

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 198**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

A01H 5/10 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010 PCT/EP2010/070567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10795016 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2516631**

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

30 Prioridad:

23.12.2009 EP 09015985

29.12.2009 US 290575 P

10.11.2010 EP 10190657

10.11.2010 US 412087 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2018

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 2 668 198 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 protistas que pertenecen a la familia de los Blepharismidae, así como a las proteínas codificadas por ellas, y 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

10 Las HPPD son unas enzimas que catalizan la reacción en la que un para-hidroxifenilpiruvato (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
15 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 proteína putativa que tenía un dominio de HPPD e incluían la secuencia descrita bajo el número de acceso A8R3H6 que se da en la base de datos
20 UniProtKB/TrEMBL así como bajo el número de acceso BAF91881 que se da en la base de datos de proteínas del NCBI. Sin embargo, para la mayor parte de éstas, incluyendo la secuencia que corresponde al número de acceso A8R3H6/BAF91881, no se ha probado que la proteína derivada de dicha secuencia podría tener una actividad enzimática de HPPD o bien en un ensayo *in vitro* o en un enfoque *in planta*, ni que dicha proteína de HPPD pueda conferir a los herbicidas inhibidores de las HPPD una tolerancia a herbicidas, cuando se exprese en una planta. Se
25 han descrito en el estado de la técnica varias proteínas de HPPD y sus secuencias primarias, en particular las proteínas de HPPD de bacterias tales como *Pseudomonas* (Rüetschi y col., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, documento WO 96/38567), de plantas tales como *Arabidopsis* (documento WO 96/38567, Genbank AF047834), zanahoria (documento WO 96/38567, Genbank 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),
30 *Setaria faberi* (documento WO 02/046387), *Eleusine indica* (documento WO 02/046387), *sorgo* (documento WO 02/046387), *Coccicoides* (Genbank 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.

La mayor parte de las plantas sintetizan tirosina pasando por un arrogenato (Abou-Zeid y col. (1995), Applied Env
35 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), Plants 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 prefenato deshidrogenasa (a la que en lo sucesivo se hace referencia como PDH), que convierte al prefenato en HPP (Lingens y col., (1967) European J. Biochem 1: 363-374;
40 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.

La inhibición de una HPPD conduce a un desacoplamiento de la fotosíntesis, a una deficiencia en cuanto a pigmentos accesorios que cosechan 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.

50 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 demostrado 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;

5 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

10 4) los pirazolinatos, por ejemplo, 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-mesil-4-trifluorometilfenil)-metanona]; pirazofeno [2-[4-(2,4-diclorobenzoil)-1,3-dimetilpirazol-5-iloxi]acetofenona].

15 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.

20 Junto con el intento de evitar la producción de homogentisato, mediada por una HPPD (documento US 6.812.010), se ha realizado una sobreexpresión de la enzima sensible, de manera tal 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).

25 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.

30 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 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.

35 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, confirmando incluso tolerancia a la aplicación después del brote de isoxaflutol (Dufourmantel y col., 2007, *Plant Biotechnol J* 5(1):118-33).

40 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.

45 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 de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* y su uso para obtener plantas que son tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD.

50 En el documento WO 2002/046387, se han identificado varios dominios de proteínas de 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.

55 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 de HPPD obtenible u obtenida a partir de un organismo que pertenece a la familia de las *Blepharismidae*, y variantes o mutantes del mismo, más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece al género *Blepharisma* y variantes o mutantes del mismo, que codifica una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un para-hidroxifenilpiruvato en un homogentisato y cuyas plantas son menos sensibles a agentes inhibidores de las HPPD que unas plantas que no contienen ninguno de dichos transgenes que codifican una HPPD.

Los genes procedentes de *Blepharismidae* que codifican proteínas de HPPD fueron seleccionados como excelentes candidatos tolerantes a agentes inhibidores de las HPPD debido a sus altas divergencias en la composición de aminoácidos en posiciones relevantes para una tolerancia a agentes inhibidores de las HPPD tal como se determina de una manera experimental y estructural en la proteína de HPPD comparada con la sensible proteína de HPPD de *Arabidopsis* HPPD que se tomó como la molécula de referencia sensible a herbicidas inhibidores de las HPPD.

