinclorac, quinmerac,  
 10 quinoclamina, quizalofop, quizalofop-etilo, quizalofop-P, quizalofop-P-etilo, quizalofop-P-tefurilo, rimsulfurón,  
 saflufenacilo, secbumetona, setoxidim, sidurón, simazina, simetrina, SN-106279, sulcotriona, sulfalato (CDEC),  
 sulfentrazona, sulfometurón, sulfometurón-metilo, sulfosato (glifosato-trimesio), sulfosulfurón, SYN-523, SYP-  
 249, SYP-298, SYP-300, tebutam, tebutiurón, tecnazeno, tepraloxidim, terbacilo, terbucarb, terbucloro,  
 terbumetona, terbutilazina, terbutrina, TH-547, tenilcloro, tiafluamida, tiazaflurón, tiazopir, tidiazimina, tidiazurón,  
 15 tiencarbazona, tiencarbazona-metilo, tifensulfurón, tifensulfurón-metilo, tiobencarb, tiocarbazilo, ralkoxidim, tri-  
 alato, triasulfurón, triaziflam, triazofenamida, tribenurón, tribenurón-metilo, ácido tricloroacético (TCA), triclopir,  
 tridifano, trietazina, trifloxisulfurón, trifloxisulfurón-sodio, trifluralina, triflusulfurón, triflusulfurón-metilo, trimeturón,  
 trinexapac, trinexapac-etilo, tritosulfurón, tsitodef, uniconazol, uniconazol-P, vernolato, ZJ-0166, ZJ-0270, ZJ-  
 0543, ZJ-0862 así como los siguientes compuestos



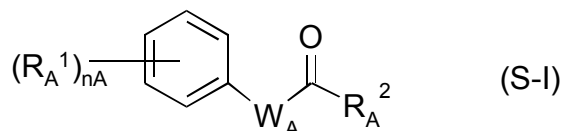
20 La tasa de aplicación requerida del herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como  
 tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona,  
 particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona,  
 25 más particularmente tembotriona, que se ha de aplicar a unas zonas en las que están creciendo plantas tolerantes a  
 las HPPD de acuerdo con la presente invención, varía en función de condiciones externas tales como la  
 temperatura, la humedad, la naturaleza del herbicida usado y otras similares. Ella puede variar, por ejemplo, entre  
 0,001 y 1,0 y más kg/ha de sustancia activa, pero está situada de manera preferible entre 0,005 y 750 g/ha.

30 En el caso de aplicaciones combinadas de herbicidas inhibidores de las HPPD con unos herbicidas, que difieren de  
 los herbicidas inhibidores de las HPPD, a las plantas tolerantes a las HPPD de acuerdo con la presente invención,  
 estas mezclas pueden causar lesiones en las plantas cultivadas, basándose en la presencia de los herbicidas no  
 inhibidores de las HPPD. Con el fin de reducir/eliminar dichas lesiones en las plantas cultivadas, se pueden añadir  
 apropiados antidotos. Estos antidotos, que se emplean en cantidades activas como antidotos, reducen los efectos  
 colaterales de los herbicidas/plaguicidas usados, por ejemplo en plantas cultivadas económicamente importantes,  
 tales como las de cereales (trigo, cebada, centeno, maíz, arroz, mijo), alfalfa, remolacha azucarera, caña de azúcar,

colza de semilla oleaginosa, algodón y especies de soja, de manera preferible las de maíz, algodón, remolacha azucarera, o especies de soja.

Los antidotos se seleccionan de manera preferible entre el conjunto que consiste en:

A) compuestos de la fórmula (S-I)

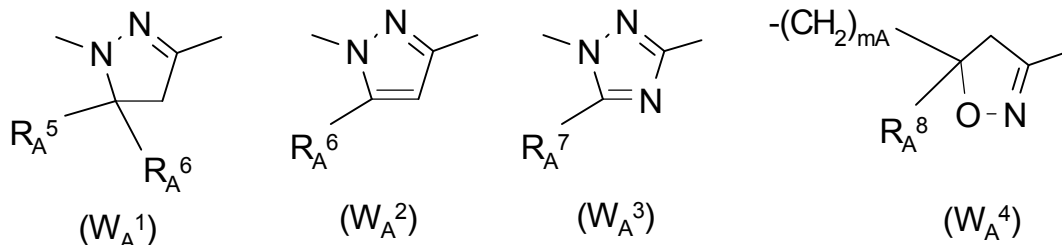


en la que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

$n_A$  es un número natural de 0 a 5, preferentemente de 0 a 3;

$R_A^1$  es halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), nitro o haloalquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);

10  $W_A$  es un radical heterocíclico divalente sin sustituir o sustituido, tomado entre el conjunto que consiste en los heterociclos con anillos de cinco miembros, parcialmente insaturados o aromáticos con 1 a 3 heteroátomos de anillo del tipo de N o O, estando presente en el anillo por lo menos un átomo de nitrógeno y a lo sumo un átomo de oxígeno, preferentemente un radical tomado entre el conjunto que consiste en ( $W_A^1$ ) hasta ( $W_A^4$ ),



15  $m_A$  es 0 o 1;

15  $R_A^2$  es  $OR_A^3$ ,  $SR_A^3$  o  $NR_A^3RA^4$  o un heterociclo de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno y hasta 3 heteroátomos, preferentemente tomados entre el conjunto que consiste en O y S, que está unido a través del átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo en (S-I), y que está sin sustituir o sustituido con radicales tomados entre el conjunto que consiste en alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y fenilo eventualmente sustituido, preferentemente un radical de las fórmulas  $OR_A^3$ ,  $NHR_A^3$  o  $N(CH_3)_2$ , en particular de la fórmula  $OR_A^3$ ;

20  $R_A^3$  es hidrógeno o un radical hidrocarbilo alifático sin sustituir o sustituido, que tiene preferentemente un total de 1 a 18 átomos de C;

25  $R_A^4$  es halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo sin sustituir o sustituido;

25  $R_A^5$  es H, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), ciano o  $COOR_A^9$ , en que  $R_A^9$  es hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), hidroxi-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>) o tri-alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-sililo;

$R_A^6$ ,  $R_A^7$ ,  $R_A^8$  son idénticos o diferentes, y son hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>), o fenilo sustituido o sin sustituir;

30 preferentemente:

a) compuestos del tipo del ácido dicloro-fenil-pirazolina-3-carboxílico, preferentemente compuestos tales como

35 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-(etoxicarbonil)-5-metil-2-pirazolina-3-carboxilato de etilo (S1-1), ("mefenpir-dietilo", véase el Manual de los Plaguicidas), y compuestos afines, tal como se describen en el documento WO 91/07874;

b) derivados del ácido dicloro-fenil-pirazol-carboxílico, preferentemente compuestos tales como

40 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-metil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-2),  
1-(2,4-dicloro-fenil)-5-isopropil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-3),  
1-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1,1-dimetil-etil)pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-4),  
1-(2,4-dicloro-fenil)-5-fenil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-5)

y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-333 131 y EP-A-269 806.

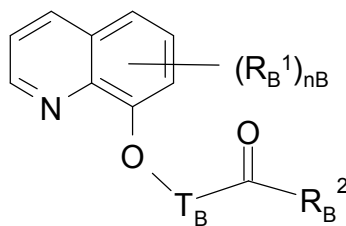
c) compuestos del tipo de los ácidos triazol-carboxílicos, de modo preferido compuestos tales como el fenclorazol(-éster etilo), es decir

45 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-triclorometil-(1H)-1,2,4-triazol-3-carboxilato de etilo (S1-6), y compuestos afines tal como se describen en los documentos EP-A-174 562 y EP-A-346 620;

d) compuestos del tipo de los ácidos 5-bencil- o 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílicos, o del ácido 5,5-difenil-2-

isoxazolina-3-carboxílico, preferentemente compuestos tales como 5-(2,4-dicloro-bencil)-2-isoxazolina-carboxilato de etilo (S1-7) o 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxilato de etilo (S1-8) y compuestos afines, tal como se describen en el documento WO 91/08202, o respectivamente 5,5-difenil-2-isoxazolina-carboxilato de etilo (S1-9) ("isoxadifeno-etilo") o 5,5-difenil-2-isoxazolina-carboxilato de n-propilo (S1-10) o 5-(4-fluoro-fenil)-5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxilato de etilo (S1-11), tal como se describen en la solicitud de patente documento WO-A-95/07897.

B) Derivados de quinolina de la fórmula (S-II)



(S-II)

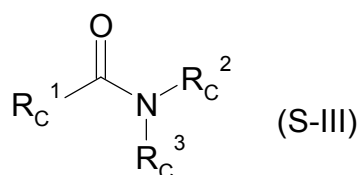
en la que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

- $R_B^1$  es halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), nitro o halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);  
 $n_B$  es un número natural de 0 a 5, preferentemente de 0 a 3;  
 $R_B^2$  es  $OR_B^3$ ,  $SR_B^3$  o  $NR_B^3R_B^4$   
 o un heterociclo de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno y hasta 3 heteroátomos, preferentemente tomados entre el conjunto que consiste en O y S, que está unido a través del átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo en (S-II), y que está sin sustituir o sustituido con radicales tomados entre el conjunto que consiste en alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o fenilo eventualmente sustituido, preferentemente un radical de las fórmulas  $OR_B^3$ ,  $NHR_B^4$  o  $N(CH_3)_2$ , en particular de la fórmula  $OR_B^3$ ;  
 $R_B^3$  es hidrógeno o un radical hidrocarbilo alifático sin sustituir o sustituido, que tiene preferentemente un total de 1 a 18 átomos de C;  
 $R_B^4$  es hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo sin sustituir o sustituido;  
 $T_B$  es una cadena de alcano de (C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub>)-diilo, que está sin sustituir o sustituida con uno o dos radicales de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o con [alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)]-carbonilo;

preferentemente:

- a) compuestos del tipo del ácido 8-quinolinoxi-acético (S2), de modo preferido (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de (1-metil-hexilo), (nombre común "cloquintocet-mexilo" (S2-1), (véase el Manual de los Plaguicidas),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 1,3-dimetilbut-1-ilo (S2-2),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 4-aliloxibutilo (S2-3),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 1-aliloxiprop-2-ilo (S2-4),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de etilo (S2-5),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de metilo (S2-6),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de alilo (S2-7),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 2-(2-propilideniminooxi)-1-etilo (S2-8),  
 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 2-oxo-propilo (S2-9)  
 y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-86 750, EP-A-94 349 y EP-A-191 736 o EP-A-0 492 366, y también sus hidratos y sales tal como se describen en el documento WO-A-2002/034048.  
 b) compuestos del tipo del ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)-malónico, de modo preferido compuestos tales como (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de dietilo, (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de dialilo, (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de metilo y etilo, y compuestos afines, tal como se describen en el documento EP-A-0 582 198.

C) Compuestos de la fórmula (S-III)



en la que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

$\text{R}_C^1$  es alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), halo-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ), halo-alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ), cicloalquilo de ( $\text{C}_3\text{-C}_7$ ), preferentemente diclorometilo;

$\text{R}_C^2$ ,  $\text{R}_C^3$  son idénticos o diferentes y son hidrógeno, alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ), alquino de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ), halo-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), halo-alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ), alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-carbamoil-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ )-carbamoil-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), dioxolanil-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), tiazolilo, furilo, furil-alquilo, tienilo, piperidilo, fenilo sustituido o sin sustituir, o  $\text{R}_C^2$  y  $\text{R}_C^3$  forman en común un anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir,

preferentemente un anillo de oxazolidina, tiazolidina, piperidina, morfolina, hexahidropirimidina o benzoxazina;

preferentemente:

compuestos activos del tipo de las dicloroacetamidas, que se usan frecuentemente como antidotos para antes del brote (antidotos activos en el suelo), tales como por ejemplo

"diclormida" (véase el Manual de los Plaguicidas)

(= N,N-dialil-2,2-dicloro-acetamida),

"R-29148" (= 3-dicloroacetil-2,2,5-trimetil-1,3-oxazolidona de Stauffer),

"R-28725" (= 3-dicloroacetil-2,2,5-dimetil-1,3-oxazolidona de Stauffer),

"benoxacor" (véase el Manual de los Plaguicidas)

(= 4-dicloroacetil-3,4-dihidro-3-metil-2H-1,4-benzoxazina).

"PPG-1292" (= N-alil-N[(1,3-dioxolan-2-il)-metil]dicloroacetamida de PPG Industries),

"DKA-24" (= N-alil-N[(alilaminocarbonil)-metil]dicloroacetamida de Sagro-Chem),

"AD-67" o "MON 4660" (= 3-dicloroacetil-1-oxa-3-aza-espiro[4,5]decano de Nitrokemia o respectivamente Monsanto),

"Ti-35" (= 1-dicloroacetil-azepano de TRI-Chemical RT)

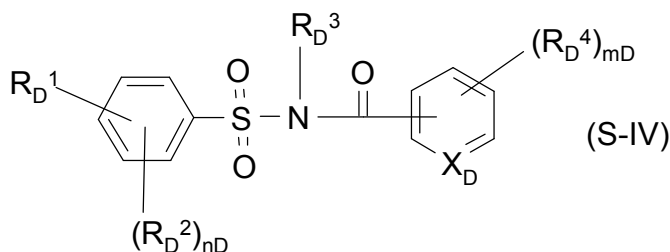
"diclonona" (diclonona) o "BAS145138" o "LAB145138"

(= 3-dicloroacetil-2,5,5-trimetil-1,3-diaza-biciclo[4.3.0]nonano de ASF) y

"furlazol" o "MON 13900" (véase el Manual de los Plaguicidas)

(= (RS)-3-dicloroacetil-5-(2-furil)-2,2-dimetil-oxazolidona)

D) N-Acilsulfonamidas de la fórmula (S-IV) y sus sales



en la que

$\text{X}_D$  es CH o N;

$\text{R}_D^1$  es  $\text{CO-NR}_D^5\text{R}_D^6$  o  $\text{NHCO-R}_D^7$ ;

$\text{R}_D^2$  es halógeno, halo-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), halo-alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), nitro, alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-sulfonilo, alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-carbonilo o alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-carbonilo;

$\text{R}_D^3$  es hidrógeno, alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), alqueno de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ ) o alquino de ( $\text{C}_2\text{-C}_4$ );

$\text{R}_D^4$  es halógeno, nitro, alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), halo-alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), halo-alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), cicloalquilo de ( $\text{C}_3\text{-C}_6$ ), fenilo, alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), ciano, alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-tio, alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-sulfino, alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-sulfonilo, alcoxi de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-carbonilo o alquil de ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )-carbonilo;

$\text{R}_D^5$  es hidrógeno, alquilo de ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), cicloalquilo de ( $\text{C}_3\text{-C}_6$ ), alqueno de

( $\text{C}_2\text{-C}_6$ ), alquino de ( $\text{C}_2\text{-C}_6$ ), cicloalqueno de ( $\text{C}_5\text{-C}_6$ ), fenilo o heterociclilo de 3 a 6 miembros que contiene  $v_D$  heteroátomos tomados entre el conjunto que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, realizándose que los siete

radicales mencionados en último término están sustituidos con  $v_D$  sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo-alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-sulfinilo, alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-sulfonilo, cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo y fenilo y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);

$R_D^6$  es hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno de (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) o alquino de (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), en que los tres radicales mencionados en último término están sustituidos con  $v_D$  radicales tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, hidroxilo, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-tio, o

$R_D^5$  y  $R_D^6$  forman en común con el átomo de nitrógeno que los lleva un anillo de pirrolidinilo o piperidinilo;

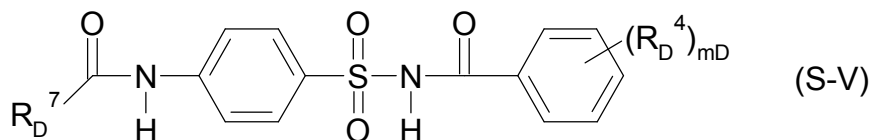
$R_D^7$  es hidrógeno, alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-amino, di-alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-amino, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con  $v_D$  sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno-alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-tio y en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);

$n_D$  es 0, 1 o 2;

$m_D$  es 1 o 2;

$v_D$  es 0, 1, 2 o 3;

de entre éstos se da la preferencia a los compuestos del tipo de las N-acil-sulfonamidas, por ejemplo de la fórmula (S-V) siguiente, que son conocidos, por ejemplo, a partir del documento WO 97/45016



en la que

$R_D^7$  significa alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con  $v_D$  sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno-alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-tio y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);

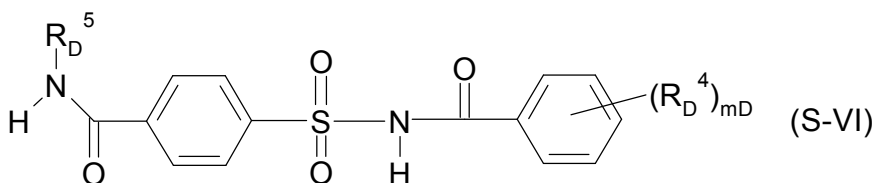
$R_D^4$  significa halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), CF<sub>3</sub>;

$m_D$  significa 1 o 2;

$v_D$  es 0, 1, 2 o 3;

y también

acilsulfamoilbenzamidias, por ejemplo, de la siguiente fórmula (S-VI), que son conocidas, por ejemplo, a partir del documento WO 99/16744,



por ejemplo aquellas en que

$R_D^5$  = ciclopropilo y ( $R_D^4$ ) = 2-OMe ("cipro-sulfamida", S3-1),

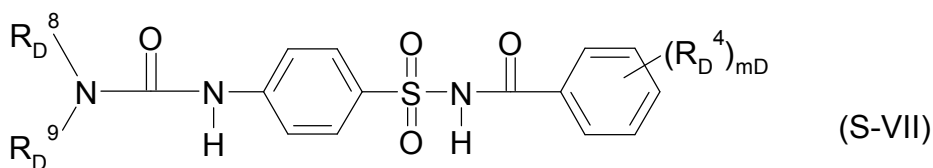
$R_D^5$  = ciclopropilo y ( $R_D^4$ ) = 5-Cl-2-OMe (S3-2),

$R_D^5$  = etilo y ( $R_D^4$ ) = 2-OMe (S3-3),

$R_D^5$  = isopropilo y ( $R_D^4$ ) = 5-Cl-2-OMe (S3-4) y

$R_D^5$  = isopropilo y ( $R_D^4$ ) = 2-OMe (S3-5);

y también compuestos del tipo de las N-acilsulfamoilfenilureas de la fórmula (S-VII), que son conocidos, por ejemplo, a partir del documento EP-A-365484



en la que

$R_D^8$  y  $R_D^9$  independientemente uno de otro son hidrógeno, alquilo de ( $C_1-C_8$ ), cicloalquilo de ( $C_3-C_8$ ), alqueno de ( $C_3-C_6$ ), alquino de ( $C_3-C_6$ ),  
 $R_D^4$  es halógeno, alquilo de ( $C_1-C_4$ ), alcoxi de ( $C_1-C_4$ ),  $CF_3$   
 $m_D$  es 1 o 2;

5 de ellos en particular

1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,  
 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,  
 1-[4-(N-4,5-dimetilbenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,  
 1-[4-(N-naftoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,

10 G) compuestos activos de la clase de los compuestos hidroxiaromáticos y de los derivados de ácidos carboxílicos aromático-alifáticos, por ejemplo

3,4,5-triacetoxi-benzoato de etilo, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido 4-hidroxi-salicílico, ácido 4-fluoro-salicílico, 1,2-dihidro-2-oxo-6-trifluorometil-piridina-3-carboxamida, ácido 2-hidroxi-cinámico, 2,4-dicloro-cinámico, tal como se describen en los documentos WO 2004084631, WO  
 15 2005015994, WO 2006007981 y WO 2005016001;

H) compuestos activos de la clase de las 1,2-dihidroquinoxalin-2-onas, por ejemplo 1-metil-3-(2-tienil)-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona, 1-metil-3-(2-tienil)-1,2-dihidroquinoxalin-2-tiona, hidrocloreto de 1-(2-aminoetil)-3-(2-tienil)-1,2-dihidro-quinoxalin-2-ona, 1-(2-metilsulfonilaminoetil)-3-(2-tienil)-1,2-dihidro-quinoxalin-2-ona, tal como se describen en el documento WO 2005112630,

20 I) compuestos activos que además de una acción herbicida contra plantas dañinas, tienen también una acción como antídoto sobre plantas cultivadas tales como arroz, tales como por ejemplo

"dimepiperato" o "MY-93" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= piperidina-1-tio-carboxilato de S-1-metil-1-fenil-etilo), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por el herbicida molinato,

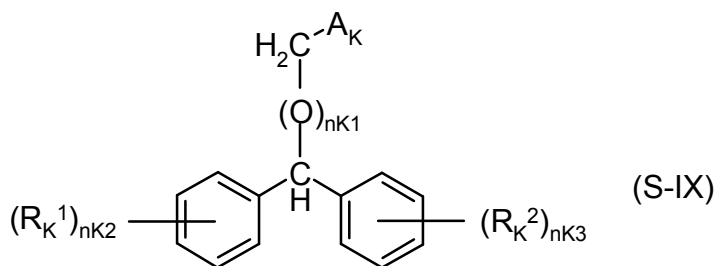
25 "daimurón" o "SK 23" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= 1-(1-metil-1-fenil-etil)-3-p-tolil-urea), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por el herbicida imazosulfurón,

"cumilurón" = "JC-940" (= 3-(2-clorofenilmetil)-1-(1-metil-1-fenil-etil)urea, véase el documento de solicitud de patente japonesa JP-A-60087254), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por algunos herbicidas,

30 "metoxifenona" o "NK 049" (= 3,3'-dimetil-4-metoxi-benzofenona), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por algunos herbicidas,

"CSB" (= 1-bromo-4-(clorometilsulfonil)benzeno) (CAS N° de Reg. 54091-06-4 de Kumiai), que es conocido como antídoto contra daños causados por algunos herbicidas en arroz,

K) compuestos de la fórmula (S-IX),  
 como se describen en el documento WO-A-1998/38856



35

en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

$R_K^1$ ,  $R_K^2$  independientemente uno de otro, son halógeno, alquilo de ( $C_1-C_4$ ), alcoxi de ( $C_1-C_4$ ), halo-alquilo de ( $C_1-C_4$ ), alquil de ( $C_1-C_4$ )-amino, di-alquil de ( $C_1-C_4$ )-amino, nitro;

$A_K$  es  $COOR_K^3$  o  $COOR_K^4$

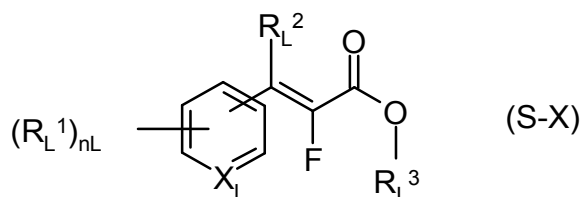
40  $R_K^3$ ,  $R_K^4$  independientemente uno de otro, son hidrógeno, alquilo de ( $C_1-C_4$ ), alqueno de ( $C_2-C_6$ ), alquino de ( $C_2-C_4$ ), cianoalquilo, halo-alquilo de ( $C_1-C_4$ ), fenilo, nitrofenilo, bencilo, halobencilo, piridinilalquilo o alquilamonio,

$n_K^1$  0 o 1

$n_K^2$ ,  $n_K^3$  independientemente uno de otro, son 0, 1 o 2

45 preferentemente: (difenilmetoxi)acetato de metilo (CAS N° de Reg.: 41858-19-9),

L) compuestos de la fórmula (S-X),  
 como se describen en el documento WO A-98/27049

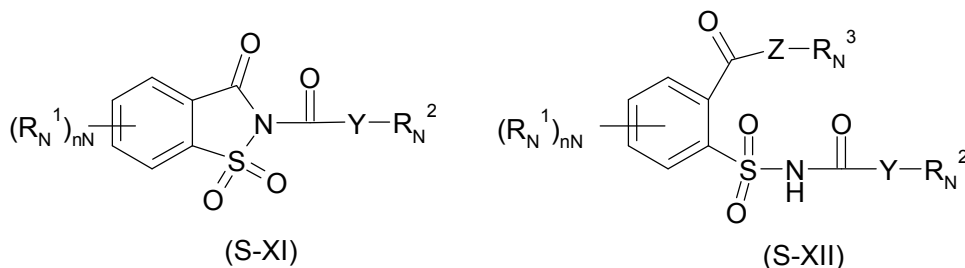


en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

- $X_L$  es CH o N,  
 $n_L$  para el caso de que sea  $X = N$ , es un número entero de 0 hasta 4 y  
 para el caso de que sea  $X = CH$ , es un número entero de 0 hasta 5,  
 $R_L^1$  es halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halo-alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halo-alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), nitro, alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-tio, alquil de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-sulfonilo, alcoxi de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, fenilo opcionalmente sustituido, fenoxi opcionalmente sustituido,  
 $R_L^2$  es hidrógeno o alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),  
 $R_L^3$  es hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno de (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), alquinilo de (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) o arilo, en que cada uno de los radicales que contienen carbono, antes mencionados, está sin sustituir o sustituido con uno o varios, preferentemente hasta tres, radicales idénticos o diferentes tomados del conjunto que se compone de halógeno y alcoxi; o sus sales.