Más especialmente, la presente invención se refiere por lo tanto a la generación de plantas transgénicas que contienen un gen obtenible o obtenido a partir de un organismo que pertenece a la familia de las *Blepharismidae* especialmente a partir del género *Blepharisma*, más especialmente obtenido a partir de la especie *Blepharisma japonicum*, o variantes o mutantes de las mismas, que codifican una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un para-hidroxifenilpiruvato 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. La divulgación se refiere a una proteína de HPPD denominada en el presente documento "la proteína de HPPD de esta invención" o "la proteína de HPPD de *Blepharisma*", que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6 o 7, de manera preferible de la SEQ ID N° 6. La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína de HPPD denominada en el presente documento "la proteína de HPPD de esta invención" o "la proteína de HPPD de *Blepharisma*", que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID N° 6, y en que cualquiera de los aminoácidos desde la posición 185 hasta la posición 382 de la SEQ ID N° 4 puede ser corregido por cualquier aminoácido presente en la naturaleza, de manera preferible puede ser cualquier sustitución conservativa. La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína de HPPD denominada en el presente documento "la proteína de HPPD de esta invención" o "la proteína de HPPD de *Blepharisma*", que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID N° 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 N° 4) dado entre paréntesis, es decir His(183), Ser(226), Asn(241), Gln(265), His(266), Tyr(295), Gln(334), Phe(347), Glu(349), Gly(360), and Asn(363). La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína de HPPD denominada en el presente documento "la proteína de HPPD de esta invención" o "la proteína de HPPD de *Kordia*", que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID N° 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 N° 4	Posición en SEQ ID N° 4	Sustituciones
Val	185	Thr, Cys, Ala, Gly Phe, Ile, Leu, Val, Ala, Gln, Glu, Asp, Gly, Thr, Ser,
Tyr	209	Met, Arg, Lys

(continuación)

Amino- ácido en SEQ ID N° 4	Posición en SEQ ID N° 4	Sustituciones
Trp	210	Ala, Ile, Leu, Ser, Arg, Lys, His, Asp, Glu, Pro, Gly, Asn
Ala	212	Phe, Val, Ile, Leu, Trp, Met, Gln, His
Leu	224	Met, Val
Val	227	Ala, Leu, Met, Ile, Lys, Arg, Gln, Tyr
Val	229	Leu, Met, Ile, Ala
Ala	230	Ser, Thr, Val, Arg, Lys, Glu, Leu, Ile, Met, His
Ala	366	Glu, Gln, Ser, Val, Phe, Thr
Leu	367	Arg

Tabla (ii):

Amino- ácido en SEQ ID N° 4	Posición en SEQ ID N° 4	Sustituciones
Ser	211	Glu, Thr, Tyr, Phe, His, Gln, Asn, Gly, Leu, Met, Val, Arg, Ile
Val	228	Ala, Thr
Pro	239	Ala, Val, Thr, Asn, Ile,
Leu	289	Met, Ile, Asn
Leu	323	Met
Ile	361	Cualquiera excepto Pro
Gly	362	Ala, Pro, Val, Thr, Met

- 5 La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína de HPPD denominada en el presente documento “la proteína de HPPD de esta invención” o “la proteína de HPPD de Kordia”, que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la
- 10 secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID N° 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).

Tabla (iii)

Amino- ácido en SEQ ID N° 4	Posición en SEQ ID N° 4	Sustituciones
Ser	211	Glu, Thr, Arg, Tyr
Val	228	Ala
Pro	239	Ala, Val, Thr
Leu	289	Met
Leu	323	Met
Ile	361	Ala, Val, Leu, Lys
Gly	362	Ala

- 15 La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína de HPPD denominada en el presente documento “la proteína de HPPD de esta invención” o “la proteína de HPPD de Kordia”, que es una proteína de 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 N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, particularmente con respecto a la
- 20 secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4, 5, 6, 7, de manera preferible SEQ ID N° 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).

Esta invención usa una proteína con aminoácidos sustituidos, suprimidos o añadidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, tales como una proteína de fusión con un péptido de tránsito, o una proteína con cambios de aminoácidos en la secuencia de la SEQ ID N° 4 que retiene la función enzimática de una proteína de HPPD, y que todavía confiere una tolerancia a las HPPD cuando se expresa en plantas, de manera preferible una tolerancia a las HPPD de rango comparable con la conferida por la proteína de la SEQ ID N° 4. Esto incluye proteínas variantes o mutantes derivadas de la proteína de la SEQ ID N° 4, tales como cualquiera de las proteínas de las SEQ ID N° 5, 6 o 7, particularmente aquella 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 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 N° 4, 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 N° 4, tal como una proteína con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N° 4 hasta 7. Esto incluye proteínas aisladas como se definen seguidamente, y también unas proteínas, tales como la proteína de la SEQ ID N° 4, 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 documento como proteínas de HPPD de esta invención unas proteínas de HPPD que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, 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 documento unas proteínas de HPPD codificadas por unas secuencias de ADN homologas a las secuencias de ADN de la invención como se describen seguidamente, o unas proteínas de 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 N° 1, o que es obtenible usando un cebador basado en SEQ ID N° 1, o unas proteínas de HPPD con una identidad entre secuencias de por lo menos 80 % con la SEQ ID N° 4, que son codificadas por una secuencia de ADN hallada en la secuencia del genoma de un microorganismo de la familia de las *Blepharismidae*. Está incluida en el presente documento como una proteína de HPPD de esta invención una proteína de HPPD de *Blepharismidae* 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 de HPPD es una proteína de HPPD de *Blepharisma japonicum*, tal como una proteína que comprende la secuencia de la SEQ ID N° 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382. Esto incluye las proteínas de HPPD mutantes o variantes tal como se describen adicionalmente 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 consiste en las SEQ ID NOs: 4, 5, 6 o 7, 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 N°: 4-7 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.

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 N°: 4-7, o un fragmento de la misma. 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 N°: 4-7, 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.

También se incluyen en el presente documento, como ADN de HPPD de esta divulgación, unas secuencias de ADN que codifican una proteína de 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.

En una realización particular, el ADN de HPPD de *Blepharisma* 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, junto al extremo terminal de N de la enzima de HPPD expresada de esta manera está situado un péptido de señal, de manera preferible 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 de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilasa/oxigenasa de plantas (RuBisCO ssu, acrónimo de ribulose biscoxilase / oxigenase small subunit), que cuando sea apropiado incluye unos pocos aminoácidos de la parte terminal de N de la RuBisCO ssu madura (documento EP 189 707). La divulgación incluye también un ADN que codifica una proteína de HPPD de esta invención que se deriva o es obtenible a partir de la SEQ ID N°. 1 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 N°. 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.167 (que incluye las posiciones definidas). La divulgación incluye adicionalmente un ADN que codifica una proteína de HPPD de esta invención que se deriva de la SEQ ID N°. 1 y 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 N°. 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.542 (que incluye las posiciones definidas).

En una realización particular adicional, la HPPD de la invención, tal como la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°. 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, o la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID N°. 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-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ fenil)-propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona y pirazoxifeN°. La divulgación incluye adicionalmente un ADN que codifica una proteína de HPPD de esta invención que se deriva de la SEQ ID N°. 1 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 N°. 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.167 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos una 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 de HPPD de esta invención 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 N°. 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.542 (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 se refiere adicionalmente a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden un ADN que codifica una proteína de HPPD de la invención, que está optimizado para la expresión en *E. coli*, o 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 N°. 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.167 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID N°. 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.542 (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 HPPD de la invención que está optimizada para la expresión en *E. coli*, u optimizada para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN de la SEQ ID N°. 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.542 (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.

En otra divulgación, la proteína de HPPD de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID N°. 7 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.

- 5 La actividad enzimática de las proteínas de HPPD puede ser medida por cualquier procedimiento que haga posible ya sea medir la disminución en la cantidad de los sustratos de HPP o de O₂, o medir la acumulación de cualquiera de los productos derivados de la reacción enzimática, es decir homogentisato o CO₂. En particular, la actividad de HPPD puede ser medida por medio del procedimiento descrito en las citas de Garcia y col. (1997), Biochem. J. 325, 761-769 o Garcia y col. (1999), Plant Physiol. 119, 1507-1516, que son incorporadas en el presente documento por
10 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-(metilsulfonyl)-benzoil]-1,3-ciclohexanodiona], mesotriona [es decir 2-[4-(metilsulfonyl)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanodiona], y tembotriona [es decir 2-[2-cloro-4-(metilsulfonyl)-3-[(2,2,2-trifluoroetoxi)metil]benzoil]-1,3-ciclohexanodiona], tefuriltriona [es decir 2-[2-cloro-4-metil-3-[(RS)-tetrahidro-2-furilmtoximetil]-benzoil]ciclohexano-1,3-diona], biciclopirona [es decir 4-hidroxi-3-{2-[(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluorometil)-3-piridilcarbonyl}bicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-ona], benzobiciclona [es decir 3-(2-cloro-4-metilbenzoil)-2-feniltiobicyclo[3.2.1]oct-2-en-4-ona].
15

20 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-(metilsulfonyl)fenil]-(5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona] y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il)-(2-metil-4-trifluorometilfenil)metanona].