- M) compuestos activos de la clase de las  
 3-(5-tetrazolilcarbonyl)-2-quinolonas,  
 por ejemplo  
 1,2-dihidro-4-hidroxi-1-etil-3-(5-tetrazolilcarbonyl)-2-quinolona (CAS N° de Reg.: 219479-18-2), 1,2-dihidro-4-hidroxi-1-metil-3-(5-tetrazolilcarbonyl)-2-quinolona (CAS N° de Reg.: 95855-00-8), tal como se describen en el documento WO-A-1999000020,

- N) Compuestos de las fórmulas (S-XI) o (S-XII)  
 tal como se describen en los documentos WO-A-2007023719 y WO-A-2007023764



en las que

- $R_N^1$  es halógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metoxi, nitro, ciano, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>  
 Y, Z independientemente uno de otro son O o S,  
 $n_N$  es un número entero de 0 hasta 4,  
 $R_N^2$  es alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>), alqueno de (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquilo de (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), arilo; bencilo, halobencilo,  
 $R_N^3$  es hidrógeno, alquilo de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

- O) uno o más compuestos tomados del conjunto que consiste en:  
 anhídrido de ácido 1,8-naftálico,  
 fosforoditioato de O,O-dietilo y S-2-etiltio-etilo (disulfotón),  
 metilcarbamato de 4-cloro-fenilo (mefenato),  
 fosforotioato de O,O-dietil-O-fenilo (dietolato),  
 ácido 4-carboxi-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano-4-acético (CL-304415,  
 CAS N° de Reg.: 31541-57-8),  
 1-oxa-4-azaespiro[4.5]decano-4-carboditioato de 2-propenilo (MG-838,  
 CAS N° de Reg.: 133993-74-5),  
 [(3-oxo-1H-2-benzotiopiran-4(3H)-iliden)metoxi]acetato de metilo  
 (a partir del documento WO-A-98/13361; CAS N° de Reg.: 205121-04-6),  
 cianometoxiimino(fenil)acetónitrilo (ciometrinilo),  
 1,3-dioxolan-2-ilmetoxiimino(fenil)acetónitrilo (oxabetrinilo),  
 O-1,3-dioxolan-2-ilmetil-oxima de 4'-cloro-2,2,2-trifluoro-acetofenona  
 (fluxofenim),



4,6-dicloro-2-fenilpirimidina (fenclozim),  
 2-cloro-4-trifluorometil-1,3-tiazol-5-carboxilato de bencilo (flurazol),  
 2-diclorometil-2-metil-1,3-dioxolano (MG-191),  
 incluyendo a los estereoisómeros y a las sales habituales en la agricultura.

- 5 También es posible una mezcla con otros compuestos activos conocidos, tales como fungicidas, insecticidas, acaricidas, repelentes de pájaros, nutrientes de plantas y agentes mejoradores de la estructura de los suelos.

Algunos de los antídotos ya son conocidos como herbicidas y, por consiguiente, además de la acción herbicida contra plantas dañinas, también actúan protegiendo a las plantas cultivadas. Las relaciones ponderales del herbicida (la mezcla de herbicidas) al antídoto dependen en general de la tasa de aplicación del (de los) herbicida(s) y de la eficacia del antídoto en cuestión y pueden variar dentro de amplios límites, por ejemplo en el intervalo de 200:1 a 1:200, preferentemente de 100:1 a 1:100, en particular de 20:1 a 1:20. Los antídotos se pueden formular de una manera análoga a la de los compuestos de la fórmula (I) o sus mezclas con otros herbicidas/plaguicidas y se pueden poner a disposición y utilizar como una formulación acabada o una mezcla en depósito con los herbicidas.

15 La tasa de aplicación requerida del compuesto de la fórmula (I) varía dependiendo, entre otras cosas, de condiciones externas tales como la temperatura, la humedad y el tipo del herbicida usado. Puede variar dentro amplios límites, por ejemplo entre 0,001 y 10.000 o más g/ha de la sustancia activa; sin embargo, está situada preferentemente entre 0,5 y 5.000 g/ha, de manera particularmente preferida entre 0,5 y 1.000 g/ha y de manera muy particularmente preferida entre 0,5 y 500 g/ha.

20 Cuando la planta transgénica de la invención contiene uno o más otros genes para tolerancia a otros herbicidas (tal como, por ejemplo, un gen que codifica una EPSPS mutada o no mutada que confiere a la planta tolerancia a herbicidas del tipo de glifosato o un gen de pat o bar que confiere tolerancia a herbicidas del tipo de glufosinato), o cuando la planta transgénica es resistente de modo natural a otro herbicida (tal como una tolerancia a sulfonilureas), el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender la aplicación simultánea o escalonada cronológicamente de un agente inhibidor de las HPPD en combinación con dicho(a) herbicida o combinación de herbicidas, por ejemplo herbicidas de los tipos de glifosato y/o glufosinato y/o sulfonilurea.

La divulgación también se refiere al uso del gen quimérico que codifica la HPPD de la invención como un gen marcador durante la transformación de una especie de planta, basándose en la selección de los antes mencionados herbicidas inhibidores de las HPPD.

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o pirazolinatos, caracterizado porque la planta es transformada con un gen quimérico que expresa en la planta una HPPD de la invención tal como se ha definido en el presente contexto.

En una realización particular, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o pirazolinatos, caracterizado porque la HPPD de la invención comprende la SEQ ID NO: 4 (desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401), o un ADN sintético que codifica la HPPD de la invención adaptada al trato con codones de maíz, arroz, trigo, especies de soja, caña de azúcar, cebolla, plantas de especies de Brassica, o algodón.

Adicionalmente, la divulgación se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o pirazolinatos, caracterizado porque la HPPD de la invención comprende la SEQ ID NO: 18 (desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402), o un ADN sintético que codifica la HPPD de la invención adaptada al trato con codones de maíz, arroz, trigo, especies de soja, caña de azúcar, cebolla, plantas de especies de Brassica, o algodón.

En otra realización particular, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas seleccionado entre tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo, isoxaflutol, sulcotriona, tefuriltriona y biciclopirona. En otra realización particular, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o de pirazolinatos, caracterizado porque la planta también comprende un gen quimérico expresable en plantas que codifica una enzima PDH (preferato deshidrogenasa), o una enzima con por lo menos PDH.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para reprimir malezas en una zona o un campo, cuyo procedimiento comprende plantar en esta(e) zona o campo unas plantas transformadas resistentes a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o de pirazolinatos, que se han obtenido de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito más arriba, o unas semillas transformadas que se originan de ellas, y aplicar una dosis, que es tóxica para las malezas de dicho agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o de pirazolinatos sin afectar de manera significativa a dichas semillas transformadas ni a dichas plantas transformadas.

55 La invención también se refiere a un procedimiento para obtener un aceite o una harina, que comprende hacer crecer una planta transformada resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o de pirazolinatos, que se ha obtenido de acuerdo con el procedimiento antes descrito, o una semilla transformada que se origina de dicha planta, tratar opcionalmente dicha planta o semilla con un agente inhibidor de las HPPD del tipo de pirazolinatos, cosechar los granos y moler los granos para producir una harina y extraer el aceite.

La invención también se refiere al uso de una HPPD de la invención tal como se ha descrito más arriba, caracterizado porque el agente inhibidor de las HPPD es un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas, seleccionado entre tembotriona, mesotriona, topamezona, biciclopirona, tefuriltriona y sulcotriona.

5 La presente invención también se refiere a un organismo hospedador, en particular a células de plantas o a plantas, que contienen un gen quimérico que comprende una secuencia que codifica una HPPD de acuerdo con la invención, y que también contiene un gen que es funcional en este organismo hospedador permitiendo la sobreexpresión de una enzima preferato deshidrogenasa (abreviada en el presente documento como PDH).

10 El término "enzima PDH" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima de PDH natural o mutada que exhiba la actividad de la PDH, de conversión del preferato en HPP. En particular, dicha enzima de PDH se puede originar de cualquier tipo de organismo. Una enzima con actividad de PDH puede ser identificada por cualquier procedimiento que haga posible o bien medir la disminución en la cantidad del sustrato preferato, o medir la acumulación de un producto derivado de la reacción enzimática, es decir HPP o uno de los cofactores NADH o NADPH.

15 Muchos genes que codifican enzimas PDH se describen en la bibliografía y sus secuencias se pueden identificar en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. Particularmente conocido es el gen que codifica la enzima PDH de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Nº de Acceso S46037) tal como se describe en la cita de Mannhaupt y col. (1989) Gene 85, 303-311, de una bacteria del género *Bacillus*, en particular de la especie *B. subtilis* (Nº de registro P20692) tal como se describe en la cita de Henner y col. (1986) Gene 49 (1) 147-152, de una bacteria del género *Escherichia*, en particular de la especie *E. coli* (Nº de registro KMECTD) tal como se describe en la cita de Hudson y col. (1984) J. Mol. Biol. 180(4), 1023-1051, o de una bacteria del género *Erwinia*, en particular de la especie *E. herbicola* (Nº de registro S29934) tal como se describe en la cita de Xia y col. (1992) J. Gen. Microbiol. 138(7), 1309-1316.

25 La invención se refiere además a un procedimiento para obtener un organismo hospedador, particularmente una célula de planta o una planta, que es resistente a un agente inhibidor de la HPPD, por integración en dicho organismo de por lo menos una secuencia de ácido nucleico o un gen quimérico tal como antes se ha definido, y por transformación ulterior de ella, de manera simultánea o sucesiva, con un gen que es funcional en este organismo hospedador permitiendo la expresión de una enzima PDH (preferato deshidrogenasa). En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento para obtener un organismo hospedador, particularmente una célula de planta o una planta, que es resistente a un agente inhibidor de la HPPD del tipo de tricetonas o pirazolinatos, particularmente tembotriona, mesotriona topamezona, biciclopirona, tefuriltriona o sulcotriona.

30 En el documento WO 04/024928 se describen extensamente medios y procedimientos que se podrían usar para obtener un organismo hospedador, particularmente una célula de planta o una planta, transformado(a) tanto con un gen que permite una sobreexpresión de una enzima HPPD, y con un gen que permite una sobreexpresión de una enzima PDH.

35 La referencia hecha en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella) o a cualquier materia que sea conocida, no se toma, ni se deberá tomar, como un reconocimiento o una admisión o cualquier forma de sugerencia de que dicha publicación anterior (o anterior) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo de esta invención.

#### FIGURAS

40 FIG.1 Mapa del plásmido pSE420::FMP22e  
 FIG.2 Mapa del ADN T introducido dentro de las plantas de tabaco  
 FIG.3 Mapa del plásmido pSE420::FMP23e  
 FIG.4 Mapa del ADN T introducido dentro de las plantas de tabaco  
 45 FIG.5 Mapa del ADN T que contiene los genes que codifican la proteína FMP22 introducida en las diferentes plantas de acuerdo con los Ejemplos 5 hasta 14. Abreviaturas que tienen los siguientes significados:  
 A, B, C y G, plantas de tabaco, D, E, y F, plantas de Zea mays, H. Plantas de soja, I. Plantas de arroz y J, plantas de algodón. 35S: promotor de CaMV35S, KanR: gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, nos: promotor de nopalina sintasa, Ter: terminador, H6: secuencia que codifica una marca de His, OTP: péptido de tránsito optimizado, genes de BAR (resistentes a bialafos documento WO 8705629) y de PAT (fosfotricina N-acetiltransferasa, documento EP 257542): que confieren tolerancia a bialafos, fosfotricina o glufosinato, 2mEPSPS: gen que codifica la EPSPS (5-enolpiruvilshikimato sintasa) doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) procedente de Zea mays (documento US 20030027312), 2mAHAS: gen que codifica la ALS (acetolactato sintasa) doble mutante procedente de Arabidopsis (Pro197Ala y Trp574Leu); documento US 5378824, HA: promotor de histona procedente del gen de Arabidopsis, TEV: virus del grabado del tabaco, FMP22e: gen que codifica una FMP22 optimizada para la expresión en E coli con una secuencia que codifica una marca de His junto a su extremidad 5', FMP22t: gen que codifica una FMP22 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas con una secuencia que codifica una marca de His junto a su extremidad 5', FMP22t-h, un gen que codifica una FMP22 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas, FMP22m, un gen que codifica una FMP22 optimizada para la expresión en plantas de Zea mays, LB, borde izquierdo, RB, borde derecho.

50  
 55  
 60 FIG.6 Mapa del ADN T que contiene los genes que codifican la proteína FMP23 introducida en las diferentes plantas de acuerdo con los Ejemplos 5 hasta 14. Abreviaturas que tienen los siguientes significados:

5 A, B, C y G, plantas de tabaco, D, E, y F, plantas de Zea mays, H. Plantas de soja, I. Plantas de arroz y J, plantas de algodón. 35S: promotor de CaMV35S, KanR: gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, nos: promotor de nopalina sintasa, Ter: terminador, H6: secuencia que codifica una marca de His, OTP: péptido de tránsito optimizado, genes de BAR (resistentes a bialafos documento WO 8705629) y de PAT (fosfinotricina N-acetiltransferasa, documento EP 257542): que confieren tolerancia a bialafos, fosfinotricina o glufosinato, 2mEPSPS: gen que codifica la EPSPS (5-enolpiruvilshikimato sintasa) doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) procedente de Zea mays (documento US 20030027312), 2mAHAS: gen que codifica la ALS (acetolactato sintasa) doble mutante procedente de Arabidopsis

10 (Pro197Ala y Trp574Leu); documento US 5378824, HA: promotor de histona procedente del gen de Arabidopsis, TEV: virus del grabado del tabaco, FMP23e: gen que codifica una FMP22 optimizada para la expresión en E coli con una secuencia que codifica una marca de His junto a su extremidad 5', FMP23t: gen que codifica una FMP23 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas con una secuencia que codifica una marca de His junto a su extremidad 5', FMP23t-h, un gen que codifica una FMP23 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas, FMP23m, un gen que codifica una FMP23 optimizada para la expresión en plantas de Zea mays, LB, borde izquierdo, RB, borde derecho.

15

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041

20 SEQ ID NO: 2: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 optimizada para *E. coli*, que contiene además en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina.

SEQ ID NO: 3: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para *Nicotiana tabaccum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca de HIS.

25 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, derivada de la SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 5: Proteína codificada por la SEQ ID NO: 2

30 SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 (SEQ ID NO: 4) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (WO 2009/144079))

SEQ ID NO: 7: Proteína codificada por la SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO: 8: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Arabidopsis thaliana*

35 SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Arabidopsis thaliana*

SEQ ID NO: 10: Proteína codificada por la SEQ ID NO: 8 más una alanina adicional, directamente corriente abajo del aminoácido inicial metionina seguido por 6 aminoácidos histidina

SEQ ID NO: 11: Proteína de la SEQ ID NO: 9 más la secuencia de OTP situada en el extremo N terminal de la proteína.

40 SEQ ID NO: 12: Proteína de la SEQ ID NO: 10 más la secuencia de OTP situada en el extremo N terminal de la proteína.

SEQ ID NO: 13: Secuencia de cebador Xho-OTP-directo

SEQ ID NO: 14: Secuencia de cebador NcoI-OTP-inverso

SEQ ID NO: 15: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040

45 SEQ ID NO: 16: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 optimizada para *E. coli*, que contiene además en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina.

SEQ ID NO: 17: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 optimizada para *Nicotiana tabaccum* que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca de HIS.

50 SEQ ID NO:18: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, derivada de la SEQ ID NO: 15

SEQ ID NO:19: Proteína codificada por la SEQ ID NO:16

55 SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 (SEQ ID NO: 18) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (WO 2009/144079))

SEQ ID NO: 21: Proteína codificada por la SEQ ID NO: 17

60 SEQ ID NO: 22: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas dicotiledóneas

SEQ ID NO: 23: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Zea mays

SEQ ID NO: 24: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1),

		material aislado ro03041, optimizada para plantas de Brassica napus
	SEQ ID NO: 25:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Beta vulgaris
5	SEQ ID NO: 26:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Gossypium hirsutum
	SEQ ID NO: 27:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Glycine max
	SEQ ID NO: 28:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Hordeum vulgare
10	SEQ ID NO: 29:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Oryza sativa
	SEQ ID NO: 30:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de Triticum aestivum
	SEQ ID NO: 31:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas dicotiledóneas
15	SEQ ID NO: 32:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 optimizada para plantas de Zea mays
	SEQ ID NO: 33:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Brassica napus
20	SEQ ID NO: 34:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Beta vulgaris
	SEQ ID NO: 35:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Gossypium hirsutum
	SEQ ID NO: 36:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Glycine max
25	SEQ ID NO: 37:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Hordeum vulgare
	SEQ ID NO: 38:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Oryza sativa
30	SEQ ID NO: 39:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de Rhodococcus sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de Triticum aestivum

### Ejemplos

Los diversos aspectos de la invención serán comprendidos mejor con la ayuda de los ejemplos experimentales que siguen. Todos los procedimientos o todas las operaciones que se describen seguidamente en estos ejemplos se dan por vía de ejemplo y corresponden a una elección que se hace entre los diferentes procedimientos que están disponibles para llegar al mismo resultado o a uno similar. Esta elección no tiene ningún efecto sobre la calidad del resultado y, como consecuencia, se puede usar cualquier procedimiento apropiado por la persona experta para llegar al mismo resultado o a uno similar. La mayoría de los procedimientos para manipular fragmentos de ADN se describen en la obra "Current Protocols en Molecular Biology" Volúmenes 1 y 2, Ausubel F.M. y col., publicado por Greene Publishing Associates y Wiley Interscience (1989) o en la obra Molecular cloning, T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 1982, o en Sambrook J. y Russell D., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (Tercera edición)

### **Ejemplo 1**

Preparación de las HPPD's de Rhodococcus (que se denominan FMP22e y FMP23e) de la SEQ ID NO: 5 y de la SEQ ID No.19 y de la HPPD de *Arabidopsis thaliana* identificada por la SEQ ID NO: 10.

La secuencia codificante de la HPPD de *Arabidopsis thaliana* AtHPPD (de 1335 pb (pares de bases); Genbank AF047834; documento WO 96/38567) fue clonada inicialmente dentro del vector de expresión pQE-30 (QIAGEN, Hilden, Alemania) entre los sitios de restricción de BamHI y HindIII. El vector obtenido se denominó "pQE30-AtHPPD".

Las secuencias originales de las HPPD's de Rhodococcus (de 1206 pb y 1209 pb) que codifican las proteínas listadas con los números de referencia Q0SC92 y Q0SF39 respectivamente en UniProtKB/TrEMBL se modificó y sintetizó usando un optimizado trato con codones de *Escherichia coli* K12 (operón Eurofins MWG (Ebersberg, Alemania), software (programa lógico) de GENEius) y se clonó en un vector pBluescript modificado (operón Eurofins MWG operón, Ebersberg, Alemania). En este vector, la secuencia correspondiente al MCS (acrónimo de multiple cloning site = sitio de clonación múltiple) fue eliminada parcialmente de tal manera que quedaron solamente las secuencias correspondientes a los sitios de reconocimiento por la enzima de restricción HindIII a ambos lados del inserto.

En el extremo 5', directamente corriente abajo del ATG se introdujo una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y una secuencia de ácido nucleico que codifica una marca de 6 HIS N terminal (6x HIS, codificada por: cac cac cac cat cac cat o cac cat cac cac cac). Corriente arriba del ATG, se añadieron dos pares adicionales de bases de citosina con el fin de obtener una secuencia correspondiente al sitio de reconocimiento de la

enzima de restricción NcoI y corriente abajo con respecto al codón de detención se añadieron las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI. Los resultantes vectores “pBluescript-FMP22e” y “pBluescript-FMP23e” fueron digeridos con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, la banda que no migraba en la longitud del tamaño del vector de aproximadamente 3.000 pb correspondiente al ADN fue separada sobre un gel de agarosa por electroforesis. Luego, el ADN que codifica la HPPD fue purificado usando el Estuche de Extracción con Gel MinElute™ (Qiagen, Hilden, Alemania) y clonado dentro del vector pSE420(RI)NX (véase más adelante) previamente cortado con las mismas enzimas de restricción.

El vector de clonación y expresión pSE420(RI)NX (5261 pb) está basado en el plásmido pSE420 producido por Invitrogen (Karlsruhe, Alemania). Las modificaciones de este vector incluyen la adición de un gen de nptII (neomicina fosfotransferasa; Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (Tercera edición)) que confiere tolerancia al antibiótico kanamicina y al que le falta la mayoría de la súper-región de engarzador (sitio de clonación múltiple).

El plásmido posee el promotor trp-lac (trc) y el gen *lacI<sup>q</sup>* que proporciona el represor *lac* en cualquier cepa hospedadora de *E. coli*. El represor *lac* se fija al operador *lac* (*lacO*) y restringe la expresión del gen diana; esta inhibición puede ser aliviada por inducción con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Los resultantes vectores fueron denominados “pSE420(RI)NX-FMP22e” y “pSE420(RI)NX-FMP23e” (véanse las Figuras 1 y 3) y fueron usados para transformar células de *Escherichia coli* BL21 (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la AtHPPD (HPPD de *Arabidopsis thaliana*) que se usó como referencia, véase el documento WO 2009/144079.

La expresión de HPPD se llevó a cabo en *E. coli* K-12 BL21 que contiene pQE30-AtHPPD pSE420(RI)NX-FMP22e o pSE420(RI)NX-FMP23e. Las células se dejaron crecer hasta que la OD (acrónimo de Optical Density = densidad óptica) llegó a 0,5, luego se inició la expresión desde el promotor trp-lac (trc) por inducción con 1 mM de IPTG que se fija al represor *lac* y causa su disociación desde el operón *lac*. La expresión se llevó a cabo durante 15 h a 28 °C. Para preparar el cultivo pre-iniciador, 2 ml del medio TB (100 μg\*ml<sup>-1</sup> de carbenicilina) se inocularon con 50 μl de una carga original de *E. coli* K-12 BL21 en glicerol. El cultivo pre-iniciador se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 h. 200 μl del cultivo pre-iniciador se usaron para iniciar al cultivo iniciador (5 ml de suplemento TB con 100 μg\*l<sup>-1</sup>), que se incubó durante 3 h a 37°C. Para preparar el cultivo principal, 400 ml del medio TB (100 μg\*ml<sup>-1</sup> de carbenicilina) se inocularon con 4 ml del cultivo iniciador. Este cultivo iniciador se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm hasta que se alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,5. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante con 400 μl de una solución 1 M de IPTG. Las células se dejaron crecer durante una hora adicional en estas condiciones, luego la temperatura se disminuyó a 28°C y el cultivo se agitó a 140 rpm durante 15 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 6.000 x g durante 15 min at 4 °C. Luego los sedimentos de células se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento y purificación de His<sub>6</sub>-AtHPPD, His<sub>6</sub>-FMP22e y His<sub>6</sub>-FMP23e en forma natural

Lisis de células

Las células fueron lisadas usando lisozima, una enzima que disocia los enlaces 1,4-β entre residuos de ácido N-acetilmurámico y de N-acetil-D-glucosamina en un péptidoglicano que forma la pared celular de las bacterias. Las membranas celulares fueron luego rotas por la presión interna de la célula de bacteria. Por añadidura, el tampón de lisis contenía la Nucleasa Benzonase®, que es una endonucleasa que hidroliza a todas las formas de ADN y ARN sin dañar a las proteínas y de esta manera reduce ampliamente la viscosidad del material lisado celular. La lisis en condiciones naturales se llevó a cabo sobre hielo.

Para la purificación de proteínas marcadas con His<sub>6</sub> se usó el Estuche de Iniciación Rápida QIAexpress® Ni-NTA Fast Start, siguiendo las instrucciones del manual de los usuarios.

Purificación de proteínas marcadas con His<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC = acrónimo de immobilized metal ion affinity chromatography).

El material lisado de células despejado (10 ml), obtenido después de centrifugación de la masa de reacción de lisis se cargó sobre una Columna de Iniciación Rápida Ni-NTA Fast Start Column procedente del Estuche QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y la purificación se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones. La proteína marcada con His<sub>6</sub> fue eluida con 2,5 ml del tampón de elución.

Desalinización de las soluciones de HPPD mediante filtración en gel.

Unas soluciones de HPPD, eluidas de una Columna de Iniciación Rápida Ni-NTA Fast Start con 2,5 ml de un tampón de elución, fueron aplicadas a una columna Sephadex G-25 PD-10 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual de los usuarios. Después de que la totalidad de la muestra hubo entrado en el lecho de gel, se realizó una elución con 3,5 ml de un tampón de almacenamiento.

Las soluciones de HPPD, eluidas de la columna de desalinización, fueron congeladas a -80 °C en partes alícuotas

de 1 ml.

Determinación de la concentración de la proteína HPPD usando el ensayo de proteínas de Bradford. La concentración de la proteína fue determinada usando el ensayo de Bradford normalizado (Bradford, (1976), Anal Biochem 72: 248-254).

- 5 Determinación de la pureza de las soluciones de HPPD usando una SDS-PAGE (electroforesis en gel de SDS-poli(acrilamida))

La integridad de la proteína eluída se comprobó mediante una electroforesis en gel de proteína SDS-PAGE usando el gel NuPAGE® Novex 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), se cargaron aproximadamente 10 µg de proteína. 10 µl del Tampón de Muestra de Laemmli se añadieron a 1-10 µl de una solución de proteína y la mezcla se incubó a 90 °C durante 10 min. Después de una corta operación de centrifugación, toda la mezcla fue cargada dentro de una rendija de un gel de SDS previamente fijado en una cámara de gel XCell SureLock™ Novex Mini-Cell rellena con un Tampón de Elución NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (diluido a partir de la solución 20 x con ddH<sub>2</sub>O). Luego se aplicó un voltaje de 150 V a la cámara de gel durante 1 h. Para la tinción de bandas de proteínas, el gel fue sumergido en una Solución de Tinción Coomassie Brilliant Blue R-250. Para desteñir al gel de poli(acrilamida), éste fue sumergido en una Solución de Destinción Coomassie Brilliant Blue R-250 hasta que las bandas de la proteína aparecieron de color azul sobre un gel de color blanco.