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

La presente invención se refiere también a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima HPPD de esta invención que retiene sus propiedades de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato 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 N°. 4 de por lo menos 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 %.
30
35

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.
40

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).
45

La expresión "un(a) ácido nucleico/ADN/proteína aislado/a", tal como se usa en el presente documento, 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 codificadora bacteriana conectada operativamente a un promotor expresable en una planta) en un gen quimérico, un
50
55 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, topamezona 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 terminal de N) y/o 3' (o terminal de C), por ejemplo (la secuencia de nucleótidos de) una proteína marcadora seleccionable, (la secuencia de nucleótidos de) un péptido de tránsito, y/o una secuencia líder en 5' o una secuencia de remolque en 3'. Similarmente, debería entenderse que el uso del término "comprende", "que comprende" o "comprende" a lo largo del texto y 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. Se divulgan las regiones codificadoras que codifican una HPPD comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica unas proteínas con las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID N°. 4, 5, 6, 7 y 16, tales como las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N°. 1, 2 y 3.

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 *Blepharisma*.

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 70 %, 80 %, 85 % o 90 % o 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 documento, se refiere a una proteína que tiene una identidad de secuencia 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 de secuencia", 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 de secuencia", tal como se usa en el presente documento, 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 de secuencia" 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 residuos idénticos (x 100) dividido por el número de posiciones que se han comparado. Un hueco, es decir una posición en una alineación en la que un residuo está presente en una secuencia pero no en la otra, es considerado como una posición con residuos 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 hueco de 50 y una penalización por prolongación de un hueco de 3.

Unas secuencias de nucleótidos homólogas 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.

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 N°. 1, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 3. Sin embargo, las sondas pueden comprender regiones más largas de secuencias de nucleótidos que se 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 de HPPD.

El concepto de "unas condiciones de hibridación rigurosas" tal como se usa en el presente documento, 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 desnaturizado tal como un ADN de esperma de salmón, seguido por un lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC 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, 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 SEQ ID N°. 1, 2, 3 o su complemento.

La invención comprende también unas enzimas de HPPD variantes que son unas secuencias de aminoácidos similares a la secuencia de aminoácidos de HPPD de la SEQ ID N°. 4 en las que uno o más aminoácidos se han introducido, suprimido o sustituido. En el presente documento, 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 la SEQ ID N°. 4. 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 diferente residuo de aminoácido presente en la naturaleza o uno no convencional. Dichas sustituciones se pueden clasificar como "conservativas" cuando un residuo de aminoácido contenido en una proteína de 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 residuo de aminoácido que está presente en una proteína de 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 residuos singulares, pero pueden ser también de residuos múltiples, ya sea arracimados o dispersados. Las supresiones de aminoácidos serán usualmente del orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácidos, mientras que las inserciones pueden ser de cualquier longitud. Las supresiones e inserciones se pueden hacer en el extremo terminal de N, en el extremo terminal de C, o pueden ser supresiones o inserciones internas. Generalmente, unas inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán menores que unas fusiones en los terminales de amino o de carboxi y del orden de 1 a 4 residuos 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 documento, 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).

También se comprenden por la presente divulgación unos anticuerpos que reconocen específicamente a una enzima HPPD de acuerdo con la invención.

La invención se refiere también 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 codificadora 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 manera tal 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 manera tal 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 manera tal 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 prevalentes (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 WO2005/012515). 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.

El gen de HPPD de la invención se combina ventajosamente en plantas con otros genes que codifican proteínas o ARN que confieren útiles propiedades agronómicas a dichas plantas. Entre los genes que codifican proteínas o ARN 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 que codifican ARN que proporcionan represión de nematodos o insectos, etc.

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 Synthase, enolpiruvilshikimate 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 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 a partir de *Agrobacterium* y que se describe por las SEQ ID N°. 2 y SEQ ID N°. 3 del documento de patente US 5.633.435, que se denomina también CP4.

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 N°. 29 en el documento WO2008/100353.

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.

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 US 6.855.533, se describieron plantas transgénicas de tabaco que contienen genes mutados de

Arabidopsis ALS/AHAS.

En el documento 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.

5 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.

10 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 a partir de bacterias tales como *Photorhabdus* (documentos WO 97/17432 & WO 98/08932).

15 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 N° 7) o un fragmento tóxico de la misma, la proteína VIP3Aa19 con el número de acceso al NCBI ABG20428, la proteína VIP3Aa20 con el número de acceso al NCBI ABG20429 (SEQ ID N° 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* (tal como se describen en el documento WO98/50427), de *Serratia* (particularmente procedentes de *S. entomophila*) o de cepas de *Photorhabdus* especies, tales como las proteínas Tc procedentes de *Photorhabdus* 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 documento 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.

40 La presente invención se refiere también a un gen quimérico (o casete de expresión) que comprende una secuencia codificadora 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 de codificación 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.

45 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 manera tal que se permite la expresión de una proteína de fusión de péptido de tránsito/HPPD.

50 En otra adicional realización 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 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, dicetonitrilo, biciclopirona, tefuriltriona, benzofenap, pirasulfotol, pirazolato y sulcotriona a dichas plantas, partes de

plantas o semillas de plantas que son tolerantes a 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 "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 biscoxilasa/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). 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 AU 689 311) o los del virus de mosaico de vena de Cassava (CsVMV, US 7.053.205). Una secuencia de promotor específica para particulares regiones o tejidos de plantas con el fin de expresar las proteínas de HPPD de la invención, tales como promotores 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). Se puede hacer uso también, en combinación con el promotor, de otras secuencias reguladoras, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificadora, 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 de la corrosión 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.

En una divulgación particular adicional, el gen de la invención está presente en plantas en copias múltiples, de manera preferible, dos copias, cada una de ellas controlada por un promotor diferente que se puede expresar en plantas.

En una realización particular adicional, el gen quimérico de la invención se puede combinar con cualquier gen quimérico adicional que codifique una proteína de HPPD, de manera preferible, estos genes diferentes se controlan por diferentes elementos reguladores que están activos en plantas.

En una divulgación particular adicional, el gen quimérico de la invención se puede combinar con un gen CYP450 de Maíz monooxigenasa (gen nsf1) estando bajo el control de un promotor idéntico o diferente que se puede expresar en plantas.

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 documento, 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 de HPPD en su célula hospedadora natural (que también se citan como "promotor heterólogo" o "secuencias reguladoras heterólogas").

La expresión "ADN/proteína que comprende la secuencia X" y "ADN/proteína con la secuencia que comprende secuencia X", tal como se usan en el presente documento, 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 manera tal que otras secuencias de nucleótidos o de aminoácidos pueden ser incluidas junto al extremo 5' (o terminal de N) y/o 3' (o terminal de C), por ejemplo, un péptido de tránsito o de señal terminal de N. El término "que comprende", tal como se usa en el presente documento, 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. La expresión "que consiste en", tal como se usa en el presente documento, es una modalidad de lenguaje de extremo cerrado, es decir que solamente están presentes los elementos que se citan específicamente. La expresión "ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia X", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ADN que comprende una secuencia codificadora, 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'. La expresión "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).

- 5 Las proteínas de 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), particularmente 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 de 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 in Molecular Biology, 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", 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 de 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 inhibidora 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 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 de HPPD de acuerdo con la invención o la proteína de 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, 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 de 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 que se puede introducir un ácido nucleico o un gen quimérico de acuerdo con la invención 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, de manera preferible, células de plantas y plantas.

Se entiende que una "célula de planta", de acuerdo con la invención, es cualquier célula que se deriva de, o se halla en, una planta, y que es capaz de formar, o es parte de, tejidos no diferenciados, tales como callos, tejidos diferenciados tales como embriones de plantas, partes de plantas, plantas o semillas. Esto incluye protoplastos y polen, células 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 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*, 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 documento, 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, se puede usar como la secuencia de promotor en las plantas de la invención (denominado "promotor expresable en plantas" en el presente documento). 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 codificadora que codifica una proteína de HPPD de la invención para formar un gen quimérico de HPPD de esta invención.

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

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, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito se emplea 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 manera tal 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 N° 6 o SEQ ID N° 7. El péptido de tránsito hace posible dirigir a las HPPD dentro de los plastidios, más especialmente de los cloroplastos, siendo disociada la proteína de fusión entre el péptido de tránsito y la proteína de 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 terminal de N 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 tránsito de una planta que está fusionado con una parte de la secuencia terminal de N 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 terminal de N 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 codificadora, en el documento de patente EP 508 909 A1.

La presente divulgación se refiere también 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 se refiere también 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 se refiere también 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 de HPPD de la invención, tal como una proteína que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N° 4, 5, 6 o 7, 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 tefuiltriona, 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.