## Ejemplo 2

Caracterización cinética y evaluación de la tolerancia a agentes inhibidores de las HPPD de las enzimas HPDD “SEQ ID NO: 5”, “SEQ ID NO: 19” y “SEQ ID NO: 10”.

- 20 La actividad de las HPPD fue comprobada por el ensayo espectrofotométrico clásico (procedimiento descrito extensamente en el documento WO 2009/144079)

Determinación de las propiedades cinéticas in vitro de las HPPD

Los valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$  para diferentes preparaciones de enzimas HPPD y los valores de  $K_i$ ,  $K_1=K_{on}$ , y  $K_{-1}=K_{off}$  para diferentes agentes inhibidores de las HPPD fueron determinados usando un ensayo de HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) para mediciones de la actividad de las HPPD. Las mezclas de ensayo contenían, en un volumen de 1 ml, 150 mM de un tampón de Tris-HCl a un pH de 7,8, 10 mM de ascorbato de sodio, 650 unidades de catalasa bovina (Sigma C30 (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania), 34 mg de proteína/ml, 23.000 unidades/mg), y apropiadas cantidades del HPP, de la enzima HPPD purificada y de los agentes inhibidores de las HPPD. Para la determinación de los valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$  las concentraciones de HPP en la mezcla de ensayo se hicieron variar entre 10 y 400 µM. Para la determinación de los valores de  $K_i$ ,  $K_1=K_{on}$ , y  $K_{-1}=K_{off}$  se usaron 2 mM de HPP. Todos los ensayos se comenzaron mediante la adición de una enzima HPPD a la mezcla de ensayo y se detuvieron en una serie de momentos entre 0 y 240 s (segundos) por adición de 200 µl de la mezcla de reacción a unos tubos de ensayo para reacción, que contenían 20 µl de ácido perclórico al 10 %. La proteína precipitada se sedimentó mediante una centrifugación durante 5 minutos a 10.000 xg. 100 µl del material sobrenadante se cargaron sobre una columna de Knauer (Berlín, Alemania) Eurospher 100-5 C18 de 250 x 4mm, equilibrada con 10 % de metanol y 0,1 % de ácido trifluoroacético (tampón A). La columna fue eluída, también a razón de 1,5 ml/min, usando un lavado durante 4 minutos con el tampón A, seguido por un lavado durante 3 minutos con metanol al 95 % y por un lavado durante 2 minutos adicionales con el tampón A. La elución del HGA (ácido homogentísico) y del HPP (hidroxifenilpiruvato) se vigiló a 292 nm. El HGA se eluye en alrededor de 5 minutos y el HPP se eluye más tarde. Un conjunto patrón de concentraciones de HGA se usaron para proporcionar una curva patrón con el fin de calibrar la absorbencia a 292 nm del pico de HGA en función de la concentración de HGA.

Para las determinaciones de los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , las velocidades iniciales de la reacción de HPPD en diferentes concentraciones del sustrato se determinaron a partir de representaciones gráficas del HGA formado en función del tiempo y se acoplaron con la ecuación de Michaelis-Menten para enzimas unirreactivas usando la sucesión de programas lógicos ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com) XLfit software suite. Para la determinación de los valores de  $K_i$ ,  $K_1=K_{on}$ , y  $K_{-1}=K_{off}$  los cursos de tiempo de la reacción de HPPD con diferentes concentraciones de los inhibidores fueron acoplados con las ecuaciones para el Mecanismo A, inhibición competitiva, para inhibidores de fijación apretada (Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitors – I. Kinetic behaviour [inhibidores de fijación apretada – I. Comportamiento cinético]. Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185) usando la sucesión de programas lógicos ID Business Solutions Ltd. XLfit software suite

Tabla 1 Caracterización cinética de las enzimas HPPD (de *Arabidopsis thaliana* “SEQ ID NO: 10” y de *Rhodococcus* “SEQ ID NO: 5” y “SEQ ID NO: 19”) y sus respectivas tolerancias a los agentes inhibidores de las HPPD tembotriona y dicetonitrilo.

En la Tabla 1 dada seguidamente, “ $K_m$ ” (la constante de Michaelis-Menten) significa el parámetro cinético que se usa para caracterizar a una enzima, y es definida como la concentración del sustrato que permite una velocidad semimáxima de la reacción. La  $K_m$  es definida adicionalmente como la concentración del sustrato con la que la velocidad de reacción alcanza la mitad de su valor máximo ( $V_{m\acute{a}x}/2$ ) en que  $V_{m\acute{a}x}$  tiene el significado de ser la

velocidad máxima de la reacción.

$K_{on}=K_1$  es igual a la constante de velocidad de asociación de la fijación entre la enzima y el sustrato y  $K_{off}=K_{-1}$  es igual a la constante de velocidad de la disociación del complejo de enzima e inhibidor.  $K_i$  define a la constante de inhibición

	HPP		Tembotriona			Dicetonitrilo		
	$K_m$	$V_{m\acute{a}x}$	$k_1$	$k_{-1}$	$K_i$	$k_1$	$k_{-1}$	$K_i$
	( $\mu M$ )	( $\mu M$ )	( $M^{-1} s^{-1}$ )	( $s^{-1}$ )	( $\mu M$ )	( $M^{-1} s^{-1}$ )	( $s^{-1}$ )	( $\mu M$ )
SEQ ID NO: 10	6,3	1,2	2,3E+05	3,5E-03	0,015	6,1E+05	1,1E-02	0,018
SEQ ID NO: 19	35	1,1	3,2E+03	6,3E-03	2,0	2,6E+03	9,5E-03	3,6

5

En la anterior Tabla 1, puede verse con claridad que mientras que los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la HPPD de bacteria "SEQ ID NO: 19" y de la HPPD de planta "SEQ ID NO: 10" no muestran ninguna diferencia significativa (6,3  $\mu M$  y 35  $\mu M$  respectivamente), la HPPD de bacteria "SEQ ID NO: 19" era muchísimo más tolerante a los agentes inhibidores de las HPPD ensayados que la HPPD de planta "SEQ ID NO: 10".

10 Determinación de la actividad de las HPPD en presencia de diversos agentes inhibidores de las HPPD

En este contenido, el valor de  $pl_{50}$  significa el valor del logaritmo de la concentración del agente inhibidor que es necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de una enzima en concentración molar.

15 Los valores de  $pl_{50}$  para los agentes inhibidores de las HPPD se determinaron a partir de representaciones gráficas de dosis y respuesta de la actividad de una HPPD en función de la concentración del agente inhibidor, usando el ensayo descrito extensamente en el documento WO 2009/144079 en una concentración de HPP fijada en 2 mM y un período de tiempo de incubación fijado de 3 minutos usando la sucesión ID Business Solutions Ltd. XLfit software suite.

20 Tabla 2 Determinación del  $pl_{50}$  de enzimas HPPD (de *Arabidopsis thaliana* "SEQ ID NO: 10" y de *Rhodococcus* "SEQ ID NO: 5" y "SEQ ID NO: 19") y sus respectivas tolerancias a los diversos agentes inhibidores de la HPPD enumerados seguidamente: tembotriona, dicetonitrilo, mesotriona, biciclopirona, pirasulfotol, sulcotriona, pirazolato, tefuriltriona y benzofenap. El símbolo ">>" significa que el valor era muchísimo más alto que el indicado pero no podría ser calculado con exactitud dentro del intervalo de concentraciones del agente inhibidor ensayado ( $2,5 \times 10^{-6}$ ,  $5,0 \times 10^{-6}$ ,  $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $2,5 \times 10^{-5}$ ,  $6,3 \times 10^{-5}$ ,  $2,5 \times 10^{-4} M$ ).

	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID NO: 10	>>5,6	>>5,6	>>5,6	5,2
SEQ ID NO: 5	5,3	4,8	5,3	3,9
SEQ ID NO: 19	5,1	4,6	5,6	4,2

	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID NO: 10	5,4	>>5,6	5,4	>>5,6	>>5,6
SEQ ID NO: 5	4,0	5,3	4,2	5,2	5,4
SEQ ID NO: 19	4,1	5,5	4,9	5,6	5,6

25 Tabla 3: Determinación del porcentaje de inhibición en presencia de  $5,0 \times 10^{-6} M$  de agentes inhibidores comparado con la actividad medida en ausencia del agente inhibidor para la HPPD originada a partir de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 10) y a partir de *Rhodococcus sp.* (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 19).

	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID NO: 10	92	87	86	29

	(continuación)				
	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona	
SEQ ID NO: 5	36	27	54	0	
SEQ ID NO: 19	70	11	67	1	
	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID NO: 10	69	74	61	100	90
SEQ ID NO: 5	0	n.d.	1	43	57
SEQ ID NO: 19	2	73	14	65	72

En las anteriores Tablas 2 y 3, puede verse con claridad, que las HPPD's bacterianas "SEQ ID NO: 5" y "SEQ ID NO: 19" mostraron un superior nivel de tolerancia a todos los agentes inhibidores de las HPPD ensayados que la planta en todas las concentraciones de agentes inhibidores de las HPPD que el que se observó empleando la HPPD "SEQ ID NO: 10" en idénticas condiciones experimentales.

### Ejemplo 3

Construcción de genes quiméricos para la evaluación de la tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD en plantas de tabaco.

#### A) Construcción de los genes quiméricos

El vector pRP-RD224 (que se describe extensamente en el documento WO 2009/144079) que contiene la secuencia que codifica el OTP se usó para la fijación mediada por PCR corriente arriba de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI y corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI. El obtenido producto de la PCR fue clonado en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual de los usuarios. El vector resultante se denominó "pCR-TOPO-OTP". La inserción de la correcta secuencia fue confirmada por una clásica secuenciación de ADN. El ADN correspondiente al OTP fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, separado por apropiadas electroforesis en gel y clonado previamente dentro del plásmido pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) y correspondientemente digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. El plásmido pRT100 contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El vector resultante fue subsiguientemente digerido con las enzimas de restricción NcoI y XbaI. Los vectores pSE420(RI)NX-FMP22e (véase la Figura 1) o pSE420(RI)NX-FMP23e (véase la Figura 3) fueron sometidos a las enzimas de restricción NcoI y XbaI con el fin de obtener el fragmento de ADN correspondiente a la "SEQ ID NO: 2" o a la "SEQ ID NO: 16". El vector resultante fue digerido por empleo de la enzima de restricción HindIII para subclonar la casete CaMV35S::OTP::FMP22e::CaMV35-term (véase la Figura 2) o CaMV35S::OTP::FMP23e::CaMV35-term (véase la Figura 4) dentro del vector binario pBin19 (Bevan (1984), Nucleic Acid Res. 12:8711-8721.) previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. Los resultantes vectores fueron denominados "FMP22ebv" y "FMP23ebv".

Los vectores pQE-30-AtHPPD se usaron para la fijación mediada por PCR de un sitio de restricción de NcoI y de una secuencia que codifica una marca de His<sub>6</sub> N terminal para los extremos 5' y un sitio de restricción de XbaI para los extremos 3' de AtHPPD.

El producto de la PCR del gen de AtHPPD fue aislado de un gel de agarosa, cortado con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, purificado con el Estuche de Purificación por PCR MinElute™ (Qiagen, Hilden, Alemania) y clonado dentro del vector pSE420(RI)NX cortado con las mismas enzimas de restricción.

El vector generado se denominó "pSE420(RI)NX-AtHPPD" y fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XbaI y clonado dentro del vector previamente abierto pRT100 (Toepfer y col., (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) que contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El vector generado se denominó "pRT100-AtHPPD".

El vector pCR-TOPO-OTP fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, y la banda de ADN correspondiente al OTP fue clonada dentro del vector previamente abierto pRT100-AtHPPD con las enzimas de restricción antes mencionadas. El vector resultante fue subsiguientemente digerido con la enzima de restricción HindIII y la casete de expresión de interés fue clonada dentro del vector binario pBin19 previamente abierto y desfosforilado. El vector resultante se denominó "AtHPPDbv".

Los vectores binarios FMP22ebv, FMP23ebv y AtHPPDbv se usaron para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV derivadas de EHA101) seleccionadas sobre medios YEB suplementados con los antibióticos kanamicina y rifampicina (que se describen extensamente en el documento de solicitud de patente US005925808A).

Estas cepas de *Agrobacterium* que contienen los vectores binarios de interés (FMP22ebv, FMP23ebv o AtHPPDbv) se usaron para transformar discos de hojas procedentes de plantas de tabaco *Nicotiana tabacum L. cv Samsun*



NN, que tienen aproximadamente un tamaño de 5x5 mm<sup>2</sup>, tal como se describen extensamente en la cita de Horsch y col., (1985), Science 227; 1229-1231.

Los discos de hojas fueron cultivados conjuntamente durante 2 días con células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen o bien el vector binario FMP22ebv, el FMP23ebv o el AtHPPDbv. Luego los discos de hojas fueron transferidos a un medio que permitía la regeneración de vástagos durante 6 semanas en un medio MS (de Murashige y Skoog, (1962), *Physiol Plant* 15(3): 473-497) suplementado con BAP (1 mg/ml; bencilaminopurina), carbenicilina (250 mg/ml), cefotaxina (250 mg/ml), kanamicina (75 mg/ml) y tembotriona (10<sup>-6</sup> M)

Los callos regenerados fueron transferidos a un medio con el fin de inducir el desarrollo de raíces durante 6 a 12 semanas: MS (1/2), suplementado con carbenicilina (250 mg/ml), cefotaxina (250 mg/ml), kanamicina (75 mg/ml), y tembotriona (10<sup>-6</sup> M).

Después de 6 semanas en este medio, los vástagos transformados con células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen el vector binario AtHPPDbv, fueron transferidos al mismo medio agotado con el agente inhibidor de las HPPD tembotriona.

Los resultados están recopilados en la Tabla 4 siguiente.

Durante todo el experimento, las placas que contenían los discos de hoja se colocaron dentro de una cámara de crecimiento en condiciones controladas (luz durante 16 h, noche durante 8 h, 25 °C).

#### Enraizamiento de callos

Los callos de vástagos regenerados a partir de una célula transformada con una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD que comprende la SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*), la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 7 (*Rhodococcus*.) fueron transferidos a un medio que inducía el crecimiento de las raíces, cuyo medio fue suplementado adicionalmente con el agente inhibidor de la HPPD tembotriona durante 6 a 12 semanas. En ninguno de los sucesos que contenían la HPPD definida por la SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*) o no contenían callos transformados, se observó un crecimiento de raíces en las condiciones antes dadas. Al contrario de esto, en las condiciones idénticas, los callos que contenían la HPPD definida por la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 21 desarrollaron manifiestamente raíces numerosas y sanas (véase la Tabla 4, siguiente).

Tabla 4

Callos que contienen:	Sucesos seleccionados para análisis molecular	% de elongación & enraizamiento en 10 <sup>-6</sup> M de tembotriona	Números de sucesos enraizados en medios sin tembotriona
SEQ ID NO: 11	21	0	5
SEQ ID NO: 7	31	65	20
SEQ ID NO: 21	88	63	55

#### Regeneración de discos de hojas

Se cortaron discos de hojas de plantas que contenían las HPPD con SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*), SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 7 (*Rhodococcus*), seguido por una regeneración durante 6 semanas en condiciones clásicas de cultivo en un medio MS suplementado con BAP (1 mg/ml; bencilaminopurina), carbenicilina (250 mg/ml), cefotaxina (250 mg/ml) y que comprende además uno de los agentes inhibidores de las HPPD seguidamente enumerados en las concentraciones mencionadas (tembotriona (10<sup>-6</sup> M), dicetonitrilo (5·10<sup>-6</sup> M), mesotriona (10<sup>-6</sup> M) y biciclopirona (10<sup>-6</sup> M)), con un medio que no contiene ningún agente inhibidor de las HPPD como el testigo positivo. Al final de los experimentos se evaluó el nivel de regeneración tal como sigue:

“-“ significa que los discos de hojas tenían el mismo aspecto que un disco de hoja procedentes de plantas de tabaco de tipo silvestre en un medio suplementado con los inhibidores antes mencionados.

“++++” significa que los discos de hojas tenían un aspecto similar al de los discos de hojas procedentes de las plantas de tabaco de tipo silvestre en un medio sin inhibidor.

“+”, “++”, y “+++” indican que los discos de hojas regenerados fueron afectados grandemente (+), medianamente (++) y poco (+++) por la presencia de los inhibidores.

Los resultados de los experimentos están recopilados en la Tabla 5.

Tabla 5: Efectos de diversos agentes inhibidores de las HPPD sobre la regeneración de un disco de hoja que se origina a partir de plantas transgénicas que comprenden un gen que codifica una HPPD obtenida o bien a partir de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 11) o a partir de *Rhodococcus* SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 21.

Discos de hojas que contienen	Testigo	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID NO: 11	++++	-	-	-	-
SEQ ID No. 7	++++	++	++	++	++
SEQ ID NO: 21	++++	+++	+++	+++	+++

5 Mientras que en el caso de plantas que contienen la HPPD definida por la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 21 (*Rhodococcus*) éstas muestran una regeneración igual o solo ligeramente reducida en comparación con este testigo sin tratar, las correspondientes plantas que contienen la HPPD definida por la SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*) no muestran ninguna regeneración sino que desarrollan un fenotipo de blanqueo claramente visible en comparación con el testigo sin tratar en la presencia de todos los agentes inhibidores de HPPD ensayados.

10 **Ejemplo 4: Pruebas en invernadero para evaluar la tolerancia a herbicidas inhibidores de la HPPD de plantas del tabaco transgénicas que expresan un gen que codifica una proteína HPPD tolerante**

Preparación de linajes de plantas transgénicas que expresan enzimas HPPD o bien de *Arabidopsis* o de FMP22 o FMP23. Ensayo en invernadero en cuanto a tolerancia a herbicidas.

Respuesta a tembotriona, isoxaflutol y biciclopirona

15 Unas plantas de tabaco T0 que contenían o bien el gen procedente de *Arabidopsis* que codifica una HPPD o el gen FMP22e procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 que codifica la HPPD de FMP22, o el gen FMP23e procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, antes mencionados (Ejemplo 3), fueron transferidas al invernadero (28/20°C), para desarrollarse más y producir semillas. Estas semillas fueron cosechadas y colocadas sobre tierra (ED73 mezclada con arena y osmocote Pro) para germinar en el  
20 invernadero (28/20°C). Tres a cuatro semanas más tarde, unas plántulas fueron transferidas a macetas individuales que contenían la tierra antes mencionada. Dos semanas más tarde, unas plantas de un tamaño de 4-6 cm de diámetro fueron rociadas con o bien

- tembotriona a razón de 100 g de IA/ha preparada a partir de una formulación WP20 (polvo humectable al 20 %)
- 25 - isoxaflutol a razón de 100 g de IA/ha preparado a partir de una formulación WP20 suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, o
- biciclopirona a razón de 100 g de IA/ha preparado a partir de una formulación WP20 suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, o
- 30 - una "formulación a ciegas" preparada a partir de una formulación WP20 sin ingrediente activo (IA) suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, y fueron transferidas seguidamente a una cámara de crecimiento con adecuadas condiciones de luz (20.000 Lux).

Siete días después de la aplicación (DAT acrónimo de Days After The application) los síntomas en plantas transformadas fueron evaluados en comparación con la respuesta observada en las plantas de tabaco de tipo silvestre rociadas al mismo tiempo y en las mismas condiciones que las plantas de tabaco que contenían los transgenes (100 % significa que las plantas presentaron el mismo fenotipo de blanqueo que las plantas de tipo silvestre, 0 % significa que las plantas tenían el mismo aspecto que las plantas de tipo silvestre tratadas con la "formulación a ciegas", y un porcentaje intermedio representa el grado de los síntomas observados).

Tabla 6: Plantas de tabaco de tipo silvestre (A) y poblaciones de sucesos en tabaco que contienen  
40 alternativamente, las casetes de expresión que se han descrito más arriba que tienen el promotor de CaMV 35S, la secuencia que codifica un OTP y la secuencia que codifica la HPPD de *Arabidopsis* (B), o el promotor de CaMV35S, la secuencia que codifica un OTP, y la secuencia de FMP22e que codifica la HPPD de FMP22 (C), o el promotor de CaMV35S, la secuencia que codifica un OTP, y la secuencia de FMP23e que codifica la HPPD de FMP23 (C). Las comprobaciones del daño causado por herbicidas a los 7 días después de la aplicación (DAT) por rociada con 100 g de IA/ha de tembotriona o isoxaflutol suplementada/o con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. Es evidente que las plantas que contenían el gen FMP22e o el gen FMP23e fueron  
45 muchísimo más tolerantes a tembotriona y isoxaflutol. Las plantas que pertenecen a las categorías (B) y (C) no han sido seleccionadas en cuanto a la presencia del respectivo transgén antes de la aplicación del herbicida.

ES 2 659 085 T3

A	Tipo silvestre	Linaje	% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
			Tembotriona	Isoxaflutol	
	WT	1	100		100
	WT	2	100		100
	WT	3	100		100
	WT	4	100		98
	WT	5	100		99
	WT	6	100		99
	WT	7	100		100
	WT	8	100	n.d.	
	WT	9	100	n.d.	
	WT	10	100	n.d.	
	WT	11	100	n.d.	
	WT	12	100	n.d.	
	WT	13	100	n.d.	
	WT	14	100	n.d.	

B	HPPD de Arabidopsis	Linaje	% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
			Tembotriona	Isoxaflutol	
	258	1	100		100
	258	2	100		100
	258	3	100		100
	258	4	100		100
	258	5	100		100
	258	6	30		100
	252	1	30		30
	252	2	40		70
	252	3	40		95
	252	4	40		98
	252	5	50		98
	252	6	60		99
	252	7	60		99
	252	8	70		99
	252	9	70		99
	252	12	75		100
	252	13	75		100
	252	14	75		100
	252	15	80		100
	327	1	10		10
	327	2	20		20
	327	3	20		60
	327	4	40		60
	327	5	50		70

ES 2 659 085 T3

(continuación)

B		% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
HPPD de Arabidopsis	Linaje	Tembotriona	Isoxaflutol	
	327	6	50	80
	327	7	70	95
	327	8	70	98
	327	9	70	99
	327	10	70	100
	327	11	70	100
	327	12	80	100
	327	13	80	100
	327	14	80	100
	327	15	80	100

C		% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
FMP22e	Linaje	Tembotriona	Isoxaflutol	
	64	1	5	0
	64	2	5	5
	64	3	5	20
	64	4	5	30
	64	5	5	35
	64	6	5	50
	64	7	10	50
	64	8	10	n.d.
	64	9	10	n.d.
	64	10	10	n.d.
	64	11	10	n.d.
	64	12	10	n.d.
	64	13	10	n.d.
	64	14	10	n.d.
	64	15	20	n.d.
	65	1	0	0
	65	2	0	0
	65	3	0	0
	65	4	5	0
	65	5	5	0
	65	6	5	1
	65	7	5	1
	65	8	10	1
	65	9	10	1
	65	10	10	2
	65	11	10	3
	65	12	10	10
	65	13	15	50
	65	14	20	n.d.

ES 2 659 085 T3

(continuación)

C	FMP22e	Linaje	% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
			Tembotriona	Isoxaflutol	
		65	15	20	n.d.
		163	1	0	0
		163	2	5	0
		163	3	5	0
		163	4	10	1
		163	5	15	2
		163	6	20	2
		163	7	20	2
		163	8	20	2
		163	9	n.d.	3
		163	10	n.d.	5
		163	11	n.d.	50

D	FMP23e	Linaje	% de daño, 7DAT, 100 g de IA/ha		
			Tembotriona	Isoxaflutol	
		188	1	0	0
		188	2	0	0
		188	3	0	0
		188	4	0	0
		188	5	0	0
		188	6	5	0
		188	7	5	1
		188	8	5	2
		188	9	5	2
		188	10	5	5
		188	11	5	5
		188	12	5	5
		188	13	5	15
		188	14	5	n.d.
		188	15	5	n.d.
		337	1	30	n.d.
		337	2	30	n.d.
		337	3	40	n.d.
		337	4	40	n.d.
		337	5	50	n.d.
		337	6	50	n.d.

Respuesta a biciclopirona.

- 5 Semillas de plantas de tabaco de tipo silvestre y plantas de tabaco T1 que eran portadoras del gen FMP22e procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 FMP22e que codifica la HPPD de FMP22 o plantas que eran portadoras del gen procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1) material aislado ro02040 FMP23e que codifica la HPPD de FMP23 fueron sembradas en un medio MS (Murashige y Skoog 1964) suplementado con 50 g/l de kanamicina. Después de 4 semanas, las plántulas verdes enraizadas fueron transferidas

a tierra y dejadas crecer durante 3 semanas en el invernadero tal como se ha descrito más arriba y luego rociadas con una mezcla que contiene biciclopirona (100 g de IA/ha), sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. Las plantas fueron clasificadas en dos categorías basándose en el fenotipo desarrollado como respuesta al herbicida a los siete días después del tratamiento. La clase I fue definida como plantas que no presentaron desde ningún daño hasta daños ligeros como respuesta al tratamiento con herbicidas (daño: 0-30 %), la clase II fue definida como las plantas que presentaban desde fuertes daños hasta daños similares a los observados con plantas de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento (daño: 31–100 %). En este caso solamente las plantas que contenían por lo menos un ADN T fueron expuestas al tratamiento con herbicida.

En general puede observarse que las plantas que contienen un inserto de ADN T mostraron un nivel significativo y suficiente de tolerancia a una exposición a una dosis en el campo al herbicida inhibidor de las HPPD biciclopirona

Tabla 7:

Transgén	Linaje	Biciclopirona, 100 g de IA /ha 7 DAT		% de planta tolerante
		Clase I	Clase II	
-	WT	0	12	0
FMP22e	64	>100	104	>50
FMP22e	65	86	48	64
FMP22e	163	45	46	50
FMP23e	188	100	70	59

Las plantas que contenían la HPPD de FMP22 o de FMP23 presentaron tolerancia al herbicida inhibidor de las HPPD biciclopirona.

A partir de los datos anteriormente presentados, puede resumirse que las plantas que expresan el gen FMP22e procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 que codifica la HPPD de FMP22 o que expresan el gen FMP23e procedente de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 que codifica la HPPD de FMP23, obtenidas a partir de diferentes sucesos transgénicos independientes son altamente tolerantes a varios herbicidas inhibidores de HPPD en dosis aplicadas en condiciones agronómicas clásicas.

**Ejemplo 5: Construcción de vectores binarios para expresar diferentes variantes optimizadas de dicotiledóneas en plantas y prueba en invernadero para evaluar la tolerancia de plantas de tabaco que contienen dichas variantes.**

Clonación en pBin19 de FMP22t (SEQ ID NO: 3), FMP27t-h (SEQ ID NO: 22), FMP23t (SEQ ID NO: 17) y FMP23t-h (SEQ ID NO: 31)

Se diseñaron un gen con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas que codifican la proteína HPPD FMP22, y denominado FMP22t-h (SEQ ID NO: 22) y el mismo gen con unas secuencias adicionales que codifican una OTP y con una marca de HIS junto a su extremidad 5' denominado FMP22t (SEQ ID NO: 3). La secuencia correspondiente al gen FMP22t-h fue clonada usando las enzimas de restricción NcoI y XbaI en el vector pRT100-OTP previamente descrito, que contiene un promotor y un terminador de CaMV35S. El vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP22t-h. La secuencia correspondiente al FMP22t fue clonada en el vector pRT100 previamente descrito, usando las enzimas de restricción XhoI y XbaI, y el vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP22t. Los fragmentos correspondientes a PromCaMV35S-OTP-FMP22t-h-TerCaMV35S y PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP22t-TerCaMV35S fueron subclonados en el vector pBIN19 (que se ha descrito más arriba) usando la enzima de restricción SbfI. Los vectores binarios fueron denominados respectivamente pBin19-FMP22t-h (Fig.5C) y pBin19-FMP22t (Fig.5B) y se pueden usar, por ejemplo, para transformar plantas dicotiledóneas, tales como las plantas de tabaco que se han descrito más arriba. Se ensayan luego unas plantas transformantes que han crecido suficientemente, en cuanto a su tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD, tales como tembotriona. El desarrollo de los síntomas observados como respuesta al tratamiento con herbicidas se evalúa y se compara con la respuesta de plantas del tipo silvestre en las mismas condiciones.

Se diseñaron un gen con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas que codifican la proteína HPPD FMP23, y denominado FMP23t-h (SEQ ID NO: 31) y el mismo gen con unas secuencias adicionales que codifican una OTP y con una marca de HIS junto a su extremidad 5' denominado FMP23t (SEQ ID NO: 17). La secuencia correspondiente al gen FMP23t-h fue clonada usando las enzimas de restricción NcoI y XbaI en el vector pRT100-OTP previamente descrito, que contiene un promotor y un terminador de CaMV35S. El vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP23t-h. La secuencia correspondiente al FMP23t fue clonada en el vector pRT100 previamente descrito, usando las enzimas de restricción XhoI y XbaI, y el vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP23t. Los fragmentos correspondientes a PromCaMV35S-OTP-FMP23t-h-TerCaMV35S y PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP23t-TerCaMV35S fueron subclonados en el vector pBIN19 (que se ha descrito más arriba) usando la enzima de restricción SbfI. Los vectores binarios fueron denominados respectivamente pBin19-FMP23t-h (Fig.6C) y pBin19-FMP23t (Fig.6B) y se pueden usar, por ejemplo, para transformar plantas

dicotiledóneas, tales como las plantas de tabaco que se han descrito más arriba. Se ensayan luego unas plantas transformantes que han crecido suficientemente, en cuanto a su tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD, tales como tembotriona. El desarrollo de los síntomas observados como respuesta al tratamiento con herbicidas se evalúa y se compara con la respuesta de plantas del tipo silvestre en las mismas condiciones.

5 Transformación de plantas, y selección de T0 con 100 g de IA / TBT

Como un ejemplo, unas plantas enraizadas que contienen el ADN T PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP22t-TerCaMV35S o que contienen el ADN T PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP23t-TerCaMV35S, son transferidas al invernadero en condiciones de crecimiento clásicas. Después de un período de tiempo de aclimatación de dos semanas, las plantas T0 serán tratadas con una mezcla que contiene 100 g de tembotriona/ha, preparada a partir de una formulación WP20 (polvo humectable al 20%) suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. Dos semanas después del tratamiento, serán evaluados los síntomas debidos a la aplicación de los herbicidas. Las plantas son clasificadas en cuatro categorías. Las plantas tratadas evaluadas como "0" tienen el mismo aspecto que las plantas de tabaco sin tratar. Las plantas evaluadas como "1" presentan un fenotipo de blanqueo provisionalmente ligero debido a la aplicación de los herbicidas. Las plantas evaluadas como "2" presentan unos síntomas de blanqueo permanentes desde ligeros hasta fuertes. Finalmente las plantas evaluadas como "3" tienen el mismo aspecto que unas plantas de tabaco de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento. Los resultados se recopilan en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8: Respuesta de plantas de tabaco T0 que expresan la HPPD de FMP22 (o de FMP23).

Gen	Número de transformantes obtenidos en un medio que contiene kanamicina	Categorías correspondientes a la intensidad de los síntomas debidos a la aplicación de tembotriona en una tasa de 100 g de IA / ha sobre las plantas tratadas			
		0	1	2	3
FMP22t	18	4	2	5	3
FMP23t	23	5	4	10	4

20 En conclusión, varias plantas de tabaco que expresan la HPPD de FMP22 o de FMP23 son tolerantes a tembotriona.

**Ejemplo 6: Clonación de los genes FMP22e, FMP22t y FMP22m que codifican la HPPD de FMP22 en un vector para transformar plantas de Zea mays**

FMP22e (SEQ ID NO: 2), FMP22t (SEQ ID NO: 3), FMP22m-h (SEQ ID NO: 23)

25 a- FMP22e en pHoe6/Ac: Gen con un trato con codones optimizado para E. coli, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca de HIS.

El vector pRT100-FMP22e que contiene el gen que codifica la HPPD de FMP22, optimizado para la expresión en E. coli bajo el control del promotor de CaMV35S, fue digerido con la enzima de restricción HindIII. La casete CaMV35S::OTP::FMP22e::CaMV35S-term fue clonada ulteriormente dentro del el vector binario pHoe6/Ac (documento US 6.316.694) previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado. El vector resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP22e.

30 b- FMP22t en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 3): Gen con un trato con codones optimizado para plantas dicotiledóneas, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca de HIS.

35 FMP22t en pRT100. Una versión del gen que codifica la proteína FMP22 optimizado para la expresión en *Nicotiana tabacum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un optimizado péptido de tránsito y una marca de HIS, fue encargada y denominada FMP22t. Corriente arriba con relación a esta secuencia se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI y corriente abajo se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. Los ADN correspondientes al OTP y al FMP22t fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y XbaI, separados mediante apropiadas electroforesis en gel y clonados dentro del vector pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) previamente digerido con las enzimas de restricción XhoI y NcoI. El plásmido pRT100-FMP22t contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El vector resultante se denominó pRT100-FMP22t, y digerido con la enzima de restricción HindIII para separar el ADN correspondiente a la casete CaMV35S::OTP::FMP22t::CaMV35S-term con respecto del resto del vector, con el fin de clonarlo dentro del vector pHoe6/Ac previamente restringido (documento US 6.316.694). El vector resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP22t (Fig.5).

45 c- FMP22m en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 23): Gen con un trato con codones optimizado para plantas monocotiledóneas más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP.

FMP22m en pRT100-OTP (NcoI-XbaI) luego HindIII

La variante del gen optimizado para la expresión en plantas monocotiledóneas que codifican FMP22, denominada FMP22m, fue encargada, y corriente arriba del codón de iniciación se añadió un sitio de restricción de NcoI mientras que corriente abajo del codón de detención se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. La secuencia de ADN correspondiente a FMP22m fue digerida con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, luego separada por electroforesis en gel, y finalmente aislada del gel. El fragmento de ADN aislado fue mezclado con el vector pRT100-OTP (antes mencionado) previamente digerido también con las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP22m, que contiene la casete de expresión CaMV35S::OTP::FMP22m::CaMV35Sterm, que fue aislada usando la enzima de restricción HindIII y luego clonada ulteriormente dentro del vector pHOE6/Ac previamente abierto y desfosforilado, que contiene el gen que codifica la enzima PAT (de Phosphinothricin Acetyl Transferase = fosfinotricina acetil transferasa), que confiere resistencia al herbicida glufosinato (documento US 6.316.694). El plásmido resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP22m (Fig.5F)

Clonación de los genes FMP23e, FMP23t y FMP23m que codifican la HPPD de FMP23 en un vector para transformar plantas de *Zea mays*

FMP23e (SEQ ID NO: 16), FMP23t (SEQ ID NO: 17), FMP23m-h (SEQ ID NO: 32)

a- FMP23e en pHoe6/Ac: Gen con un trato con codones optimizado para *E. coli*, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca de HIS.

El vector pRT100-FMP23e que contiene el gen que codifica la HPPD de FMP23, optimizado para la expresión en *E. coli* bajo el control del promotor de CaMV35S, fue digerido con la enzima de restricción HindIII. La casete CaMV35S::OTP::FMP23e::CaMV35S-term fue clonada ulteriormente dentro del el vector binario pHoe6/Ac (documento US 6.316.694) previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado. El vector resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP23e.

b- FMP23t en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 17): Gen con un trato con codones optimizado para plantas dicotiledóneas, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca de HIS.

FMP23t en pRT100. Una versión del gen que codifica la proteína FMP23 optimizado para la expresión en *Nicotiana tabaccum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un optimizado péptido de tránsito y una marca de HIS, fue encargada y denominada FMP23t. Corriente arriba con relación a esta secuencia se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI y corriente abajo se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. Los ADN correspondientes al OTP y al FMP23t fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y XbaI, separados mediante apropiadas electroforesis en gel y clonados dentro del vector pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) previamente digerido con las enzimas de restricción XhoI y NcoI. El plásmido pRT100 contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El vector resultante se denominó pRT100-FMP23t, y digerido con la enzima de restricción HindIII para separar el ADN correspondiente a la casete CaMV35S::OTP::FMP23t::CaMV35S-term con respecto del resto del vector, con el fin de clonarlo dentro del vector pHoe6/Ac previamente restringido (documento US 6.316.694). El vector resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP23t (Fig.6 (5)).

c- FMP23m en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 32): Gen con un trato con codones optimizado para plantas monocotiledóneas más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP.

FMP23m en pRT100-OTP (NcoI-XbaI) luego HindIII

La variante del gen optimizado para la expresión en plantas monocotiledóneas que codifican FMP23, denominada FMP23m, fue encargada, y corriente arriba del codón de iniciación se añadió un sitio de restricción de NcoI mientras que corriente abajo del codón de detención se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. La secuencia de ADN correspondiente a FMP23m fue digerida con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, luego separada por electroforesis en gel, y finalmente aislada del gel. El fragmento de ADN aislado fue mezclado con el vector pRT100-OTP (antes mencionado) previamente digerido también con las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pRT100-OTP-FMP23m, que contiene la casete de expresión CaMV35S::OTP::FMP23m::CaMV35Sterm, que fue aislada usando la enzima de restricción HindIII y luego clonada ulteriormente dentro del vector pHOE6/Ac previamente abierto y desfosforilado, que contiene el gen que codifica la enzima PAT (de Phosphinothricin Acetyl Transferase = fosfinotricina acetil transferasa), que confiere resistencia al herbicida glufosinato (documento US 6.316.694). El plásmido resultante se denominó pHoe6/Ac/FMP23m (Fig.6F)

Transformación de maíz:

Los plásmidos pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), pHoe6/Ac/FMP22e, pHoe6/Ac/FMP22t, pHoe6/Ac/FMP22m, pHoe6/Ac/FMP23e, pHoe6/Ac/FMP23t y pHoe6/Ac/FMP23m se usan para transformar un cultivo de maíz.

El cultivo de maíz, el aislamiento de los protoplastos, la transformación y la regeneración de plantas de maíz transgénicas fértiles se realizaron de acuerdo con la patente de los EE.UU. 6284945, "Zea mays (L.) con una capacidad de regeneración de las plantas a largo plazo y altamente eficiente que incluye un maíz transgénico fértil



que tiene un gen heterólogo, y su preparación” Los callos transformados fueron seleccionados sobre un medio que contiene fosfotricina. Luego las plantas enraizadas y regeneradas se transfirieron a tierra y se dejaron crecer y producir semillas en el invernadero en condiciones clásicas (28/20°C). Las plantas adultas se hicieron crecer hasta la producción de semillas y las semillas se recogieron para una siembra ulterior, y las plantas suficientemente desarrolladas serán tratadas con los respectivos herbicidas inhibidores de las HPPD.

**Ejemplo 7: Construcción de un vector que contiene el gen FMP22e que ha de ser expresado en plantas de arroz.**

Un vector binario para la transformación de plantas de arroz es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP22e, con un trato con codones optimizado para la expresión en bacterias *E. coli* y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica una marca de HIS, y más corriente arriba se añadió una secuencia que codifica un OTP seguido por el terminador de CaMV35S. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el proceso de transformación (véase la Fig. 5 I). El vector binario se denominó pTMV373. Se construyó similarmente un vector binario similar pero que comprende una casete de expresión que expresa el gen de Arabidopsis que codifica la enzima HPPD.

Un vector binario para la transformación de plantas de arroz es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP23e, con un trato con codones optimizado para la expresión en bacterias *E. coli* y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica una marca de HIS, y más corriente arriba se añadió una secuencia que codifica un OTP seguido por el terminador de CaMV35S. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el proceso de transformación (véase la Fig. 6 I). El vector binario se denominó pTMV374. Se construyó similarmente un vector binario similar pero que comprende una casete de expresión que expresa el gen de Arabidopsis que codifica la enzima HPPD.

**Ejemplo 8: Transformación de plantas de arroz.**

La transformación de arroz se consigue usando unos procedimientos bien conocidos en la especialidad. Dicho brevemente, la transformación de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se realizó usando embriones inmaduros, procedentes del linaje de restaurador 6G4317. Dicho brevemente, unas paniculas procedentes de plantas donantes se cosecharon a los 8-12 días después de la polinización. La lema de la semilla inmadura se eliminó. Las semillas fueron después de ello esterilizadas usando una solución basada en NaOCl y Tween. Las semillas fueron inducidas previamente con ácido acetilsalicílico. Luego unas células de *Agrobacterium tumefaciens* se cultivaron concomitantemente con las semillas previamente inducidas en presencia de acetosiringona de 4 días a 24°C en la oscuridad. Después de esto, los coleóptilos procedentes de embriones se retiraron y se lavaron y luego se colocaron sobre un medio suplementado con fosfotricina durante 3 semanas a 28°C con un ritmo de fotoperiodo de 16 horas. Luego los callos en crecimiento fueron cortados desde los embriones, y transferidos a un medio de nueva aportación que contenía triacilina, fosfotricina, L-prolina y sulfato de cobre (II).

Para cada linaje de callo y por cada concentración de tembotriona, 3 vástagos, y aislados al azar de diferentes trozos de callos, se transfirieron a MS/2 con tembotriona. Por regla general, la transferencia de los vástagos procedentes desde el medio de regeneración al MS/2 se realizó 9 semanas después de que los callos hubieran sido colocados en el medio de regeneración.

Los cultivos fueron incubados a 26,5 °C (fotoperiodo de 16 h) y la evaluación de los síntomas se realizó 2 semanas más tarde.

Unas nuevas hojas en desarrollo de los vástagos transferidos han sido calificadas basándose en el blanqueo y han sido asignadas a categorías en 3 grupos:

- a) sin blanqueo
- b) con blanqueo intermedio
- c) con blanqueo completo

Dentro de la categoría “blanqueo intermedio” se ha hecho una distinción entre unos vástagos que tienen nuevas hojas, que muestran solamente muy pocos síntomas de blanqueo y por lo tanto tienden a formar hojas verdes, y unos vástagos con nuevas hojas casi totalmente blanqueados.

Tabla 9:

Concentración de tembotriona.		AtHPPD	FMP22e	FMP23e
1 µM	N° de vástagos sin blanqueo	27	35	39
	N° de vástagos con blanqueo intermedio	19	9	5
	N° de vástagos completamente blanqueados	12	14	14
5 µM	N° de vástagos sin blanqueo	0	6	3
	N° de vástagos con blanqueo intermedio	2	38	30
	N° de vástagos completamente blanqueados	58	16	25

Respuesta a tembotriona en pruebas en invernadero.

5 Unas plántulas T0 enraizadas (seleccionadas ya sea sobre fosfinotricina a solas o sobre fosfinotricina suplementada con tembotriona) fueron transferidas a tierra en el invernadero. A continuación de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que habían crecido suficientemente se trataron con los diferentes herbicidas inhibidores de las HPPD. Como un ejemplo, las plantas T0 fueron rociadas con tembotriona del tipo de formulación WP20 a razón de 100 g de IA/ha suplementada con sulfato de amonio y con el éster metílico de aceite de colza. Siete días después de la aplicación por rociada, los síntomas debidos a la aplicación del herbicida fueron evaluados y comparados con los síntomas observados en plantas de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento.

10 Las plantas fueron clasificadas en tres categorías basándose en el fenotipo desarrollado como respuesta al herbicida siete días después del tratamiento. La clase I fue definida como las plantas que no presentaron ningún daño, la clase II fue definida como las plantas que presentaron unos ligeros daños provisionales como respuesta al tratamiento con herbicidas (daño: 10-40 %), la clase III fue definida como las plantas que presentaban desde fuertes daños hasta daños similares a los observados con plantas del tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento (daño: 41-100 %).

15 En general, puede observarse que incluso las plantas que contienen solamente un inserto de ADN T ya mostraron un nivel significativo y suficiente de tolerancia a una dosis en el campo expuesta del herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona.

20

Tabla 10:

		Tembotriona, 100 g de IA/ha		
		7 DAT		
Transgén	Número de plantas tratadas	Clase I	Clase II	Clase III
-	20	0	0	20
AtHPPD	23	1	13	9
FMP22e	25	4	19	2
FMP23e	25	8	10	7

En conclusión, puede observarse que las plantas de arroz que expresan las proteínas FMP22 y FMP23 son más tolerantes a la aplicación del herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona que las plantas de arroz del tipo silvestre, o que plantas que expresan la sensible HPPD de Arabidopsis.

25

**Ejemplo 9: Construcción de vectores binarios para la transformación de soja**

Un vector binario para la transformación de soja es construido, por ejemplo, con el promotor CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP22t-h (SEQ ID NO: 22), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codificaba un OTP, y más corriente arriba una secuencia de TEV (acrónimo de Tobacco Etch Virus = virus del grabado del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP22t-h se da en la SEQ ID NO: 23. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para una selección basada en el glufosinato durante el proceso de transformación y una casete de gen 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 5 H). El vector binario se denominó pFCO113.

Un vector binario para la transformación de soja es construido, por ejemplo, con el promotor CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP23t-h (SEQ ID NO: 31), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codificaba un OTP, y más corriente arriba una secuencia de TEV (acrónimo de Tobacco Etch Virus = virus del grabado del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP23t-h se da en la SEQ ID NO: 31. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para una selección basada en el glufosinato durante el proceso de transformación y una casete de gen 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 6 H). El vector binario se denominó pFCO114.

**Ejemplo 10: Establecimiento y selección de plantas T0 de soja**

La transformación de soja se consigue usando procedimientos bien conocidos en la especialidad, como el que se describe usando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de explantes de mitades de semillas de soja, que ha sido descrita por Paz y col. (2006, Plant cell Rep. 25:206). Los transformantes fueron identificados usando isoxaflutol como marcador de selección. Se observó la aparición de vástagos verdes, y se documentó como un indicador de la tolerancia al herbicida isoxaflutol. En lo concerniente al FMP22t-h, en total, un 1,8 % de los vástagos transgénicos ensayados mostraron un verdeo normal comparable al de los vástagos de soja de tipo silvestre no tratados con isoxaflutol, mientras que los vástagos de soja de tipo silvestre tratados con la misma cantidad de isoxaflutol fueron blanqueados enteramente. Esto indica que la presencia de la proteína FMP22 hace posible la tolerancia a los herbicidas inhibidores de las HPPD, tales como isoxaflutol. En lo concerniente al FMP23t-h, en total, un 1,9 % de los vástagos transgénicos ensayados mostraron un verdeo normal comparable al de los vástagos de soja de tipo silvestre no tratados con isoxaflutol, mientras que los vástagos de soja de tipo silvestre tratados con la misma cantidad de isoxaflutol fueron blanqueados enteramente. Esto indica que la presencia de la proteína FMP23 hace posible la tolerancia a los herbicidas inhibidores de las HPPD, tales como isoxaflutol.

Unos vástagos verdes tolerantes fueron transferidos a medios de enraizamiento o injertados. Unas plántulas enraizadas fueron transferidas al invernadero después de un período de tiempo de aclimatación.

Las plantas que contenían el transgén fueron luego rociadas con herbicidas inhibidores de las HPPD, tal como por ejemplo con tembotriona en una tasa de 100 g de IA/ha. Diez días después de la aplicación se evaluaron los síntomas debidos a la aplicación de los herbicidas y se compararon con los síntomas observados en plantas de tipo silvestre en las mismas condiciones.

En lo concerniente a la FMP22, un suceso que expresa la proteína HPPD FMP22 ha sido generado a partir de los vástagos verdes citados más arriba y fueron transferidos al invernadero.

A las cuatro semanas después de la aclimatación, es decir las plantas que estaban en una etapa de desarrollo de 3-4 internodos se trataron con 100 g de IA/ha de tembotriona preparada a partir de una formulación WP 20 suplementada con sulfato de amonio y con el éster metílico de aceite de colza. Diez días después de la aplicación, los síntomas causados por la aplicación del herbicida inhibidor de las HPPD fueron evaluados y comparados con los síntomas que se observaron en plantas de soja de tipo silvestre no transgénicas tratadas. Este suceso mostró ligeros síntomas transitorios de blanqueo pero se recuperó a los 14 días después de la aplicación de tembotriona. Estos datos confirman que la FMP22 confiere tolerancia a los herbicidas inhibidores de las HPPD, como la tembotriona, en plantas de soja.

En lo concerniente a la FMP23, seis sucesos que expresan la proteína HPPD FMP23 han sido generados a partir de los vástagos verdes citados más arriba y fueron transferidos al invernadero. A las cuatro semanas después de la aclimatación, es decir las plantas que estaban en una etapa de desarrollo de 3-4 internodos se trataron con 100 g de IA/ha de tembotriona preparada a partir de una formulación WP 20 suplementada con sulfato de amonio y con el éster metílico de aceite de colza. Diez días después de la aplicación, los síntomas causados por la aplicación del herbicida inhibidor de las HPPD fueron evaluados y comparados con los síntomas que se observaron en plantas de soja de tipo silvestre no transgénicas tratadas. Uno de los seis sucesos no muestra ningún fenotipo de blanqueo y tenía el mismo aspecto que las plantas de soja de tipo silvestre no tratadas. Un suceso mostró ligeros síntomas transitorios de blanqueo pero se recuperó a los 14 días después de la aplicación de tembotriona. Los cuatro restantes sucesos exhibieron el mismo blanqueo que la planta de soja de tipo silvestre no transgénica después del

tratamiento con tembotriona. Estos datos confirman que la FMP23 confiere tolerancia a los herbicidas inhibidores de las HPPD, como la tembotriona, en plantas de soja.

**Ejemplo 11: Construcción de vectores binarios para la transformación de algodón.**

5 Un vector binario para la transformación de algodón es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP22t-h (SEQ ID No.22), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y en su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica un OTP, y más corriente arriba se añadió una secuencia de TEV (virus del grabado del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35. La secuencia de nucleótidos del gen FMP22t-h está dada en SEQ ID NO: 22. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también un casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguida por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el proceso de transformación y un casete de gen de 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 5 J).

15 Un vector binario para la transformación de algodón es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP23t-h (SEQ ID No.31), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y en su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica un OTP, y más corriente arriba se añadió una secuencia de TEV (virus del grabado del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35. La secuencia de nucleótidos del gen FMP23t-h está dada en SEQ ID NO: 31. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también un casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguida por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el proceso de transformación y un casete de gen de 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 6 J).

**Ejemplo 12: Establecimiento y selección de plantas T0 de algodón**

25 La transformación de algodón se consigue usando procedimientos bien conocidos en la especialidad, un procedimiento especialmente preferido es el que se describe en la publicación de patente PCT WO 00/71733.