En una forma particular de realización, la presente invención 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 de HPPD de esta invención, que retiene sus propiedades de catalizar la conversión de un para-hidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que hace a la planta más tolerante, que las plantas de la misma especie que no comprenden dicha proteína de HPPD de la presente invención, particularmente a tricetonas, o a pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona, topamezona o sulcotriona, biciclopirona, pirasulfotol, pirazolato, benzofenap y tefuiltriona, 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 tefuiltriona, particularmente tembotriona. La presente divulgación 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 para-hidroxifenilpiruvato 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 N° 11 (desde la posición de aminoácido 126 hasta la posición de aminoácido 568), o que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 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 documento, 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, tefuiltriona, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ fenil)propano-1,3-diona, incluso más particularmente tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo, biciclopirona, topamezona, pirazolato, benzofenap, sulcotriona, tefuiltriona, 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 se refiere también 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 progenie 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 se refiere también a las plantas transgénicas o a partes de las mismas, que se derivan 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 divulgación se refiere también a los productos finales tales como la harina o el aceite, que se obtienen a partir 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 especializada 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, incorporado en el presente documento por su referencia. 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), una electroporación (documentos US 5.641.664 y US 5.679.558), o un bombardeo (Christou y col., 1991, Biotechnology 9:957). Una apropiada tecnología para la transformación de plantas monocotiledóneas, y particularmente de arroz, se describe en el documento WO 92/09696. 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), transformación mediada por polibreno y/o por tratamiento (Sawahel W.A., 2001, - Plant Molecular Biology reporter, 19:377a-377f, incorporada en el presente documento por su referencia).

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 de 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 referencia.

La presente invención se refiere también 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 se refiere también 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 codificadora 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 codificadora 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 anterior procedimiento 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 (preferato 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 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 técnica.

La divulgación se refiere también a un procedimiento para eliminar selectivamente malezas o impedir la germinación de malezas en un campo con plantas o con 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 divulgación se refiere también 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 invención se refiere también 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 de 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-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)-propano-1,3-diona.

También se proporcionan en el presente documento 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, reservas de madera u otros órganos perennes, y que son difíciles de controlar.

La presente divulgación por lo tanto se refiere también a un procedimiento para controlar 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 del vástago con brotes) o a la zona en la que crecen las plantas (por ejemplo la zona sometida a cultivo). 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 de 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),
- 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),
- 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,
- 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 (1995), editorial Springer Berlín, Heidelberg, o de Christou, "Trends in Plant Science" 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 añadir adaptadores o enlazadores a los fragmentos; véanse, por ejemplo, las citas de Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; o de Winnacker "Gene und Klone", VCH Weinheim, 2ª edición, 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 codificadora de un producto génico, inclusive cualesquiera secuencias flanqueadoras que puedan estar presentes, o también moléculas de ADN, que comprenden solamente partes de la secuencia codificadora, 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 codificadoras de un producto génico, pero que no son totalmente idénticas.
- 5
- 10 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 codificadora 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, 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.
- 15 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.
- 20 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 (= extraña). 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 benzoilisoaxazoles y sustancias activas análogas.
- 25
- 30 La divulgación por lo tanto se refiere también 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.
- 35
- 40 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.
- 45
- 50 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 formular de diferentes maneras, dependiendo de los parámetros biológicos y/o fisicoquímicos prevaecientes. 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 sobre la base de aceites o de 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.
- 55
- 60 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, C. Hanser, Múnich, 4ª edición de 1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations", Marcel Dekker, N.Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying Handbook" (Manual del secado por atomización), 3ª edición de 1979, G. Goodwin Ltd, Londres.
- Los requeridos agentes auxiliares para 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", 2ª edición, Darland Books, Caldwell N.J.; H.v. Olphen

"Introduction to Clay Colloid Chemistry", 2ª edición, J. Wiley & Sons, N.Y.; C. Marsden, "Solvents Guide", 2ª edición, Interscience, N.Y. 1963; McCutcheon's "Detergents and Emulsifiers Annual", McCutcheon, MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley y Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", 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, C. Hanser Munich, 4ª edición de 1986.

Sobre la base de 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 unas formulaciones 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-aurato 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 soplante y molinos de chorros de aire y, simultáneamente o a continuación, se mezclan con los agentes auxiliares para formulaciones.

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(oxietileno)-ésteres de sorbitán, tales como, por ejemplo, poli(oxietileno)-ésteres con ácidos grasos de sorbitán.

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.

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 se han mencionado ya por ejemplo, más arriba para los otros tipos de formulaciones.

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 alcohol polivinílico, un poliácido de sodio o también aceites minerales. También se pueden granular sustancias activas apropiadas del modo que es usual para la producción de granulados de agentes fertilizantes, si se desea en mezcla con agentes fertilizantes.

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.

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", 3ª edición de 1979, G. Goodwin Ltd., Londres; J.E. Browning, "Agglomeration", Chemical and Engineering 1967, páginas 147 y siguientes; "Perry's Chemical Engineer's Handbook", 5ª edición, McGraw-Hill, Nueva York 1973, páginas 8-57,

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", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1961, páginas 81-96 y de J.D. Freyer, S.A. Evans, "Weed Control Handbook", 5ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968, páginas 101-103.