30 Unas plantas regeneradas son transferidas al invernadero. Después de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que han crecido suficientemente son rociadas con herbicidas inhibidores de las HPPD tales como por ejemplo tembotriona a razón de 100 g de IA/ha, suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. A los siete días después de la aplicación por rociada, los síntomas debidos al tratamiento con los herbicidas son evaluados y comparados con los síntomas observados en plantas de algodón de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento en las mismas condiciones.

**Ejemplo 13: Construcción de vectores de transformación binarios para generar plantas tolerantes a cuatro herbicidas con distintas modalidades de acción.**

35 Un vector binario para la transformación de plantas dicotiledóneas es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP22t-h (SEQ ID NO: 22), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia de un OTP, seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP22t-h se da en la SEQ ID NO: 22. Adicionalmente el vector de transformación también contiene un casete de gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para conferir a la planta que expresa el gen una tolerancia a glufosinato, un casete de gen de 2mEPSPS que codifica el EPSPS doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) en que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glufosinato, y un casete de gen de 2mAHAS de Arabidopsis thaliana que codifica una enzima ALS tolerante (acetolactato sintasa, Pro197Ala, Trp574Leu) impulsada por un promotor de CaMV35S con el fin de conferir a la planta que expresa este gen una tolerancia a herbicidas de las clases de sulfonilureas e imidazolinonas (véase la Fig. 5 G)

40 Las casetes de genes son finalmente clonados dentro del vector pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), y el vector final es denominado pHoe6/FMP22t-h/PAT/EPSPS/AHAS, y es usado para transformar plantas dicotiledóneas a partir de procedimientos de la técnica anterior mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Unas plantas T0 son transferidas a la tierra, y después de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que han crecido suficientemente son rociadas sucesivamente con un herbicida de la clase de los agentes inhibidores de las HPPD, luego con glifosato, luego con glufosinato y finalmente con un herbicida de la clase de las sulfonilureas, por ejemplo.

55 Un vector binario para la transformación de plantas dicotiledóneas es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP23t-h (SEQ ID NO: 31), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia de un OTP, seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP23t-h se da en la SEQ ID NO: 31. Adicionalmente el vector de transformación también contiene un casete de gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para conferir a la planta que

expresa el gen una tolerancia a glufosinato, una casete de gen de 2mEPSPS que codifica el EPSPS doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) en que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glufosinato, y una casete de gen de 2mAHAS de Arabidopsis thaliana que codifica una enzima ALS tolerante (acetolactato sintasa, Pro197Ala, Trp574Leu) impulsada por un promotor de CaMV35S con el fin de conferir a la planta que expresa este gen una tolerancia a herbicidas de las clases de sulfonilureas e imidazolinonas (véase la Fig. 5 G)

Las casetes de genes son finalmente clonadas dentro del vector pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), y el vector final es denominado pHoe6/FMP23t-h/PAT/EPSPS/AHAS, y es usado para transformar plantas dicotiledóneas a partir de procedimientos de la técnica anterior mediados por Agrobacterium tumefaciens. Unas plantas T0 son transferidas a tierra, y después de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que han crecido suficientemente son rociadas sucesivamente con un herbicida de la clase de los agentes inhibidores de las HPPD, luego con glifosato, luego con glufosinato y finalmente con un herbicida de la clase de las sulfonilureas, por ejemplo.

#### **Ejemplo 14: Generación de plantas transgénicas que muestran tolerancia a herbicidas con tres distintas modalidades de acción.**

Un vector binario para la transformación de tabaco es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP22t-h (SEQ ID NO: 22) o FMP23t-h (SEQ ID NO: 31), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica un OTP, y más corriente arriba se añadió una secuencia de TEV (virus del grabado del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35. La secuencia de nucleótidos del gen FMP22t-h está dada en SEQ ID NO: 22 y la del FMP23t-h está dada en SEQ ID NO: 31. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguida por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el proceso de transformación y una casete de gen de 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véanse la Fig. 5 H (FMP22t-h) y la Fig. 6 H (FMP23t-h)). Los anteriores vectores se usaron para transformar discos de hojas obtenidos de plantas de *Nicotiana tabacum*, de acuerdo con el Ejemplo 3.

Unas plantas transgénicas de tabaco fueron transferidas al invernadero y tratadas con glifosato en una tasa de 1.121 g de IA/ha. Se produjeron semillas a partir de dichas plantas de tabaco tolerantes y se cosecharon. Estas semillas se colocaron sobre tierra para germinar en el invernadero. De tres a cuatro semanas más tarde, 50 plántulas por suceso se transfirieron a macetas individuales. Dos semanas más tarde, unas plantas con un tamaño de 4-6 cm se rocían, respectivamente, con:

- glufosinato-amonio 1.000 g de IA/ha
- glifosato 1.121 g de IA/ha
- tembotriona 100 g de IA/ha, o
- tembotriona + glifosato 100 g de IA/ha + 1.121 g de IA/ha

Después de nueve días, se evalúan los síntomas causados por las respectivas aplicaciones de herbicidas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience AG

<120> Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD

<130> BCS 09-1041-PCT

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1206

<212> ADN

<213> *Rhodococcus sp.*

<400> 1

ES 2 659 085 T3

atgacgatcg agcagaactct caccgacaag gaacgcctgg caggtctcga cctcggccag 60  
ctcgagcagt tggtcgggct cgtcaggtac gacggcacc cgcacccgtt cccggtcagc 120  
ggctgggatg ccgctcgtctg ggtggtcggc aacgccacc agaccgcca ctacttccag 180  
tccgcgttcg ggatgacct cgtcgcctac tccggacca ccaccggcaa ccgcgaccac 240  
cacagcttcg tctcgaatc cggggccgtc cgcttcgtca tcaaagggc cgtgaaccgc 300  
gacagcccc tgatcgacca ccaccgacc cacggcgacg ggcctcgtcga catcgccctc 360  
gccgtccccg acgtcgaaa gtgcatcgcc cacgcccgcg cccaggggcg caccgtcctc 420  
gacgaacccc acgacgtgac cgacgaccac ggcaccgtcc gcctcggcgc gatcgccacc 480  
tacggcgaca cccgccacac cctcgtcgc acgagccact acaccggccc ctacctgcc 540  
ggctacaccg cccgcacctc cggccacacc aaacgggacg gggcacccaa gcgcctgttc 600  
caggccctcg accacgtcgt cggcaacgtc gaactcggca agatggacca ctgggtcgc 660  
ttctacaacc gggctcatggg ctttacgaac atggccgagt tcgtcggcga ggacatcgcc 720  
accgactact ccgcgtgat gagcaaggtc gtctccaacg gcaaccaccg ggtcaagttc 780  
cccctcaacg aaccgcctc cgccaagaaa cgctcgcaga tcgacgaata cctcgacttc 840  
taccgggcc cccggccca gcaacctggc ctggccacca atgacatect caccgcgtc 900  
gaccagctga ccgccgagg cgtcaggttc ctggccacc cgcactccta ctacgaggac 960  
cccgaactgc gggcccggat cggcaacgtc cgcgccccca tcgccgaact gcagaaacgc 1020  
ggcatcctcg tcgaccgca cgaagacggc tacctgctgc agatcttcac caaacctc 1080  
gtcgaccggc ccaccgtgtt cttcgaactc atcgaacgcc acggctcctt cggcttcggc 1140  
atcggcaact tcaaagcctt cttcggggc atcgaacgcg aacaagccgc ccgcgaaac 1200  
ttctga 1206

<210> 2  
<211> 1227  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 optimizada para *E. coli*, que contiene además en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina

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

<220>  
20 <221> misc\_feature  
<222> (7)..(24)  
<223> Secuencia que codifica una marca de HIS que contiene 6 His

<400> 2

ES 2 659 085 T3

```

atggcgcacc accaccatca ccataccatt gaacaaaccc ttacggataa ggaacgtctc      60
gcaggtctcg atctggggca actggaacag ctggttggcc tggttgaata tgacggtact      120
cgcgatccgt ttcccgtatc tggctgggat gcggtcgtat ggggtggtggg caatgccacg      180
cagactgccc actactttca gagtgcgttt ggcattgacct tggtagccta tagtggaccg      240
actactggga atcgcgacca tcacagcttc gtccctggaat cgggtgctgt gcgctttgtc      300
atcaaagggg ctgtgaaccc ggattccccg ttaattgacc accatcgcac acatggcgac      360
ggagtcggtg acatcgcact ggcagtacct gatgtggata agtgcattgc acatgcccgg      420
gcacaaggcg cgaccgttct ggacgaaccg catgatgtca cggatgatca tggtagcgtg      480
cgcttagctg cgattgcaac atatggtgac acccgtcata ctctggtgga ccgctcacac      540
tatacaggtc cgtatttacc gggttatacg gctcgtacct caggtcacac caaacgtgat      600
ggtgcaccga aacgcttgtt tcaggccctg gatcatgttg ttgggaacgt tgagcttggc      660
aaaatggacc attgggtcga tttctacaat cgcgtcatgg gctttacgaa catggccgag      720
tttgtaggtg aagatatagc gaccgactac tctgcgttga tgtccaaagt cgtgagcaat      780
gggaatcacc gcgtgaaatt tccactgaat gaacccgctc ttgccaagaa acggagccag      840
atcgatgagt atctggactt ttaccgtggc ccagggtgcc aacatctggc gctggctacc      900
aacgatatcc tgacggccgt ggaccagctc acggcgggaag gcgttgagtt ccttgcgacc      960
ccggattcgt actacgaaga tccggaactg cgtgcgcgca ttggcaacgt tcgtgcgcct     1020
attgccgaac tgcagaaacg cggtatctta gtggaccgtg atgaggatgg ctatctgctg     1080
cagatcttta ccaaacctct ggtggatcgc ccaacagtgt tctttgagct catcgaacgt     1140
catggcagct taggattcgg cattggcaac ttcaaagcct tgttcgaagc gattgagcgt     1200
gaacaagcgg cacgcggaaa cttctaa                                     1227

```

- 5 <210> 3
- <211> 1602
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para *Nicotiana tabaccum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca de HIS
  
- 15 <220>
- <221> Péptido de tránsito
- <222> (1)..(375)
- <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos
  
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (376)..(378)
- <223> Secuencia que codifica una Met

ES 2 659 085 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (379)..(381)  
 <223> Secuencia que codifica una Ala

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (382)..(399)  
 <223> Secuencia que codifica una marca de His constituida por 6 His

10

<400> 3

```

atggcttcta tttcttcttc tgtggctact gtttctagga ctgctccagc tcaagctaata 60
atggtggctc cattcacagg cttgaaatcc aatgctgctt tcccaactac taagaagget 120
aacgatttct ctactctccc atctaattgtt ggaagggttc agtgtatgca agtttggcca 180
gcttacggaa ataagaagtt cgagactcct tcttaccttc caccactttc tatggctcca 240
actgtgatga tggcttcttc tgctactgct gttgctccat tccaaggatt gaagtctact 300
gcttctttgc cagttgctag aaggctcatct cgttctcttg gaaacgtttc taacgggtga 360
aggattagat gtgctatggc tcatcatcat caccatcaca ctattgagca gactctcact 420
gataaggaaa ggcttgctgg acttgatcct ggacaacttg agcagcttgt tggacttgtt 480
gagtacgatg gaactaggga tccatttcca gtttctggat gggatgctgt tgtttgggtt 540
gtgggaaatg ctactcaaac tgctcactac ttccaatctg ctttcggaat gactcttgtg 600
gcttactctg gaccaactac tggaaatagg gatcaccact ctttcgttct tgaatctggt 660
gctgtgatg tctgtattaa ggggtgctgtg aaccagatt ctccacttat tgatcaccat 720
aggactcatg gtgatgggtg tgtggatatt gctcttctg ttccagatgt ggataagtgc 780
attgctcatg ctagggtcctc aggtgctact gttcttgatg agccacacga tgttactgat 840
gatcacggaa ctgttaggct tgctgctatt gctacttacg gtgatacaag gcacactctt 900
gttgataggt cactactacac tggaccatat cttccaggat aactgctag aacttccgga 960
cacactaaga gggatggtgc tccaaagaga cttttccagg ctcttgatca cgttggttga 1020
aacgttgagc ttgaaagat ggatcactgg gtggacttct acaatagggt gatgggatc 1080
actaatatgg ctgagtttgt gggagaagat atcgctactg attactctgc tctcatgtct 1140

aaggttgtgt ctaatggaaa ccacagggtg aagttcccac ttaatgaacc agctctcgtc 1200
aaaaaaaggt cacagatcga tgagtacctc gatctttatc gtggaccagg tgcacaacat 1260
cttctctcgc ctactaacga tattctcact gctgtggatc aacttactgc tgaggggtgt 1320
gagtttcttg ctactccaga ttcctattac gaggatccag aacttagagc taggatcggg 1380
aatgttaggg ctccaatcgc tgaacttcag aagaggggaa ttctcgttga tagagatgag 1440
gatggatacc ttctccagat cttcactaag ccattggttg ataggccaac tgttttcttc 1500
gagcttattg agaggcatgg atctcttggg ttcggaatcg gaaacttcaa ggctcttttc 1560
gaggctattg agagagaaca agctgctagg ggaatttct ga 1602
    
```

15

<210> 4  
 <211> 401  
 <212> PRT



ES 2 659 085 T3

<213> *Rhodococcus sp.*

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala His Ala Arg Ala Gln Gly Ala Thr Val Leu Asp Glu Pro His
          130          135          140

Asp Val Thr Asp Asp His Gly Thr Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr
145          150          155          160

```

ES 2 659 085 T3

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

<210> 5  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 659 085 T3

<220>  
 <223> Proteina codificada por la SEQ ID No. 2

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ala

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> Marca de His constituida por 6 His

15 <400> 5

```

Met Ala His His His His His His Thr Ile Glu Gln Thr Leu Thr Asp
1          5          10          15

Lys Glu Arg Leu Ala Gly Leu Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Leu Val
          20          25          30

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

Trp Asp Ala Val Val Trp Val Val Gly Asn Ala Thr Gln Thr Ala His
          50          55          60

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

Thr Thr Gly Asn Arg Asp His His Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ala
          85          90          95

Val Arg Phe Val Ile Lys Gly Ala Val Asn Pro Asp Ser Pro Leu Ile
          100          105          110

Asp His His Arg Thr His Gly Asp Gly Val Val Asp Ile Ala Leu Ala
          115          120          125

Val Pro Asp Val Asp Lys Cys Ile Ala His Ala Arg Ala Gln Gly Ala
          130          135          140

Thr Val Leu Asp Glu Pro His Asp Val Thr Asp Asp His Gly Thr Val
145          150          155          160

Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Gly Asp Thr Arg His Thr Leu Val
          165          170          175

Asp Arg Ser His Tyr Thr Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Thr Ala Arg
    
```

ES 2 659 085 T3

180 185 190  
 Thr Ser Gly His Thr Lys Arg Asp Gly Ala Pro Lys Arg Leu Phe Gln  
 195 200 205  
 Ala Leu Asp His Val Val Gly Asn Val Glu Leu Gly Lys Met Asp His  
 210 215 220  
 Trp Val Asp Phe Tyr Asn Arg Val Met Gly Phe Thr Asn Met Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Phe Val Gly Glu Asp Ile Ala Thr Asp Tyr Ser Ala Leu Met Ser Lys  
 245 250 255  
 Val Val Ser Asn Gly Asn His Arg Val Lys Phe Pro Leu Asn Glu Pro  
 260 265 270  
 Ala Leu Ala Lys Lys Arg Ser Gln Ile Asp Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr  
 275 280 285  
 Arg Gly Pro Gly Ala Gln His Leu Ala Leu Ala Thr Asn Asp Ile Leu  
 290 295 300  
 Thr Ala Val Asp Gln Leu Thr Ala Glu Gly Val Glu Phe Leu Ala Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Ser Tyr Tyr Glu Asp Pro Glu Leu Arg Ala Arg Ile Gly Asn  
 325 330 335  
 Val Arg Ala Pro Ile Ala Glu Leu Gln Lys Arg Gly Ile Leu Val Asp  
 340 345 350  
 Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Leu Val  
 355 360 365  
 Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Leu Ile Glu Arg His Gly Ser Leu  
 370 375 380  
 Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg  
 385 390 395 400  
 Glu Gln Ala Ala Arg Gly Asn Phe  
 405

<210> 6  
 <211> 526  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 659 085 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041 (SEQ ID No. 4) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (WO 2009/144079))

5

<220>

<221> TRÁNSITO

<222> (1)..(125)

<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

10

<400> 6

ES 2 659 085 T3

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala  
20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser  
35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn  
50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro  
65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly  
85 90 95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Thr Ile  
115 120 125

Glu Gln Thr Leu Thr Asp Lys Glu Arg Leu Ala Gly Leu Asp Leu Gly  
130 135 140

Gln Leu Glu Gln Leu Val Gly Leu Val Glu Tyr Asp Gly Thr Arg Asp  
145 150 155 160

Pro Phe Pro Val Ser Gly Trp Asp Ala Val Val Trp Val Val Gly Asn  
165 170 175

Ala Thr Gln Thr Ala His Tyr Phe Gln Ser Ala Phe Gly Met Thr Leu  
180 185 190

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

Val Leu Glu Ser Gly Ala Val Arg Phe Val Ile Lys Gly Ala Val Asn

ES 2 659 085 T3

210 215 220

Pro Asp Ser Pro Leu Ile Asp His His Arg Thr His Gly Asp Gly Val  
 225 230 235 240

Val Asp Ile Ala Leu Ala Val Pro Asp Val Asp Lys Cys Ile Ala His  
 245 250 255

Ala Arg Ala Gln Gly Ala Thr Val Leu Asp Glu Pro His Asp Val Thr  
 260 265 270

Asp Asp His Gly Thr Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Gly Asp  
 275 280 285

Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Ser His Tyr Thr Gly Pro Tyr Leu  
 290 295 300

Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Thr Ser Gly His Thr Lys Arg Asp Gly Ala  
 305 310 315 320

Pro Lys Arg Leu Phe Gln Ala Leu Asp His Val Val Gly Asn Val Glu  
 325 330 335

Leu Gly Lys Met Asp His Trp Val Asp Phe Tyr Asn Arg Val Met Gly  
 340 345 350

Phe Thr Asn Met Ala Glu Phe Val Gly Glu Asp Ile Ala Thr Asp Tyr  
 355 360 365

Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val Ser Asn Gly Asn His Arg Val Lys  
 370 375 380

Phe Pro Leu Asn Glu Pro Ala Leu Ala Lys Lys Arg Ser Gln Ile Asp  
 385 390 395 400

Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Arg Gly Pro Gly Ala Gln His Leu Ala Leu  
 405 410 415

Ala Thr Asn Asp Ile Leu Thr Ala Val Asp Gln Leu Thr Ala Glu Gly  
 420 425 430

Val Glu Phe Leu Ala Thr Pro Asp Ser Tyr Tyr Glu Asp Pro Glu Leu  
 435 440 445

Arg Ala Arg Ile Gly Asn Val Arg Ala Pro Ile Ala Glu Leu Gln Lys  
 450 455 460

Arg Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Ile  
 465 470 475 480

ES 2 659 085 T3

Phe Thr Lys Pro Leu Val Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Leu Ile  
 485 490 495

Glu Arg His Gly Ser Leu Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Lys Ala Leu  
 500 505 510

Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg Gly Asn Phe  
 515 520 525

- 5 <210> 7
- <211> 533
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Proteina codificada por la SEQ ID No. 3
- 15 <220>
- <221> TRÁNSITO
- <222> (1)..(125)
- <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (126)..(126)
- <223> Met
- 25 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (127)..(127)
- <223> Ala
- 30 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (128)..(133)
- <223> Marca de His constituida por 6 His
- <400> 7

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro  
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala  
 20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser  
 35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn  
 50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro  
 65 70 75 80



ES 2 659 085 T3

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
 100 105 110  
 Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Ala His  
 115 120 125  
 His His His His His Thr Ile Glu Gln Thr Leu Thr Asp Lys Glu Arg  
 130 135 140  
 Leu Ala Gly Leu Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Leu Val Gly Leu Val  
 145 150 155 160  
 Glu Tyr Asp Gly Thr Arg Asp Pro Phe Pro Val Ser Gly Trp Asp Ala  
 165 170 175  
 Val Val Trp Val Val Gly Asn Ala Thr Gln Thr Ala His Tyr Phe Gln  
 180 185 190  
 Ser Ala Phe Gly Met Thr Leu Val Ala Tyr Ser Gly Pro Thr Thr Gly  
 195 200 205  
 Asn Arg Asp His His Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ala Val Arg Phe  
 210 215 220  
 Val Ile Lys Gly Ala Val Asn Pro Asp Ser Pro Leu Ile Asp His His  
 225 230 235 240  
 Arg Thr His Gly Asp Gly Val Val Asp Ile Ala Leu Ala Val Pro Asp  
 245 250 255  
 Val Asp Lys Cys Ile Ala His Ala Arg Ala Gln Gly Ala Thr Val Leu  
 260 265 270  
 Asp Glu Pro His Asp Val Thr Asp Asp His Gly Thr Val Arg Leu Ala  
 275 280 285  
 Ala Ile Ala Thr Tyr Gly Asp Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Ser  
 290 295 300  
 His Tyr Thr Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Thr Ser Gly  
 305 310 315 320  
 His Thr Lys Arg Asp Gly Ala Pro Lys Arg Leu Phe Gln Ala Leu Asp  
 325 330 335  
 His Val Val Gly Asn Val Glu Leu Gly Lys Met Asp His Trp Val Asp

ES 2 659 085 T3

		340						345						350				
Phe	Tyr	Asn	Arg	Val	Met	Gly	Phe	Thr	Asn	Met	Ala	Glu	Phe	Val	Gly			
		355					360					365						
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Val	Ser			
	370					375					380							
Asn	Gly	Asn	His	Arg	Val	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala			
385					390					395					400			
Lys	Lys	Arg	Ser	Gln	Ile	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Pro			
				405					410					415				
Gly	Ala	Gln	His	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Ala	Val			
			420					425					430					
Asp	Gln	Leu	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser			
		435					440					445						
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Glu	Leu	Arg	Ala	Arg	Ile	Gly	Asn	Val	Arg	Ala			
	450					455					460							
Pro	Ile	Ala	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu			
465					470					475					480			
Asp	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Pro			
				485					490						495			
Thr	Val	Phe	Phe	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	His	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly			
			500					505					510					
Ile	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala			
		515					520					525						
Ala	Arg	Gly	Asn	Phe														
		530																

<210> 8  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 8

ES 2 659 085 T3

atgtgtctat cgtagcttc tacagctcaa cgaaacacac agttccgtag cagagtttta 60  
 gtttagcag agttggtgaa atcaatgggc caccaaacg ccgccgtttc agagaatcaa 120  
 aaccatgatg acggcgctgc gtcgtcgccg ggattcaagc tcgtcggatt ttccaagttc 180  
 gtaagaaaga atccaaagtc tgataaattc aaggttaagc gcttccatca catcgagttc 240  
 tggtgcggcg acgcaaccaa cgtcgctcgt cgcttctect ggggtctggg gatgagattc 300  
 tccgccaaat ccgatctttc caccggaaac atggttcacg cctcttacct actcacctcc 360  
 ggtgacctcc gattcctttt cactgctcct tactctccgt ctctctccgc cggagagatt 420  
 aaaccgacaa ccacagcttc tatcccaagt ttgatcacg gctcttgcg ttcttcttc 480  
 tcttcacatg gtctcgggtg tagagccgtt gcgattgaag tagaagacgc agagtcagct 540  
 ttctccatca gtgtagctaa tggcgctatt ccttcgtcgc ctctatcgt cctcaatgaa 600  
 gcagttacga tcgctgaggt taaactatac ggcgatggtg ttctccgata tgtagttac 660  
 aaagcagaag ataccgaaaa atccgaattc ttgccagggc tcgagcgtgt agaggatgag 720  
 tcgtcgttcc cattggatta tggatccgg cggcttgacc acgccgtggg aaacgttctc 780  
 gagcttggtc cggctttaac ttatgtagcg gggttcactg gttttacca attcgagag 840  
 ttcacagcag acgacgttg aaccgccgag agcggtttaa attcagcggc cctggctagc 900  
 aatgatgaaa tggttcttct accgattaac gagccagtgc acggaacaaa gaggaagagt 960  
 cagattcaga cgtatttgga acataacgaa ggcgcagggc tacaacatct ggctctgatg 1020  
 agtgaagaca tattcaggac cctgagagag atgaggaaga ggagcagtat tggaggattc 1080  
 gacttcatgc cttctctcc gcctacttac taccagaatc tcaagaaacg ggtcggcgac 1140  
 gtgctcagcg atgatcagat caaggagtgt gaggaattag ggattcttgt agacagagat 1200  
 gatcaagggg cgttgcttca aatcttcaca aaaccaactag gtgacaggcc gacgatattt 1260  
 atagagataa tccagagagt aggatgcatg atgaaagatg aggaagggaa ggcttaccag 1320  
 agtggaggat gtggtggttt tggcaaagc aatttctctg agctcttcaa gtccattgaa 1380  
 gaatacgaaa agactcttga agccaaacag ttagtgggat ga 1422

<210> 9  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 9

5

ES 2 659 085 T3

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

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe  
20 25 30

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

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

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr

ES 2 659 085 T3

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

ES 2 659 085 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Proteína codificada por la SEQ ID No. 8 más una alanina adicional directamente corriente abajo del aminoácido inicial metionina seguido por 6 aminoácidos histidina

10

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

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> Marca de His constituida por 6 His

20

<400> 10

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

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

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

ES 2 659 085 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp

ES 2 659 085 T3

```

305                               310                               315                               320

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gly
450

```

- 5 <210> 11
- <211> 568
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Proteína de SEQ ID No. 9 más la secuencia de péptido de tránsito situada en el extremo N terminal de la proteína
  
- 15 <220>
- <221> TRÁNSITO
- <222> (1)..(125)
- <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos
  
- <400> 11



ES 2 659 085 T3

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro  
1                   5                   10                   15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala  
          20                   25                   30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser

ES 2 659 085 T3

35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn  
50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro  
65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly  
85 90 95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Gln Asn  
115 120 125

Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp Gly Ala Ala Ser Ser  
130 135 140

Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro  
145 150 155 160

Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp  
165 170 175

Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly  
180 185 190

Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His  
195 200 205

Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg Phe Leu Phe Thr Ala  
210 215 220

Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr  
225 230 235 240

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser  
245 250 255

Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala  
260 265 270

Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser  
275 280 285

Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu  
290 295 300

ES 2 659 085 T3

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser  
 325 330 335  
 Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly  
 340 345 350  
 Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr  
 355 360 365  
 Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala  
 370 375 380  
 Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln  
 405 410 415  
 Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu  
 420 425 430  
 Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys  
 435 440 445  
 Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr  
 450 455 460  
 Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp  
 465 470 475 480  
 Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp  
 485 490 495  
 Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro  
 500 505 510  
 Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp  
 515 520 525  
 Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys  
 530 535 540  
 Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr  
 545 550 555 560  
 Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly  
 565

ES 2 659 085 T3

<210> 12  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Proteína de la SEQ ID No. 10 más la secuencia del péptido de tránsito optimizado directamente, situada en el extremo N terminal de la proteína  
 10  
 <220>  
 <221> TRÁNSITO  
 <222> (1)..(125)  
 <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (126)..(126)  
 <223> Met  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (127)..(127)  
 <223> Ala  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (128)..(133)  
 <223> Marca de His constituida por 6 His  
 30  
 <400> 12

```

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
1           5           10           15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
          20           25           30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
          35           40           45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
50           55           60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
65           70           75           80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly
          85           90           95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser
          100          105          110
  
```

ES 2 659 085 T3

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Ala His  
 115 120 125

His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His  
 130 135 140

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

Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg  
 165 170 175

Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg  
 180 185 190

Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu  
 195 200 205

Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp  
 210 215 220

Leu Arg Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly  
 245 250 255

Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val  
 260 265 270

Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala  
 275 280 285

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

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

Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe  
 325 330 335

Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg  
 340 345 350

Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu  
 355 360 365

ES 2 659 085 T3

Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr  
 370 375 380

Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu  
 385 390 395 400

Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His  
 405 410 415

Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu  
 420 425 430

Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg  
 435 440 445

Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe  
 450 455 460

Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val  
 465 470 475 480

Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly  
 485 490 495

Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr  
 500 505 510

Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg  
 515 520 525

Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly  
 530 535 540

Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser  
 545 550 555 560

Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly  
 565 570 575

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cebador directo Xhol-OTP

10

<400> 13  
 ctcgagatgg cttcgatctc ctctc 26

ES 2 659 085 T3

5  
 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso NcoI-OTP

10  
 <400> 14  
 cccatggcgc accggattct tccgcc 26

15  
 <210> 15  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> *Rhodococcus sp.*

<400> 15

```

atgactaccg cgcacattcg cctgacgccc cgcgaggtgg ccgcacatct ggagaccgac      60
gagctcoggc agttggtcgg gctcgtcgaa cacgaogacg cgtcggatcc gtttcccgtg      120
gtcgcgatgg atgccgtggt gttcgtgtgc ggcaacgcga cgcagagcac gcagtacttc      180
gtctccacgt ggggcatgac cctcgtcgcc tacgcogggc cggagaccgg tcagcgctcg      240
cacaagtcc tegtccctga gtcggggtcg gcaoggttcg tgctgcacgg cgcctcgat      300
ccgaagagcc cgctcgcgga ccatcaccgg gcgcaogggc acggcgtggt ggacctggcg      360
atggaagtcc tcgacgtcga ccgctgcac gcgcatgcac gctcgcaggg ggccaccatt      420
ctcgaggagc cgcgcgacgt cacggatcag ttcggcaccg tcgggctcgc ggcgatcgcc      480
acgtacggca gcacccggca caccatcgtc gaccgaagcc gatacgacgg ccctacctc      540
cccggattcg tcgcgcgctc cagcggtttc gcggcgcgac cgggtaaacc cccgcgattg      600
ttccaggcgc tcgaccacgc cgtcggcaac gtcgagatgg gccggatgga tcaactgggtc      660
cggttctaca accgcgtcat gggcttcacg aacatggccg aattcgtcgg cgacgacatc      720
gccacggagt actcggcgtc gatgtcgaag gtcgtggcga acggcaatca ccgggtgaag      780
ttcccgtcca acgaaccgc ggtgggaaag aagaagtcc agatcgacga atatctcgag      840
ttctacggtg agccgggctg ccagcatctg gccctcgcga cgggagacat cctcgcgacg      900
gtggacgcgt tcggggccga ggtgtcgaa ttctgaaca caccgacgc gtactacgag      960
gacccacagc tcgcgcgccg gatcggcagg gtgcgggtgc cggaggagga actgcagaag     1020
cgcggaatcc tcgtcgaccg cgacgaggac ggatacctcc tgcagatctt caccaaaccg     1080
ctcggcgacc ggccgaccgt gttcttcgag gtgatcgaac ggcacggttc gctcgggttc     1140
ggggcgggta acttccaggc cctgttcgaa tccatcgagc gtgagcaggc ggcgcgcggc     1200
aatctgtga                                     1209
    
```

20  
 <210> 16  
 <211> 1230

ES 2 659 085 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para *E. coli*, que contiene además en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina

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

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 <223> Secuencia que codifica una marca de HIS que contiene 6 His

20 <400> 16

```

atggcccacc atcaccacca ccacaccacg gctgacattc gccttaccoc gcgtgaagtc      60
gctgcacacc tggagaccga tgaactgcgg cagctggtag gtttggttga gcacgatgat      120
gccagtgatc cgtttccggg agtcgcgatg gatgcgggtg tcttcgtttg cggtaatgcc      180
accagtcaa cgcagtactt tgtcagcact tggggcatga cgtagtggc atatgccgga      240
cgggaaactg gacaacgctc ccataaatcg ttcgtcttgg aatctggtag tgcgcggttt      300
gtggtgcatg gcgcccgttga cccgaaatct ccgctggcgg atcatcaccg tgcgcatggt      360
gacgggtgtg tagatcttgc gatggaagtt ctggatgtag accgttgcat agcgcgatgct      420
cgttcacaag gtgccacgat tctcgaagaa ccgcgcgatg tgaccgacca gtttgggacc      480
gtgcgcttag cagctattgc gacatatggt tcgactcgcc ataccatcgt cgatcgcagc      540
cgttatgacg gcccttatct gccaggcttt gttgcccgca gtagcgggtt tgccggcacgt      600
ccgggcaaac ctccgcgctt atttcaggca ctggaccatg cggtaggcaa cgtcgagatg      660
ggccgcgatg atcactgggt gcgcttctat aatcgcgtga tgggcttcac caacatggcg      720
gaattcgtcg gcgatgatat cgcgaccgaa tattccgcc tgatgagcaa agtggtagcg      780
aacgggaacc atcgcgtgaa atttccctc aacgaaccag cggttggcaa gaagaaatcg      840
cagatcgatg agtacctgga gttttatggg gaaccagggt gtcaacatct cgcacttget      900
acaggcgaca ttctggccac agtggatgct ttgcgcgcag aaggggtgga attcctgaat      960
acgcccgatg ctactacga agaccctcaa ctgcgtgcac gtattggccg tgtgcgcgct 1020
ccggttgagg aactgcagaa acgtggcatc ctcggtgacc gcgatgagga tggctacctg 1080
ttacagatct tcacgaaacc gctgggagac cgtccaactg tgttctttga agtgattgaa 1140
cggcatggta gcctgggttt tggggcagga aactttcagg cgctgttcga atccattgag 1200
cgcgaacaag ccgcccgtgg taatctgtaa      1230
  
```



## ES 2 659 085 T3

<210> 17  
<211> 1605  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 optimizada para *Nicotiana tabaccum* que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca de HIS.

10

<220>  
<221> péptido de tránsito  
<222> (1)..(375)  
<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

15

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (376)..(378)  
<223> Secuencia que codifica una Met

20

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (379)..(381)  
<223> Secuencia que codifica una Ala

25

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (382)..(399)  
<223> Secuencia que codifica una marca de His constituida por 6 His

30

<400> 17

ES 2 659 085 T3

atggcttcta tttcttcttc tgtggctact gtttctagga ctgctccagc tcaagctaata 60  
 atggtggctc cattcacagg cttgaaatcc aatgctgctt tcccaactac taagaaggct 120  
 aacgatttct ctactotccc atctaattgtt ggaagggctc agtgtatgca agtttggcca 180  
 gcttacggaa ataagaagtt cgagactctt tcttaccttc caccactttc tatggctcca 240  
 actgtgatga tggcttcttc tgctactgct gttgctccat tccaaggatt gaagtctact 300  
 gcttctttgc cagttgctag aaggctcatct cgttctcttg gaaacgtttc taacggtgga 360  
 aggattagat gtgctatggc tcatcatcat caccatcaca ctactgctga tattaggctt 420  
 actccaaggg aagttgctgc tcatcttgag actgatgagc ttaggcaact tgttggaact 480  
 gttgagcagc atgatgcttc agatccattc ccagttggtg ctatggatgc tgttggtttt 540  
 gtttgccgaa acgctactca atctactcag tacttctgtt ctacttgggg aatgactctt 600  
 gttgcttatg ctggaccaga aactggacag agatctcaca agtctttcgt gcttgaatct 660  
 ggatctgcta gattcgttct tcacgggtgct gttgatccaa agtctccact tgctgatcat 720  
 catagggctc atggtgatgg tgttgtggat cttgctatgg aagtgcttga tgtggataga 780  
 tgcattgctc atgctagatc tcagggtgct actattcttg aagaacctag ggatgtgact 840  
 gatcagtttg gaactgtag gcttctgctt attgctactt acggatccac taggcacact 900  
 attgtggata ggtccagata tgatggacca taccttccag gatttgttgc taggtcatct 960  
 ggatttctg ctagaccagg aaagccacca agacttttcc aagctcttga tcacgctggt 1020  
 ggaaatggtg aaatgggaag gatggatcat tgggtgaggt tctacaatag ggtgatggga 1080  
 ttactaata tggctgagtt cgtgggtgat gatattgcta ctgagtactc tgctottatg 1140  
 tctaaggttg tggctaattg aatcacagg gtgaagttcc cacttaatga accagctgtg 1200  
 ggaaagaaga agtcccagat cgacgagtac cttgagtttt acggtgaacc aggatgtcaa 1260  
 catcttgctc togctactgg tgatattctt gctactgtgg atgctcttag agctgaagggt 1320  
 gttgagttcc tcaatactcc agatgcttac tacgaggatc cacaacttag agctaggatt 1380  
 ggaagagtta gggttccagt tgaggaactt cagaagaggg gaattctcgt tgatagagat 1440  
 gaggatggat accttctcca gatcttcaact aagccacttg gagataggcc aactgttttc 1500  
 ttcgaagtga ttgagaggca tggatctctt ggatttggag caggaaactt ccaggcactt 1560  
 ttcgagtcta ttgagagaga acaagctgct aggggaaactc tttga 1605

5 <210> 18  
 <211> 402  
 <212> PRT  
 <213> *Rhodococcus sp.*  
 10 <400> 18

ES 2 659 085 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Met Glu Val Leu Asp Val Asp Arg  
 115 120 125

Cys Ile Ala His Ala Arg Ser Gln Gly Ala Thr Ile Leu Glu Glu Pro  
 130 135 140

Arg Asp Val Thr Asp Gln Phe Gly Thr Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala  
 145 150 155 160

ES 2 659 085 T3

Thr Tyr Gly Ser Thr Arg His Thr Ile Val Asp Arg Ser Arg Tyr Asp  
 165 170 175

Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Phe Val Ala Arg Ser Ser Gly Phe Ala Ala  
 180 185 190

Arg Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Phe Gln Ala Leu Asp His Ala Val  
 195 200 205

Gly Asn Val Glu Met Gly Arg Met Asp His Trp Val Arg Phe Tyr Asn  
 210 215 220

Arg Val Met Gly Phe Thr Asn Met Ala Glu Phe Val Gly Asp Asp Ile  
 225 230 235 240

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

His Arg Val Lys Phe Pro Leu Asn Glu Pro Ala Val Gly Lys Lys Lys  
 260 265 270

Ser Gln Ile Asp Glu Tyr Leu Glu Phe Tyr Gly Glu Pro Gly Cys Gln  
 275 280 285

His Leu Ala Leu Ala Thr Gly Asp Ile Leu Ala Thr Val Asp Ala Leu  
 290 295 300

Arg Ala Glu Gly Val Glu Phe Leu Asn Thr Pro Asp Ala Tyr Tyr Glu  
 305 310 315 320

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

Glu Leu Gln Lys Arg Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr  
 340 345 350

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

Phe Glu Val Ile Glu Arg His Gly Ser Leu Gly Phe Gly Ala Gly Asn  
 370 375 380

Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg Gly  
 385 390 395 400

Asn Leu

ES 2 659 085 T3

5  
 <210> 19  
 <211> 409  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Proteina codificada por la SEQ ID No. 16

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ala

15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(8)  
 <223> Marca de His constituida por 6 His

20  
 <400> 19

```

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

Pro Arg Glu Val Ala Ala His Leu Glu Thr Asp Glu Leu Arg Gln Leu
          20          25          30

Val Gly Leu Val Glu His Asp Asp Ala Ser Asp Pro Phe Pro Val Val
          35          40          45

Ala Met Asp Ala Val Val Phe Val Cys Gly Asn Ala Thr Gln Ser Thr
          50          55          60

Gln Tyr Phe Val Ser Thr Trp Gly Met Thr Leu Val Ala Tyr Ala Gly
65          70          75          80

Pro Glu Thr Gly Gln Arg Ser His Lys Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly
          85          90          95

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

Ala Asp His His Arg Ala His Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Met
          115          120          125

Glu Val Leu Asp Val Asp Arg Cys Ile Ala His Ala Arg Ser Gln Gly
          130          135          140

Ala Thr Ile Leu Glu Glu Pro Arg Asp Val Thr Asp Gln Phe Gly Thr
145          150          155          160

Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Gly Ser Thr Arg His Thr Ile
          165          170          175
  
```

ES 2 659 085 T3

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

Arg Ser Ser Gly Phe Ala Ala Arg Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Phe  
 195 200 205

Gln Ala Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Glu Met Gly Arg Met Asp  
 210 215 220

His Trp Val Arg Phe Tyr Asn Arg Val Met Gly Phe Thr Asn Met Ala  
 225 230 235 240

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

Lys Val Val Ala Asn Gly Asn His Arg Val Lys Phe Pro Leu Asn Glu  
 260 265 270

Pro Ala Val Gly Lys Lys Lys Ser Gln Ile Asp Glu Tyr Leu Glu Phe  
 275 280 285

Tyr Gly Glu Pro Gly Cys Gln His Leu Ala Leu Ala Thr Gly Asp Ile  
 290 295 300

Leu Ala Thr Val Asp Ala Leu Arg Ala Glu Gly Val Glu Phe Leu Asn  
 305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Tyr Tyr Glu Asp Pro Gln Leu Arg Ala Arg Ile Gly  
 325 330 335

Arg Val Arg Val Pro Val Glu Glu Leu Gln Lys Arg Gly Ile Leu Val  
 340 345 350

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

Gly Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Val Ile Glu Arg His Gly Ser  
 370 375 380

Leu Gly Phe Gly Ala Gly Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu  
 385 390 395 400

Arg Glu Gln Ala Ala Arg Gly Asn Leu  
 405

<210> 20  
 <211> 527

## ES 2 659 085 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040 (SEQ ID No. 18) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (WO 2009/144079))

<220>

<221> TRÁNSITO

10

<222> (1)..(125)

<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

<400> 20

ES 2 659 085 T3

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala  
20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser  
35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn  
50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro  
65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly  
85 90 95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Thr Thr  
115 120 125

Ala Asp Ile Arg Leu Thr Pro Arg Glu Val Ala Ala His Leu Glu Thr  
130 135 140

Asp Glu Leu Arg Gln Leu Val Gly Leu Val Glu His Asp Asp Ala Ser  
145 150 155 160

Asp Pro Phe Pro Val Val Ala Met Asp Ala Val Val Phe Val Cys Gly  
165 170 175

Asn Ala Thr Gln Ser Thr Gln Tyr Phe Val Ser Thr Trp Gly Met Thr  
180 185 190

Leu Val Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Thr Gly Gln Arg Ser His Lys Ser  
195 200 205



ES 2 659 085 T3

Phe Val Leu Glu Ser Gly Ser Ala Arg Phe Val Leu His Gly Ala Val  
 210 215 220  
 Asp Pro Lys Ser Pro Leu Ala Asp His His Arg Ala His Gly Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Val Val Asp Leu Ala Met Glu Val Leu Asp Val Asp Arg Cys Ile Ala  
 245 250 255  
 His Ala Arg Ser Gln Gly Ala Thr Ile Leu Glu Glu Pro Arg Asp Val  
 260 265 270  
 Thr Asp Gln Phe Gly Thr Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Gly  
 275 280 285  
 Ser Thr Arg His Thr Ile Val Asp Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Pro Tyr  
 290 295 300  
 Leu Pro Gly Phe Val Ala Arg Ser Ser Gly Phe Ala Ala Arg Pro Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Pro Arg Leu Phe Gln Ala Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val  
 325 330 335  
 Glu Met Gly Arg Met Asp His Trp Val Arg Phe Tyr Asn Arg Val Met  
 340 345 350  
 Gly Phe Thr Asn Met Ala Glu Phe Val Gly Asp Asp Ile Ala Thr Glu  
 355 360 365  
 Tyr Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val Ala Asn Gly Asn His Arg Val  
 370 375 380  
 Lys Phe Pro Leu Asn Glu Pro Ala Val Gly Lys Lys Lys Ser Gln Ile  
 385 390 395 400  
 Asp Glu Tyr Leu Glu Phe Tyr Gly Glu Pro Gly Cys Gln His Leu Ala  
 405 410 415  
 Leu Ala Thr Gly Asp Ile Leu Ala Thr Val Asp Ala Leu Arg Ala Glu  
 420 425 430  
 Gly Val Glu Phe Leu Asn Thr Pro Asp Ala Tyr Tyr Glu Asp Pro Gln  
 435 440 445  
 Leu Arg Ala Arg Ile Gly Arg Val Arg Val Pro Val Glu Glu Leu Gln  
 450 455 460  
 Lys Arg Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln

ES 2 659 085 T3

```

465              470              475              480

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Val
              485              490              495

Ile Glu Arg His Gly Ser Leu Gly Phe Gly Ala Gly Asn Phe Gln Ala
              500              505              510

Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg Gly Asn Leu
              515              520              525

```

```

5 <210> 21
  <211> 534
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <223> Proteina codificada por la SEQ ID No. 17

15 <220>
  <221> TRÁNSITO
  <222> (1)..(125)
  <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

20 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (126)..(126)
  <223> Met

25 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (127)..(127)
  <223> Ala

30 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (128)..(133)
  <223> Marca de His constituida por 6 His

  <400> 21

```

```

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
1              5              10              15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
              20              25              30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
              35              40              45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
50              55              60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
65              70              75              80

```

ES 2 659 085 T3

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
 100 105 110  
 Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Ala His  
 115 120 125  
 His His His His His Thr Thr Ala Asp Ile Arg Leu Thr Pro Arg Glu  
 130 135 140  
 Val Ala Ala His Leu Glu Thr Asp Glu Leu Arg Gln Leu Val Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Val Glu His Asp Asp Ala Ser Asp Pro Phe Pro Val Val Ala Met Asp  
 165 170 175  
 Ala Val Val Phe Val Cys Gly Asn Ala Thr Gln Ser Thr Gln Tyr Phe  
 180 185 190  
 Val Ser Thr Trp Gly Met Thr Leu Val Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Thr  
 195 200 205  
 Gly Gln Arg Ser His Lys Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ser Ala Arg  
 210 215 220  
 Phe Val Leu His Gly Ala Val Asp Pro Lys Ser Pro Leu Ala Asp His  
 225 230 235 240  
 His Arg Ala His Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Met Glu Val Leu  
 245 250 255  
 Asp Val Asp Arg Cys Ile Ala His Ala Arg Ser Gln Gly Ala Thr Ile  
 260 265 270  
 Leu Glu Glu Pro Arg Asp Val Thr Asp Gln Phe Gly Thr Val Arg Leu  
 275 280 285  
 Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Gly Ser Thr Arg His Thr Ile Val Asp Arg  
 290 295 300  
 Ser Arg Tyr Asp Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Phe Val Ala Arg Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Phe Ala Ala Arg Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Phe Gln Ala Leu  
 325 330 335

ES 2 659 085 T3

Asp His Ala Val Gly Asn Val Glu Met Gly Arg Met Asp His Trp Val  
340 345 350

Arg Phe Tyr Asn Arg Val Met Gly Phe Thr Asn Met Ala Glu Phe Val  
355 360 365

Gly Asp Asp Ile Ala Thr Glu Tyr Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val  
370 375 380

Ala Asn Gly Asn His Arg Val Lys Phe Pro Leu Asn Glu Pro Ala Val  
385 390 395 400

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

Pro Gly Cys Gln His Leu Ala Leu Ala Thr Gly Asp Ile Leu Ala Thr  
420 425 430

Val Asp Ala Leu Arg Ala Glu Gly Val Glu Phe Leu Asn Thr Pro Asp  
435 440 445

Ala Tyr Tyr Glu Asp Pro Gln Leu Arg Ala Arg Ile Gly Arg Val Arg  
450 455 460

Val Pro Val Glu Glu Leu Gln Lys Arg Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp  
465 470 475 480

Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg  
485 490 495

Pro Thr Val Phe Phe Glu Val Ile Glu Arg His Gly Ser Leu Gly Phe  
500 505 510

Gly Ala Gly Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Glu Gln  
515 520 525

Ala Ala Arg Gly Asn Leu  
530

<210> 22  
<211> 1209  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas dicotiledóneas

<400> 22

ES 2 659 085 T3

atggctacta ttgagcagac tctcactgat aaggaaaggc ttgctggact tgatcttggg 60  
caacttgagc agcttggttg acttggtgag tacgatggaa ctagggaccc atttccagtt 120  
tctggatggg atgctggttgt ttgggttgtg ggaaatgcta ctcaaactgc tcaactacttc 180  
caatctgctt tcggaatgac tcttgtggct tactctggac caactactgg aatagggat 240  
caccactctt tcgttcttga atctggtgct gtgagattcg ttattaaggg tgctgtgaac 300  
ccagattctc cacttattga tcaccatagg actcatggtg atggtggttgt ggatattgct 360  
cttgctgttc cagatgtgga taagtgcatt gctcatgcta gggctcaagg tgctactggt 420  
cttgatgagc cacacgatgt tactgatgat cacggaactg ttaggcttgc tgctattgct 480  
acttacggtg atacaaggca cactcttgtt gataggtcac actacactgg accatatctt 540  
ccaggataca ctgctagaac ttccggacac actaagaggg atggtgctcc aaagagactt 600  
ttccaggctc ttgatcacgt tgttggaaac gttgagcttg gaaagatgga tcaactgggtg 660  
gacttctaca atagggtgat gggattcact aatatggctg agtttgtggg agaagatata 720  
gctactgatt actctgctct catgtctaag gttgtgtcta atggaaacca cagggatgaag 780  
ttcccactta atgaaccagc tctcgctaaa aaaaggtcac agatcgatga gtacctcgat 840  
ttttatcgtg gaccaggtgc tcaacatctt gctctcgcta ctaacgatata tctcactgct 900  
gtggatcaac ttactgctga ggggtgtgag tttcttgcta ctccagattc ctattacgag 960  
gaccagaac ttagagctag gatcggaaat gttagggctc caatcgctga acttcagaag 1020  
aggggaatac tcgttgatag agatgaggat ggataccttc tccagatctt cactaagcca 1080  
ttggttgata ggccaactgt tttcttcgag cttattgaga ggcatggatc tcttggattc 1140  
ggaatcgga acttcaaggc tcttttcgag gctattgaga gagaacaagc tgctagggga 1200  
aatttctga 1209

<210> 23  
<211> 1209  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Zea mays*

10

<400> 23

ES 2 659 085 T3

atggcaacga tcgagcagac tctcaccgac aaggaacgcc tggcaggtct cgacctcggc 60  
cagctcgagc agttggtcgg gctcgtcgag tacgacggca cccgcgaccc gtccccggtc 120  
agcggctggg atgccgtcgt ctgggtggtc ggcaacgcc cccagaccgc ccaactacttc 180  
cagtccgcgt tcgggatgac cctcgtcgcc tactccggac ccaccaccgg caaccgcgac 240  
caccacagct tcgtcctcga atccggggcc gtcgcttcg tcatcaaagg cgccgtgaac 300  
ccggacagcc ccctgatcga ccaccaccgc acccaccggc acggcgtcgt cgacatcgcc 360  
ctcgccgtcc ccgacgtcga caagtgcate gcccaccgcc gcgcccaggc cgccaccgtc 420  
ctcgacgaac cccaccgact gaccgacgac cacggcaccg tccgcctcgc cgcgatcgcc 480  
  
acctacggcg acaccgccca caccctcgtc gaccgcagcc actacaccgg ccctacctg 540  
cccggtaca ccgccgcac ctccggccac accaaacggg acggggcacc caagcgctg 600  
ttccaggccc tcgaccacgt cgtcggcaac gtcgaactcg gcaagatgga ccaactgggtc 660  
gacttctaca accgggtcat gggctttacg aacatggccg agttcgtcgg cgaggacatc 720  
gccaccgact actccgcgt gatgagcaag gtcgtctcca acggcaacca ccgggtcaag 780  
ttccccctca acgaaccgc cctcgccaag aaacgctcgc agatcgacga atacctcgac 840  
ttctaccgcg gccccggcgc ccagcaactg gccctggcca ccaatgacat cctcaccgcc 900  
gtcgaccagc tgaccgccga gggcgtcgag ttctggcca cccccgactc ctactacgag 960  
gacccccgaac tgcgggcccg gatcggcaac gtcgcgccc ccatcgccga actgcagaaa 1020  
cgcgcatcc tcgtcgaccg cgacgaagac ggctacctgc tgcagatctt caccaaacc 1080  
ctcgtcgacc ggcccaccgt gttcttcgaa ctcatcgaa gccaccgctc cctcggcttc 1140  
ggcatcggca acttcaaagc cctcttcgag gccatcgaa gcgaacaagc cgccccggga 1200  
  
aacttctga 1209

<210> 24  
<211> 1209  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Brassica napus*

10

<400> 24

ES 2 659 085 T3