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.

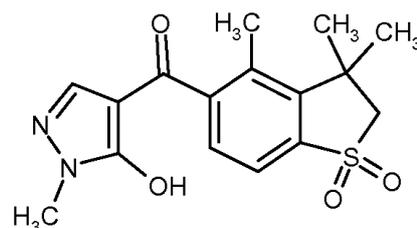
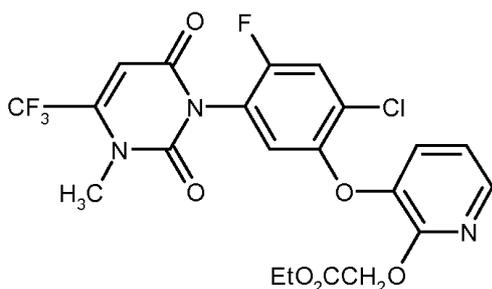
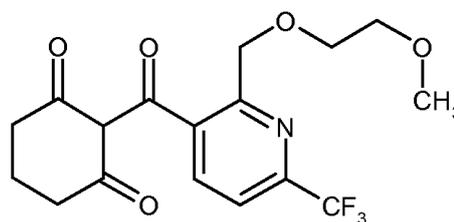
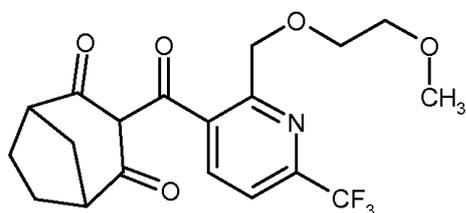
Por añadidura, las mencionadas formulaciones de sustancias activas comprenden, si fuese apropiado, los agentes auxiliares que son convencionales en cada caso, tales como agentes adhesivos, humectantes, dispersantes, emulsionantes, penetrantes, conservantes, protectores frente a las heladas y disolventes, 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.

Sobre la base de 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, tefuriltriona 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.

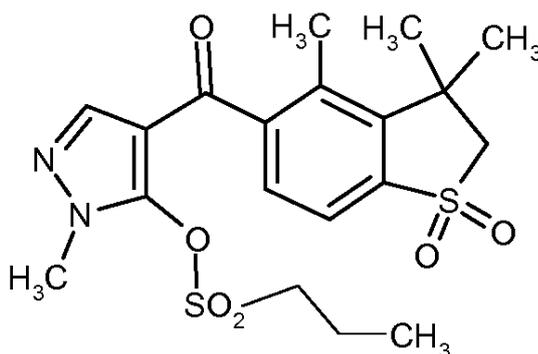
Sustancias activas que pueden ser aplicadas a plantas tolerantes a las HPPD de acuerdo con la presente invención en combinación con un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol 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 "The Pesticide Manual", 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, aclonifeno, 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, benicarbazona, 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, ciprotrina, ciprozol, 2,4-D, 2,4-DB, daimurón/dimron, dalapon, daminozida, dazomet, n-decanol, desmedifam, desmetrina, detosil-pirazolato (DTP), di-alato, dicamba, diclobenilo, dicloroprop, dicloroprop-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, etametsulfurón-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,

5 fentrazamida, fenurón, flamprop, flamprop-M-isopropilo, flamprop-M-metilo, flazasulfurón, florasulam, fluazifop, fluazifop-P, fluazifop-butilo, fluazifop-P-butilo, fluazolato, flucarbazona, flucarbazona-sodio, flucetosulfurón, flucloalrina, 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, fluoxipir, fluoxipir-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-butotilo, mecoprop-P-butotilo, mecoprop-P-dimetilamonio, mecoprop-P-2-etil-hexilo, mecoprop-P-potasio, mefenacet, mefluidida, mepiquat-cloruro, mesosulfurón, mesosulfurón-metilo, metabenzotiazurón, mettam, 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, nipiraclorofeno, nitalina, nitrofenol, nitrofenolato-sodio (mezcla de isómeros), nitrofluorfenol, ácido nonanoico, norflurazona, orbencarb, ortosulfamurón, orizalina, oxadiargilo, oxadiazona, oxasulfurón, oxaziclomefona, oxifluorfenol, 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, profluzol, prociazina, prodiamina, prifluralina, profoxidim, prohexadiona, prohexadiona-calcio, prohidrojasmona, prometon, 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, quinclozac, quinmerac, quinoclamina, quizalofop, quizalofop-etilo, quizalofop-P, quizalofop-P-etilo, quizalofop-P-tefurilo, rimsulfurón, saflufenacilo, sebumetona, 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, tiazafurón, tiazopir, tidiazimina, tidiazurón, 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



45

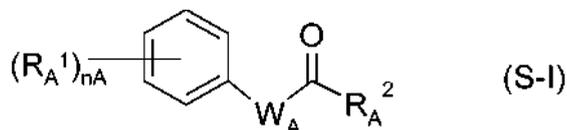


La tasa de aplicación requerida del herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona, tefuritriona y mesotriona, 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.