```

atggctacaa tcgaacaaac actaacagac aaggagcggc tggcaggact cgatctggga      60
cagctagaac agttggtagg acttgtcgaa taogacggaa cgagggatcc attcccggtg      120
tctggttggg atgctgttgt ctgggttgtg gggaaacgcca cacagactgc gcactatddd      180
caatctgoat tcggaatgac gctagtgcg tacagcggcc caacaacagg caatcgtgat      240
caccattcgt tcgtacttga atcgggagct gtgcgcttcg tgattaaggg cgccggtaac      300
ccagattctc ccctcattga tcaccacagg acacacggag atggagtcgt ggatatcgct      360
ctcgcgggtcc cagatggtga taaatgcatt gctcatgcac gcgcgcaggg cgcaaccgtg      420
ttggaagagc ctcatgatgt taccgatgat caoggtacag tccgtctggc ggctatagca      480
acatacgggtg acaccgcaca cactttggtc gacaggagcc actatacggg gccctattta      540
cctggatata ccgctcgaac ctctggacac actaaaaggg acggagcacc aaagaggcta      600
tttcaggctt tggatcacgt tgtcggtaac gtcgaacttg ggaagatgga ccattgggtg      660
gatttctata accgtgttat gggctttacc aatatggcag agtttgtggg tgaggatata      720
gccactgatt acagcgcctc catgagcaaa gttgtttcga acggtaacca tcgcgttaag      780
tttocattga acgagccagc gctcgcgaag aagcggagcc agattgatga atacttggac      840

ttttacaggg gcccagggtc tcagcatctt gcccttgcca cgaacgacat cttacagct      900
gtcgaaccagt taacggccga gggagttgag ttctctcgcca ccccgacag ttactacgag      960
gaccccgagc taagagcacg gatcgggaac gtccgcgctc cgatcgctga gttacagaag     1020
cgagggatcc tcgtggatag agatgaagat gggtaccttc tccagatddd cacgaagcct     1080
cttgtggaca gaccaacagt ttttttcgaa ttaatagaaa ggcatggatc ctttggcttc     1140
ggtattggaa actttaagc gctctttgag gctatcgaaa gagagcaggc tgctagaggt     1200
aatttctga                                     1209

```

- 5 <210> 25
- <211> 1209
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Beta vulgaris*
  
- <400> 25

ES 2 659 085 T3

```

atggccacta tagaacaac tctcaccgat aaggagcgc tggctggcct agaccttgg      60
caacttgagc aactcgttgg attggttga tatgacggta ctcgtgatcc cttccccgtg     120
agcggctggg atgcagtggg ttgggtgggt ggtaacgcta ctcaaactgc acattatttc     180
caaagtgcct ttggtatgac cctcgttgc taccagtggc caacaactgg aaatagagat     240
caccacagct ttgttttaga atctggtgca gtgcgtttcg tgattaaggg tgctgtaaac     300
cctgatagcc cttaaatoga ccatcatagg actcacggtg atggcgttgt agacatcgca     360
ttagctgttc ctgacgttga taagtgtata gccacgctc gggcacaagg tgcaaccgta     420
ttggatgagc ctcatgatgt tacggatgat catggtagctg ttcgtttggc agctatcgct     480
acttatggtg atacaaggca cacccttgc gacagatcac actacactgg gccgtatctt     540
ccaggatata ctgctagaac atccgggcat actaaaagag atggagctcc aaagaggctc     600
tttcaggctc ttgatcacgt tgtaggaaat gttgagctcg ggaaaatgga ccaactgggta     660
gacttctaca atcgagtgat gggatttact aatatggcag aatttgttgg tgaggatatt     720
gctacagatt atagtgcctt gatgtctaaa gttgtttcta acgggaatca tagagttaag     780
ttccattga acgagcccg cgttgcaaaa aaacgatcac aaattgatga atacctggat     840
ttctaccgtg gccaggtgc tcaacatctt gcattggcaa ctaatgatat tctcacagct     900
gttgatcaat tgacagcaga aggtgttgag ttttagcta ctccagactc ttactacgag     960
gatccagaac ttagagcgcg aatcggtaat gttagggcgc caatgcgaga acttcaaaag    1020
cggggcattc tcgtagatag agatgaggac gggtatctat tacaaatttt tacaaagcca    1080
ttggttgatc gacctactgt attccttgag ctgatcgaga gacacggttc tcttgattt    1140
ggaattggta atttcaaggc tctatttgag gcgattgaac gtgaacaggc agcaaggggg    1200

aatttttag                                                                    1209

```

<210> 26  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Gossypium hirsutum*

10

<400> 26



ES 2 659 085 T3

atggcaacta ttgaacaaac gctcactgac aaggaaaggt tggctggcct tgatcttggg 60  
cagttagagc agcttgtggg gttggtcgaa tacgacggta ctagagaccc ctttcctgtc 120  
tctgggtggg atgctgttgt ttgggtagtg gggaaatgcta ctcaaacagc tcattatttt 180  
caaagcgctt tcggcatgac tctggtggct tattccggtc ctactactgg gaatagagat 240  
caccatagct ttgtcttggg gagcgggtgct gtgagatttg ttatcaaagg tgcagttaac 300  
ccggattcac ctttgatcga ccaccaccgg acacatgggg atgggtgtggg cgacattgct 360  
ttggccgtgc cggacgtaga caagtgcata gctcatgcac gggctcaggg agctaccgtg 420  
cttgacgaac cacatgacgt tactgatgat catgggacag ttaggcttgc agcaatcgcg 480  
acatacgggg atacgcgtca tactcttgtt gataggtctc actatacggg tccgtatctt 540  
cctggatata cagcgaggac ctctggccat accaaacgag acggagcggc taaactctc 600  
tttcaggcac tggaccatgt tgtcggcaat gttgagcttg ggaagatgga tcaactgggtt 660  
gatttctata atcgtgttat gggtttcact aatatggcgg aatttgtagg agaggacatt 720  
gctaccgact attcagcctt aatgagcaag gtggtttcta acggcaacca tcgagttaag 780  
ttccctctta acgagccagc actcgccaaa aaaaggtcac agattgatga gtatctggat 840  
ttctataggg gaccaggtgc acagcatttg gcctagcta ctaacgatat ttgaccgcc 900  
gttgaccagc tgacagctga aggagtggaa ttccctcgaa ctccagattc atactacgaa 960  
gaccctgaac ttcgcgctag aataggaaat gtccgtgcc caattgctga gcttcaaaag 1020  
cgggggattc ttgttgatcg ggatgaggac ggatatctcc ttcaaatatt cacgaagcct 1080  
ctcgttgaca gaccacagt tttcttcgaa cttatcgaaa ggcattggcag cctgggattc 1140  
ggcatagggg atttcaaggc tctttttgaa gctattgaga gggaacaggc cgcacgtggt 1200  
aacttttga 1209

<210> 27

<211> 1209

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Glycine max*

<400> 27

ES 2 659 085 T3

```

atggctacta ttgaacaaac acttacagat aaagaaagac ttgcaggcct cgatttgggt      60
caattagaac aactagtggg cettgtcgag tatgacggaa ccagagaccc tttccctgtg      120
agcggatggg atgctgtggt ctgggttgtg gggaacgcga cccaaccgc tcattatttc      180
caatctgctt toggtatgac actcgtagct tattcagggc caactaccgg aaatagagac      240
catcattcat ttgtgttggg gtctggtgct gtcaggtttg ttattaaggg ggctgttaac      300
ccagactctc cacttataga tcatcacaga acgcacggag acggcgtcgt ggatattgca      360
ctagccgtgc cagacgtcga caaatgcatt gcccatgcaa gggcacaagg cgccacggta      420
ctagatgagc cacacgacgt gacggatgat catggtacag tcagattggc tgctattgcc      480
acttacgggg acaccoggca cactttagtg gatagaagcc attacacagg accatatttg      540
ccgggttaca ctgccgcac ttcaggacat accaaaagag atggcgcccc caagaggctc      600
ttccaagcac ttgatcatgt tgtaggcaac gttgagttgg gtaagatgga tcattggggt      660
gacttttata accgtgttat gggattcacc aatatggccg agtttgttg ggaagatata      720
gctacagact acagtgcttt gatgtcaaag gttgtatcga acggaaatca ccgctgaaa      780
tttcctctta acgaacctgc tttggcaaag aagcgatctc agatagacga gtacttagac      840
ttctatcgag gaccogggtc acagcacttg gcgcttgcca ctaatgatat tcttaccgcc      900
gtcgaccaac tgaactgcaga gggagtcgag ttccttgcta ctcccgacag ctactatgaa      960
gaccagagt taagagctag aatagtaat gtgcgtgcac caatagctga attgcaaaag     1020
aggggaatat tagtagacag agacgaagat ggttacttgc tccaaatctt cactaaacct     1080
ttggtcgaca gaccaacagt gtttttcgaa ttgattgaaa gacacggttc actcgggttc     1140
ggaattggga actttaagc cctattcgag gcaatagaac gtgagcaagc tgcaaggggc     1200
aatttctag                                     1209

```

<210> 28  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Hordeum vulgare*

10

<400> 28

ES 2 659 085 T3

atggcgacaa tcgagcaaac gttgaccgat aaggagagac tcgctggctt ggatttgggc 60  
 cagctagaac agttagtcgg cctggtggag taogatggta ccagagaccc ttccccggtc 120  
 agcggttggg acgcagttgt gtgggtagtc ggcaacgcca cccagaccgc ccattacttc 180  
 cagagcgcct tcggcatgac cctcgtcgca tactccggcc ccaccaccgg aaatagggat 240  
 caccactcat tcgttttga gagcggtgcg gtgaggttcg ttatcaaggg cgccgtcaat 300  
 cccgactcgc ctctcatcga ccaccaccgc acccaaggag atggtgtcgt cgatattgcc 360  
 cttgcgggtgc cggacgtcga taaatgcatc gcccatgccc gcgctcaagg ggccacagtg 420  
 cttgacgagc ctcacgacgt cacggacgac cacggaaccg tgagactggc tgctatcgcc 480  
 acttacgggg acacgagaca taccctcgtg gacaggagcc actacactgg tccgtaoctc 540  
 ccagggata ctgctagaac tagtgggcat actaaacggg atggagcccc caagcgactc 600  
 ttccaggccc ttgaccatgt cgtaggcaac gtcgagctcg ggaagatgga ccaactgggtc 660  
 gacttctaca atcgggtgat gggctttacc aacatggccg agtttgttgg cgaggacatc 720  
 gcaacagact atagtgcct aatgagcaag gtggtgagca acggtaatca tcgcgttaa 780  
 ttcccgtga atgagccggc gctggcgaag aagaggtcac aaatcgacga gtacctggac 840  
 ttctaccggg gaccgggtgc ccagcatctt gcctggcaa caaatgacat actgactgcc 900  
 gttgaccaac tcactgccga aggtgtagag tttctagcca cgccggattc ttactacgaa 960  
 gatccggagc tccgcgcaag gatcggcaat gtgcgcgcac cgattgcaga gtcctcaaaa 1020  
 aggggcatcc tcgtggaccg tgacgaggat gggtaoctgc tgcagatatt cacgaagccc 1080  
 ctcgtcgacc gtccgaccgt ctttttgag ttaatcgaga ggcattgatc actgggattc 1140  
 ggcataggca attttaaagc actgttcgag gccatcgaga gggagcaggc agcgcgtggc 1200  
 aatttctaa 1209

<210> 29  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Oryza sativa*

10

<400> 29

ES 2 659 085 T3

```

atggccacga tagaacagac cctaaccgac aaagagcgct tagcaggact ggatcttggg      60
cagcttgagc agcttgtggg gctcgtggag tacgacggga ccagggatcc tttccggtc      120
tcgggttggg atgcggtggt gtgggtcgtg gggaaatgcaa ctcaaactgc aactatttc      180
cagtcgcctc tcggtatgac cctggtcgtc tacagcggcc cgactacggg caaccgggac      240
caccactctt tcgttcttga gagcggcgcg gtgcgattcg tgattaaggg cgccgtcaat      300
ccggactcac cacttattga tcaccatcga acgcacggag atggcgtggt ggacattgcc      360
ctcgcggtgc cagacgtcga taaatgtata gcgcatgccc gcgcgcaggg agccactgtg      420
ctcgacgagc cccatgatgt caccgacgat catggtactg ttcgtcttgc ggcgatagct      480
acatacgggg atacacgcca cacattagtg gacagatccc actacacggg gccgtacctt      540
ccgggctaca ctgctcgtac atctggtcac acgaagaggg atggagctcc gaagcggcta      600
ttccaagctc tggaccacgt ggttgggaac gtcgagctcg gcaagatgga tcaactgggtg      660
gattttotaca accgggtcat gggattcact aatatggctg agtttgtggg agaggatatt      720
gccaccgatt actccgcact gatgtcgaag gtggtttcca atggcaatca ccgcgtgaaa      780
ttcccactga acgaaccggc gttggcgaag aagcगतogc aaattgatga gtacctgac      840
ttttacaggg gccacggggc ccagcatttg gctcttgcta ccaacgatat tcttacggct      900
gttgaccagc ttaccgctga ggggtgtgag ttcttagcta cacccgactc ctactatgag      960
gatcccgaa cccgggcaag aatcggcaat gtgagagccc ccatagcggg actgcagaag     1020
cgtggaatcc tgggtgatcg cgacgaggac ggctatattgc ttcagatttt cacaaaaccg     1080
cttgtggaca gaccgacggt tttcttcgaa ctgattgaaa gacacggctc cctgggcttc     1140
ggtatagggg actttaagc cctgttcgag gctattgaga gggagcaagc ggcacgcggg     1200
aatttctga                                     1209

```

<210> 30  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro03041, optimizada para plantas de *Triticum aestivum*

10

<400> 30

ES 2 659 085 T3

```

atggcaacta tcgagcaaac cttgacggac aaagagcgcc ttgccggcct tgatcttggg      60
cagctggagc agctggtggg actcgtagaa tacgacggca cacgggaccc attccctgtc      120
tccggctggg acgcggtagt ttgggtcgtg gggaatgcc a ctcaaactgc acattacttc      180
caatccgctg ttgggatgac tttgggtcgcc tattcgggac ccaccaccgg taacagagac      240
catcactcgt ttgtcctaga aagcggcgct gtccgctttg tgatcaaggg tgccgtcaac      300
cccgacagcc cgtgataga ccaccatcgg acgcacggtg acggagtggg cgacattgcg      360
ctggccgtgc cagatgtcga caaatgcac gcgcacgcgc gggcccaggg agccacagta      420
cttgatgagc cacacgatgt gaccgacgac cacgggaccg tgcgcctcgc tgcaatcgct      480
acttatgggg aactagaca caccctggtt gaccggagcc actacacagg cccgtatctc      540
cctggatata ccgcgcggac cagcgggcat acaaacggg acggagcacc caagaggctc      600
ttccaggccc tggaccacgt agtgggcaac gtagagctgg gcaagatgga tcaactgggtc      660
gacttttata accgcgtcat gggttttact aacatggcag agttcgtggg ggaggacatc      720
gctactgact actccgccct catgagcaag gtcgtatcta acggcaacca ccgcgtcaag      780
tttccgctga acgagcctgc gttggcgaag aagcgcctcc agatcgacga gtatctcgac      840
ttctacaggg gcccgggcgc acagcacctt gcgcttgca ctaacgatat cctgacggcg      900
gttgaccaac ttacagccga gggagttgag tttctcgaa ccccgactc ttactacgag      960
gaccagaac tcagggcgag gatcggtaac gtcagggccc caatcgccga gctgcagaag     1020

cgcgggatcc tcgttgacag agacgaggac ggctacttgc ttcaaatttt taccaagccg     1080
ttggtcgata ggccgactgt attcttcgag ctgatcgaga ggcacggctc tttgggattt     1140
ggcataggca actttaaggc ccttttcgag gcaattgaga gagagcaage ggccagggga     1200
aacttctga                                     1209

```

<210> 31  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas dicotiledóneas

10

<400> 31

ES 2 659 085 T3

atggctacta ctgctgatat taggcttact ccaagggaa g ttgctgctca tcttgagact 60  
gatgagctta ggcaacttgt tggacttggt gagcacgatg atgcttcaga tccattccca 120  
gttggtgcta tggatgctgt tgtttttggt tgcggaaacg ctactcaatc tactcagtac 180  
ttcgtgtcta cttggggaat gactcttggt gcttatgctg gaccagaaac tggacagaga 240  
tctcacaagt ctttcgtgct tgaatctgga tctgctagat tcgttcttca cggtgctggt 300  
gatccaaagt ctccacttgc tgatcatcat agggctcatg gtgatggtgt tgtggatctt 360  
gctatggaag tgcttgatgt ggatagatgc attgctcatg ctagatctca gggtgctact 420  
attcttgaag aacctcgtga tgtgactgat cagtttgga ctgttaggct tgctgctatt 480  
gctacttacg gctccactag gcacactatt gtggataggt ccagatatga tggaccatac 540  
cttccaggat ttgttgctag gtcactctgga tttgctgcta gaccaggaaa gccaccaaga 600  
ctttccaag ctcttgatca cgctgttgga aatggtgaaa tgggaaggat ggatcattgg 660  
gtgaggttct acaatagggt gatgggattc actaatatgg ctgagttcgt gggtgatgat 720  
attgctactg agtactctgc tcttatgtct aaggttgtgg ctaatggaaa tcacagggtg 780  
aagttcccac ttaatgaacc agctgtggga aagaagaagt cccagatcga cgagtacctt 840  
gagttttacg gtgaaccagg atgtcaacat cttgctctcg ctactggtga tattcttgct 900  
actgtggatg ctcttagagc tgaagggtgtt gagttcctca atactccaga tgcttactac 960  
gaggaccac aacttagagc taggattgga agagttaggg ttccagttga ggaacttcag 1020  
aagaggggaa tactcgttga tagagatgag gatggatacc ttctccagat cttcactaag 1080  
ccacttgag ataggccaac tgttttcttc gaagtgattg agaggcatgg atctcttggga 1140  
tttgagcag gaaacttcca ggcacttttc gagtctattg agagagaaca agctgctagg 1200  
ggaaatcttt ga 1212

<210> 32  
<211> 1212  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Zea mays*

<400> 32

ES 2 659 085 T3

atggcaacta cgcgcgacat tgcctgacg ccccgcgagg tggccgcaca tctggagacc 60  
 gacgagctcc ggcagttggt cgggctogtc gaacacgacg acgcgtogga tccgtttccc 120  
 gtggtcgga tggatgccgt ggtgttctgt tgcggcaacg cgacgcagag cacgcagtac 180  
 ttogtctcca cgtggggcat gaccctogtc gctacgocg ggccggagac cggtcagcgc 240  
 tcgcacaagt ccttcgtcct cgagtgggg tggcacggt tcgtgctgca cggcgccgtc 300  
 gatccgaaga gcccgctcgc ggaccatcac cgggcgcacg gcgacggcgt ggtggacctg 360  
 gcgatggaag ttctcgacgt cgaccgctgc atcgcgatg cacgctcgca gggggccacc 420  
 attctcgagg agcgcgcga cgtcacgcat cagttcggca ccgtgcggct cgcggcgatc 480  
 gccacgtacg gcagcaccgc gcacaccatc gtcgacgaa gccgatacga cggccoctac 540  
 ctccccggat tgcgcgcgc ctccagcgt ttgcggcgc gaccgggtaa accccgcga 600  
 ttgttccagg cgtcgcacca cgcgctcggc aacgtcgaga tgggcgggat ggatcactgg 660  
 gtcgggttct acaaccgcgt catgggcttc acgaacatgg ccgaattcgt cggcgacgac 720  
 atcgccacgg agtactcggc gctgatgtcg aaggctcgtg cgaacggcaa tcaccgggtg 780  
 aagttccgc tcaacgaacc cgcggtggga aagaagaagt cgcagatcga cgaatatctc 840  
 gagttctacg gtgagccggg ctgccagcat ctggccctcg cgaccggaga catcctcgcg 900  
 acggtggacg cgttgccggc cgagggtgtc gaattcctga acacaccgca cgcgtactac 960  
 gaggaccac agctgcgcgc ccggatcggc agggtgcggg tgcgggtgga ggaactgcag 1020  
 aagcgcggaa tcctcgtcga ccgcgacgag gacggatacc tcctgcagat cttcaccaaa 1080  
 ccgctcggcg accggccgac cgtgttcttc gaggtgatcg aacggcacgg ttcgctcggg 1140  
 ttcggggcgg gtaacttcca ggccctgttc gaatccatcg agcgtgagca ggcggcgcgc 1200  
 ggcaatctgt ga 1212

<210> 33  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Brassica napus*

10

<400> 33

atggcgacca cggctgatat cagattaacg cctagggagg tgcggcaca tttagagacg 60  
 gacgagttga ggcaactcgt cggettagta gaacatgacg acgcctcga cccatttct 120  
 gtggtcgcaa tggatgcggg tgttttcgta tgcggaaatg ctaccagtc taccagtac 180

ES 2 659 085 T3

tttgtttcga cctggggaat gacgttggtt gcgtacgcag gtcctgagac cggacagagg 240  
 agtcacaaat ctttcgtcct ggaaagcggg tccgctagat tcgtgttgca tggagccggt 300  
 gatccgaagt cgccgctcgc cgatcaccaat cgtgctcatg gagatggggg cgtggatcta 360  
 gctatggaag tgttggtatg tgacagatgc attgcgcagc ctcgttctca aggagccacg 420  
 atccttgagg aaccccggga cgttactgat cagttcggta ccgtgcgact agccgctatc 480  
 gctacttacg gtagcaccag acacactata gtggatcgcg ctaggtacga tggtccttac 540  
 ttgccagggg tcggtgcacg tagttcggga tttgccgcga gaccaggaaa accacctcgt 600  
 ctcttccaag cgctcgatca tgcagttggt aacggtgaaa tggggaggat ggatcactgg 660  
 gttcgttttt ataaccgtgt tatgggatcc acaaatatgg ctgagttcgt tggagatgat 720  
 attgcaactg aatattctgc tcttatgtcg aaagtagttg ccaacggtaa tcacagagtc 780  
 aagtttcttc taaacgagcc agccgtagga aagaaaaagt cccagattga tgaatatctt 840  
 gagttttacg gagagcctgg ctgccaacat ttagcccttg cgaccggcga tatecttgcc 900  
 actggtgacg cgcttcgtgc tgagggtggt gaattcttaa acacgcctga cgcttactat 960  
 gaagaccctc aacttcgcgc cagaatcgga cgggtaagag tgccggttga ggagttacaa 1020  
 aagcgcggga tcttggtaga cagggatgag gatggatacc ttcttcagat cttcactaag 1080  
 cctcttggtg atcgacctac ggtttttttt gaagtgatag agaggcatgg atccttagga 1140  
 tttggggctg gcaacttcca ggcacttttc gagtcgattg aaagagagca ggctgctagg 1200  
 ggcaacttgt ga 1212

- <210> 34
  - <211> 1212
  - <212> ADN
  - <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
  - <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Beta vulgaris*
- 10
- <400> 34



ES 2 659 085 T3

atggcgacga ccgctgacat taggttgaca ccacgggagg ttgcagcaca ccttgaaact 60  
gacgagttga gacaattagt cggtttggtg gagcacgacg atgogagtga cccattccca 120  
gtggtcgcaa tggacgcggt cgtttttggt tgcggaaatg cgactcaatc aactcaatac 180  
tttgtatcaa catgggggat gacgtagtgc gcctatgcag gtccagagac cggtcagcgt 240  
tctcataagt cctttgtcct tgagagtggg agcgcctagat tcgtgttgca cggggcagtc 300  
gatccgaaat cacctttggc agaccatcat cgagcacacg gagacggagt agttgatcta 360  
gctatggaag tgctagacgt agatcgatgt attgctcatg ctaggtctca aggggcaact 420  
atactcgaag aaccaagga tgtaaccgac cagtttggga cagttagatt agcagccatc 480  
gcgacatacg gttctactag acacactata gtagataggt ctogatatga tggacottat 540  
  
ttaccggggt ttgtcgcgag atcatctggg ttcgcagcta gaccagggaa accaccaaga 600  
ttgttccaag ccttgatca tgctgtagga aacggtgaaa tgggtaggat ggatcattgg 660  
gttcgctttt acaatcgagt catgggggtt actaatatgg cagaatttgt cggagatgat 720  
atagctactg agtattccgc tttgatgtcc aaggttgtgg caaacggcaa tcacagggtg 780  
aaattcccac tcaacgaacc agccgtgggc aagaaaaaat cccaaattga cgaatactta 840  
gaatthtatg gagaaccagg atgtcagcac ctgcacctcg ctacaggcga tctctcgca 900  
actggtgacg cattacgagc tgaaggagtt gaatthctaa acacgccaga tgcatactat 960  
gaagatcctc agctacgtgc taggataggg cgcgtaggg ttctgttga ggagttgcag 1020  
aaacgtggca tccttgttga ccgtgacgaa gatgggtatc ttctacaaat tttcaccaaa 1080  
cctcttggtg acagggcgac tgtgttcttt gaagtcattg agagacatgg ctctctaggt 1140  
ttcggggcag gtaatthtca ggctctcttt gaatccattg aaagagaaca agctgctaga 1200  
ggaaatcttt aa 1212

<210> 35  
<211> 1212  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Gossypium hirsutum*

10

<400> 35

ES 2 659 085 T3

atggctacga ctgcggatat taggctcacc ccaagggagg ttgctgctca tcttgaaact 60  
gacgaactca ggcagttagt gggccttggt gaacatgacg acgctctga tccgtttccc 120  
gtcgttgcaa tggatgcagt tgtatttggt tgcggcaacg caacacaatc tacacaatat 180  
ttcgtctcca cctggggcat gacattagtg gcttacgccg gacctgagac gggacaaagg 240  
agtcataaga gcttcgtttt ggaatctggc tcagctaggt ttgttttaca cggagctgtg 300  
gaccctaaat cccctttggc agatcatcat cgagcgcgat gagatggcgt tgtggatctg 360  
gctatggagg ttttagatgt tgaccgggtg atagcacacg ctcgtagcca aggagcaact 420  
atattggaag aaccaagaga tgtcaccgac caatttggga cagttaggtt ggcagcaatt 480  
gcaacttatg ggtctaccag gcatactatc gttgatcgct cgcggtacga cggaccttac 540  
ttaccagggt tcgtcgctcg cagtagtggg tttgccgcga ggccgggtaa accacctagg 600  
ttgttccaag cgctcgatca tgccgtaggt aacgtagaga tgggtcgcac ggacctagg 660  
gtcaggtttt ataaccgagt gatgggtttc accaacatgg ccgaatttgt cggtgacgac 720  
atcgctacgg agtatagcgc tttaatgtcg aaggctcgtt ctaatggaaa tcacagagtt 780  
aagtttccat taaatgaacc ggctgtcggg aaaaaaagt cgcaaataga cgaatatttg 840  
gagttttatg gtgagccagg ttgccagcac ctagctttgg ccacaggtga tatactagca 900  
  
actgtggacg ctttaagagc tgagggtgta gagtttttga acacacctga tgcttactat 960  
gaagaccctc agttgagggc tcgtatagga agagttcgtg ttctctgtga agaattgcaa 1020  
aaacgcggca tccttgttga tagggacgag gatggttacc ttcttcagat cttcaciaag 1080  
cctttaggag acaggcctac agttttcttt gaggtgattg agcggcacgg aagtcttggg 1140  
tttgggtgcag ggaactttca agcattgttt gagtcgatcg aaaggaaca ggccgcccagg 1200  
ggaaatcttt aa 1212

<210> 36  
<211> 1212  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Glycine max*

10

<400> 36

ES 2 659 085 T3

```

atggcaacaa ccgctgacat cagactgaca cctagagaag ttgccgctca ccttgaaacg      60
gatgaattgc ggcagctcgt gggccttggt gaacacgacg atgcatccga cccttttccg     120
gttgttgcta tggacgccgt tgtgtttggt tgtggaaatg caacgcaatc aacacagtat     180
ttcgttagta catggggtat gaccttggtt gcttatgcgg gacctgagac agggcaaagg     240
tcacacaagt cgttcgttct tgaatccggc tcagctcggc tcgtgcttca cggcgctggt     300
gaccctaagt cccctctcgc agaccacat agagcacacg gtgatggagt tgtcgacctc     360
gcaatggagg ttttgatgt agacagatgc attgctcatg cacgcagcca gggagctacc     420
attcttgagg aaccagggga tgttacggac cagttcggca ctgtgaggct ggctgcaatt     480
gcaacttatg gcagtaccag acatacaatt gttgatcgct ccagatacga cggccatat      540
ctccctggct tcggtgcaag gagtagtga ttcgccgcac gcccgggaa acctoctagg     600
ttgtttcaag ctctcgacca tgccgtggga aatggtgaaa tgggacgcat ggatcattgg     660
gttagatfff ataaccgtgt tatgggcttt actaacatgg cagagttcgt tggagacgat     720
attgcaactg aatattctgc tctgatgtca aaggttggtg ctaatggaaa tcatagagtt     780
aaattccgc ttaatgaacc agccgtgggt aaaaagaaga gccaaatcga cgaatatctc     840
gaattctatg gggaaaccgg atgccagcac ttagccctcg ctacagggga catcctggct     900
acagtcgacg ctctccgcgc tgagggtggt gaatffffga acaccocaga tgcgtactac     960
gaggaccac aattgcgagc caggattggc agggtgagag ttctgtgga agagcttcaa    1020
aaaagaggaa tcttggtcga ccgggatgaa gacggatact tactgcaaat ttttaccaaa    1080
ccactaggtg ataggccac tgtctttttc gaagtatcg agagacatgg atctcttgga    1140
tttggggcag gaaattcca agcactcttc gagtctatcg aaagagagca agcagctaga    1200
ggtaacctct ga                                                              1212

```

<210> 37  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Hordeum vulgare*

10

<400> 37

ES 2 659 085 T3

```

atggcaacga cggctgacat taggctcaact ccgagagagg tggcggcgca cttggagact      60
gatgagctgc gccagcttgt cggctctggtg gagcacgatg atgcctcoga cccctttcct      120
gtagtggcaa tggacgctgt cgtgtttgtc tgcggcaacg ccaccaatc gaccagtac      180
ttogtaagta catggggtat gacactcgtc gcctatgcag ggcccagagc gggacaaagg      240
tcacacaaat cattcgtctt ggaaagtggc tgggccggtt tcgtcctgca cggagccgtc      300
gatoctaagt ccccgctcgc cgaccatcat cgtgccacg gggacggcgt cgtggatctt      360
gcaatggagg tactggatgt ggatagatgc atcgcgatg cgaggtcaca gggcgcaca      420
atacttgaag agccaaggga cgtgacggac cagtttggga cggtcggcct tgcgccatc      480
gccacctagc gatctactag gcacaccata gtagacagat ctcggtacga cggcccttac      540
ctccctggct tcgtcgccag gtcactctggg ttcgccggccc ggccaggaaa acccccacgg      600
ctattccagg ctctcgacca cgcggtcggc aatgtagaga tggggagaat ggatcactgg      660
gtgoggttct ataacagggc catggggttt acaaatatgg cggagtttgt gggagatgat      720
atgccaccg agtatagtgc tctgatgtcc aaggctcgtc ccaatggaaa ccatcgcgtc      780
aagtttcctt tgaacgagcc ggccgctcggc aagaagaagt ctcagataga cgagtaoctt      840
gaattctacg gtgaaccggc ttgtcaacat cttgcctcgc caaccggtga tattctcgca      900
accgtggatg ccctcagagc ggaggggtgc gagttcctca acaccocgga tgcttactac      960
gaggatcctc aactccgccc taggatcggc cgcgctcagag tgcgggtcga ggagctgcag     1020
aagcgcggga ttctggttga ccgcgacgag gatggctatc tctccagat ttttaccag     1080
cccctcgggg accggccgac ggtgttcttt gaggtcatcg aacgacacgg gtctctcggc     1140
tttggcgagc gtaacttcca agccctgttc gagtcgattg agaggagca ggctgccgc      1200
ggaaatctct aa                                                                1212

```

<210> 38  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Oryza sativa*

10

<400> 38

ES 2 659 085 T3

```

atggccacga cgcgcgacat cagactgacc ccgagagaag tggcagccca tctggagaca      60
gacgagttgc gcccaattagt aggcctggtg gagcacgatg acgcttcaga cccattccccg     120
gtcgtggcaa tggacgccgt tgtcttcgta tgcgggaacg ccacacagtc aacgcagtat      180
tttgtgagta cctgggggat gactctggta gcctatgccg ggccagagac gggacagcgc     240
tcccataagt cgttcgtcct tgagtcaggc tcagccagggt ttgtectcca cggggcggtg     300
gacccaaaat ctccactcgc ggaccaccat cgggcacatg gggatgggggt tgtagacttg     360
gcgatggagg ttcttgatgt cgataggtgt atagcccacg ctcgctcgca aggtgccaca     420
attcttgaag aaccagaga cgtgacggat caattcggca cagtccgcct cgcggccatt     480
gccacttacg gttctactcg tcacaccatt gtggatagat cgcgctacga tggaccgtac     540
ttgccgggct tcgtggcccg ctctccgga tttgccgccc ggccgggtaa gcctccgcgg     600
ctgttccagg cattggatca tgcagttggt aatgtcgaaa tgggaagaat ggaccattgg     660
gtgcgcttct ataatagggt tatgggcttt acgaacatgg cggagttcgt tggggatgac     720
atcgctaccg aatacagcgc cctcatgtcc aaagtgggtg ccaacggtaa tcaccgcgtg     780
aagttccccg tcaacgagcc ggctgtcggg aagaaaaagt cacagataga tgaatacttg     840
gagttctacg gagagccagg gtgccagcac cttgccctcg ccaccggcga tctcctcgca     900
actgtggatg cgcttcgggc cgaggggtgt gagtttttga acacaccgga tgcatattat     960
gaggaccgcc aactacgggc ccgcatcggc cgggtgcgcg ttccggttga ggagctccag    1020
aaacggggca ttctggtgga tcgcgacgaa gacggctatc tgttgcagat tttcacgaag    1080
cctctggggg atcgtccgac tgtattcttc gaggtcatcg aaagacacgg ctcgttaggc    1140
tttggtgcgg gtaatttcca ggcgcttttc gagtcaatcg aaagggagca agcagcgcga    1200
ggtaacttat ga                                                                1212

```

<210> 39  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Rhodococcus* sp. (cepa RHA1), material aislado ro02040, optimizada para plantas de *Triticum aestivum*

10

<400> 39

ES 2 659 085 T3

atggccacaa cgcgcgatat ccgcttgact cctagagagg tcgccgcca cctagagaca	60
gacgagctcc gcccaattggt cggctctgtc gagcatgatg acgcatcgga tcctttcccc	120
gtcgtcgcta tggacgcagt cgtcttctgc tgcggcaacg cgactcaatc aacacaatat	180
ttcgtttcca cgtgggggat gacactggtg gcctacgcag gtccagagac cggtaacgt	240
tcccacaaga gttttgtcct agagagtggc tccgcgcggt tcgtcctcca cggcgcggtc	300
gacccaaagt cccactggc cgatcatcat cgcgcgcgatg gtgacggcgt tgtggacctc	360
gcgatggaag tcctggacgt cgataggtgc atcgcccatg ccagaagcca aggcgcgacc	420
atcctggagg agccaaggga cgtaacagac caattcggga cggtgccgct cgcggcaatc	480
gcaacttaog gcagcacacg ccataccatc gtggacagga gcgctatga tggaccgtac	540
ctgcccgggt tcgtggcccg tagctcgggc ttcgctgcaa gaccggcaa gccccgaga	600
ctcttccagg ctttgaccca tgctgtggc aacgtagaaa tgggacgcat ggaccattgg	660
gtaaggttct ataatagagt gatgggcttt acaaatatgg cggagtttgt cggagatgac	720
attgcgaccg agtacagcgc attgatgtcg aaggttgttg ccaatggcaa ccaccgctg	780
aagtttccac ttaacgagcc ggcagtgggt aaaaagaagt cccagatcga cgagtatctc	840
gaattttaog gcgagcctgg ctgccagcac cttgctctcg cgaccggtga catcttgccg	900
accgtggacg ccttgagagc ggagggcgtc gagtttctga atacgcaga tgcgtactat	960
gaggaccac agctcagagc tcggattggtc agggtcagag tccccgtgga ggagctccaa	1020
aagcgcggga tcctggtgga ccgcgatgaa gacggttact tactgcaaat ctttacgaag	1080
ccgctcggag acaggccaac agtgtttttc gaagtcacg agagacatgg ttcctcggc	1140
ttcggcgcg gtaactttca agcgtcttt gaatcaattg agcgcgaaca ggcagctcgc	1200
gggaacotat aa	1212

## REIVINDICACIONES

1. Un gen quimérico que comprende una secuencia codificante unida operativamente a un promotor expresable en plantas, siendo este último un elemento regulador heterólogo a la secuencia codificante, **caracterizado porque** la secuencia codificante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401; o
- 5 de SEQ ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402 o una proteína HPPD con una identidad de secuencia de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 401 o SEQ ID NO: 18 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 402, que muestra las propiedades de catalizar la conversión de parahidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que es menos sensible a un herbicida inhibidor de las HPPD que la HPPD endógena de la planta hospedadora.
- 10
2. El gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende, corriente abajo de la secuencia codificante de HPPD, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito activo en plantas de modo que dicho gen quimérico codifica una proteína de fusión de un péptido de tránsito/HPPD.
- 15
3. Un vector que comprende por lo menos un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Una célula de planta, parte de planta, planta o semilla, **caracterizada porque** comprende un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20
5. La célula de planta, parte de planta, planta o semilla de la reivindicación 4, que comprende también un gen quimérico que codifica una enzima PDH (pfeñato deshidrogenasa).
6. La célula de planta, parte de planta, planta o semilla de la reivindicación 4 o 5, que comprende además uno o más genes quiméricos que confieren tolerancia a reguladores del crecimiento, preferentemente a 2,4-D o dicamba, y/o herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), la EPSP sintasa (EPSPS) y/o la glutamina sintasa (GS).
- 25
7. Un procedimiento de obtención de una planta tolerante a un herbicida inhibidor de las HPPD, **caracterizado porque** en dicha planta se introduce un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Un procedimiento de obtención de un aceite o una harina, que comprende hacer crecer una planta de acuerdo con la reivindicación 4, 5 o 6, opcionalmente tratando dicha planta con un herbicida inhibidor de las HPPD, cosechar los granos y moler los granos para producir la harina y opcionalmente extraer el aceite.
- 30
9. Uso de una proteína HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 18 o una proteína HPPD con una identidad de secuencias de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 18 y cuya proteína HPPD muestra las propiedades de catalizar la conversión de parahidroxifenilpiruvato en homogentisato y hace que las plantas sean tolerantes a los herbicidas inhibidores de las HPPD.
- 35
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que los herbicidas inhibidores de las HPPD se seleccionan del grupo que consiste en: isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub>fenil)propan-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> fenil)propan-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona, dicetonitrilo y pirazoxifeno.

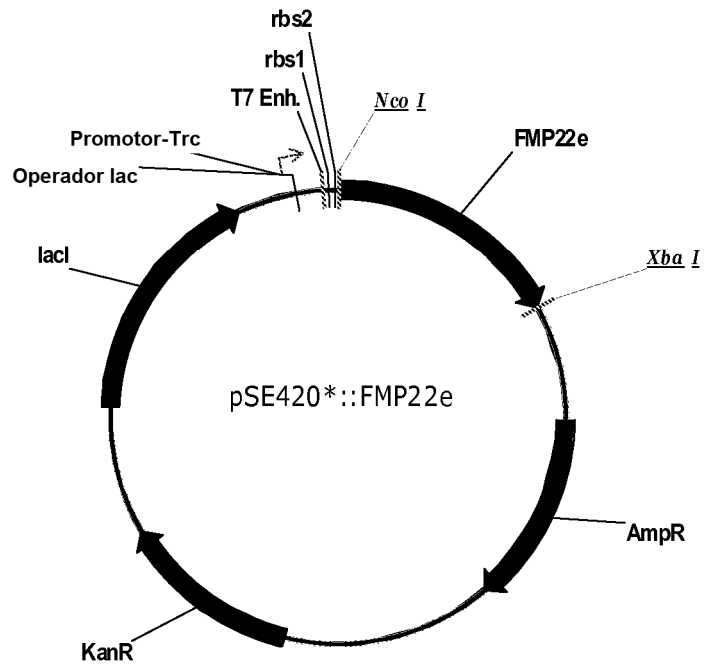


Figura 1: mapa del plásmido pSE420-FMP22e

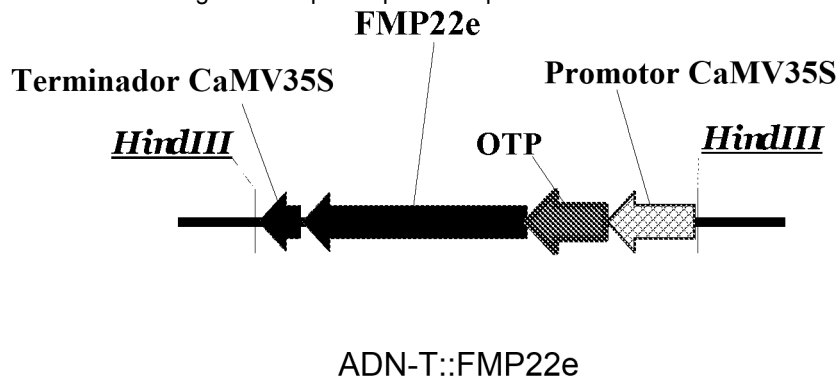


Figura 2: mapa del ADN-T insertado en las plantas de tabaco



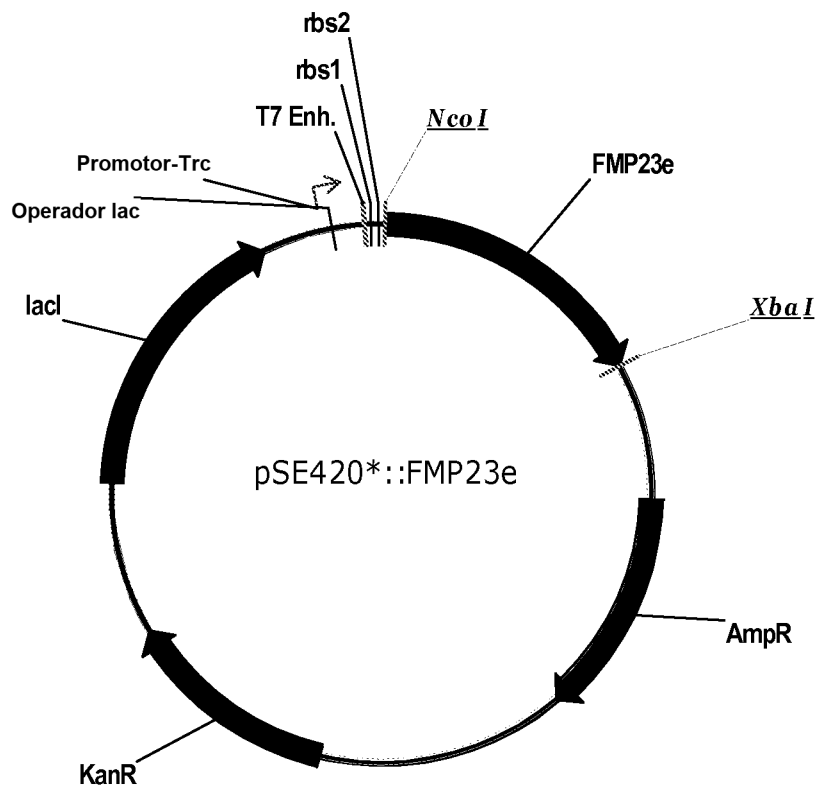
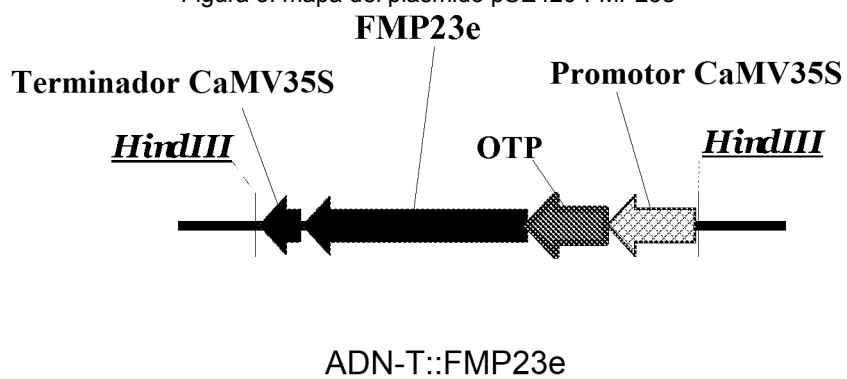


Figura 3: mapa del plásmido pSE420-FMP23e



ADN-T::FMP23e

Figura 4: mapa del ADN-T insertado en las plantas de tabaco

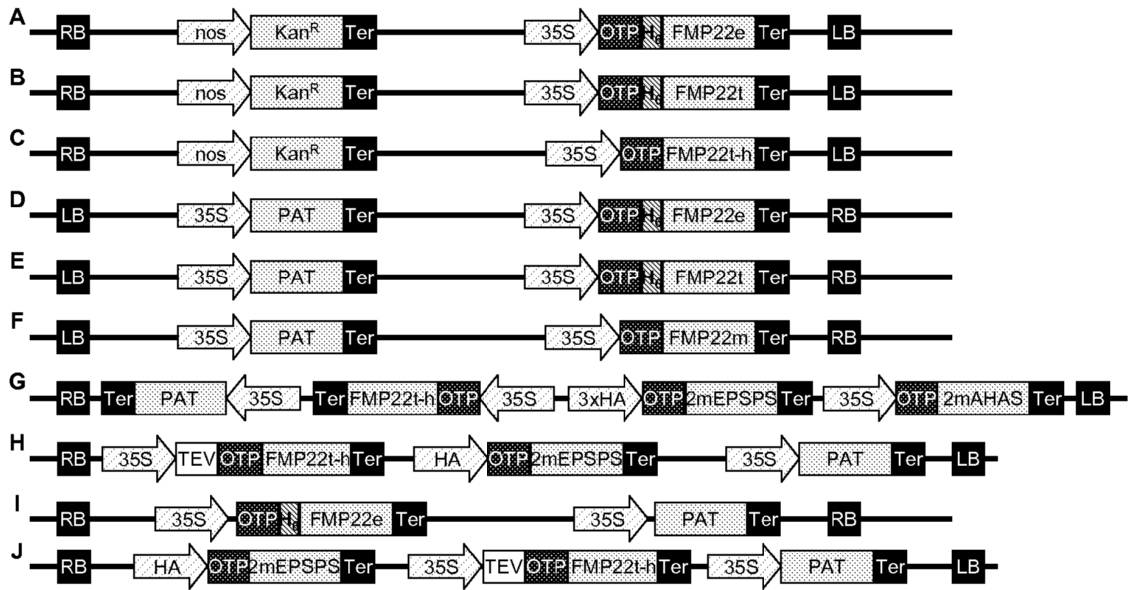


Figura 5: mapa de los diferentes ADN-T insertados en plantas

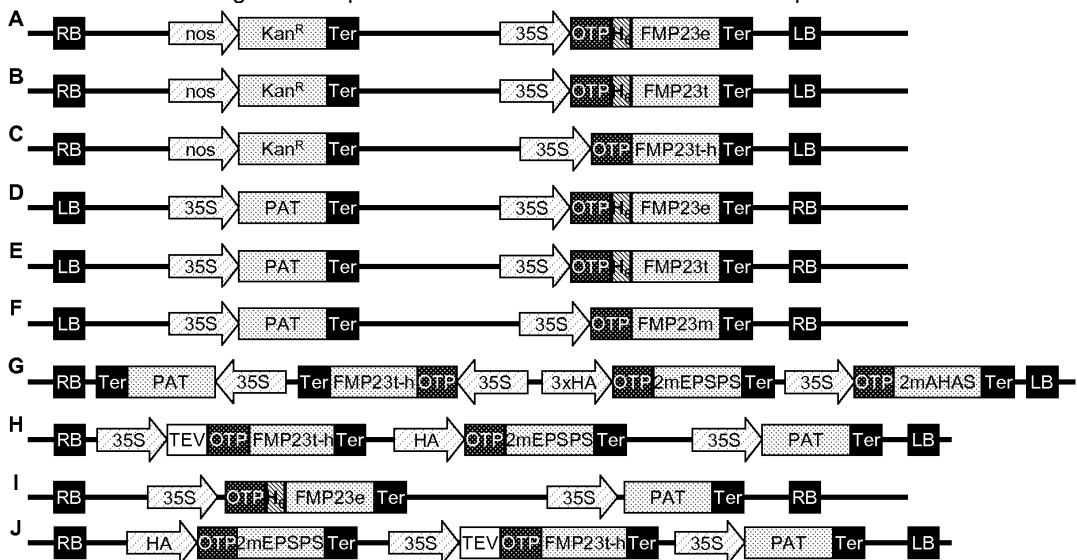


Figura 6: mapa de los diferentes ADN-T insertados en plantas