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 antídotos. Estos antídotos, que se emplean en cantidades activas como antídotos, 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 antídotos se seleccionan de manera preferible entre el conjunto que consiste en:

A) compuestos de la fórmula (S-I)

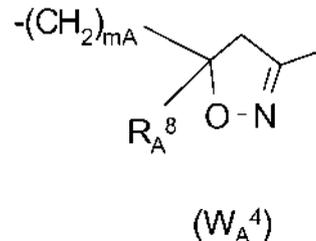
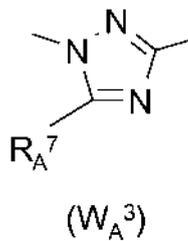
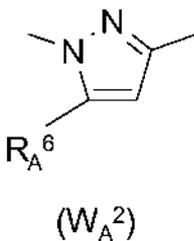
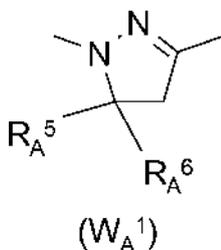


en la que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

n_A es un número natural de 0 a 5, de manera preferida de 0 a 3;

R_A^1 es halógeno, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), nitro o haloalquilo (C_1-C_4);

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 u O, estando presente en el anillo por lo menos un átomo de nitrógeno y a lo sumo un átomo de oxígeno, de manera preferida un radical tomado entre el conjunto que consiste en (W_A^1) hasta (W_A^4),



m_A es 0 o 1;

R_A^2 es OR_A^3 , SR_A^3 o $NR_A^3R_A^4$

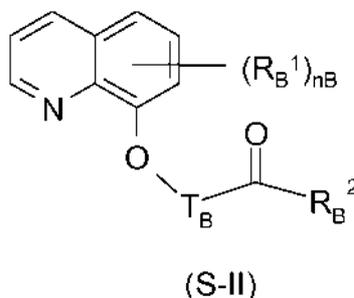
o un heterociclo de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno y hasta 3 heteroátomos, de manera preferida tomados entre el conjunto que consiste en O y S, que está unido a través del átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo en (S-I), y que está sin sustituir o sustituido con radicales tomados entre el conjunto que consiste en alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4) y fenilo eventualmente sustituido, de manera preferida un radical de las fórmulas OR_A^3 , NHR_A^3 o

R_A^3 $N(CH_3)_2$, en particular de la fórmula OR_A^3 ;
 es hidrógeno o un radical hidrocarbilo alifático sin sustituir o sustituido, que tiene de manera preferida un total de 1 a 18 átomos de C;
 R_A^4 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6) o fenilo sin sustituir o sustituido;
 R_A^5 es H, alquilo (C_1-C_8), halo-alquilo (C_1-C_8), alcoxi (C_1-C_4)-alquilo- (C_1-C_8) , ciano o $COOR_A^9$, en que R_A^9 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), halo-alquilo (C_1-C_8), alcoxi (C_1-C_4)-alquilo- (C_1-C_4) , hidroxialquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_{12}) o tri-alquil (C_1-C_4)-sililo;
 R_A^6, R_A^7, R_A^8 son idénticos o diferentes, y son hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), halo-alquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_{12}), o fenilo sustituido o sin sustituir;

de manera preferida:

- a) compuestos del tipo del ácido dicloro-fenil-pirazolina-3-carboxílico, de modo preferido compuestos tales como 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, de modo preferido compuestos tales como 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(-etil éster), es decir 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, de modo preferido 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)



en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

R_B^1 es halógeno, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), nitro o halo-alquilo (C_1-C_4);

n_B es un número natural de 0 a 5, de manera preferida 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, de manera preferida 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 (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4) o fenilo eventualmente sustituido, de manera preferida 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 de manera preferida un total de 1 a 18 átomos de C;

R_B^4 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6) o fenilo sin sustituir o sustituido;

T_B es una cadena de alcanodilo (C_1 o C_2), que está sin sustituir o sustituida con uno o dos radicales alquilo (C_1-C_4) o con [alcoxi (C_1-C_3)]-carbonilo;

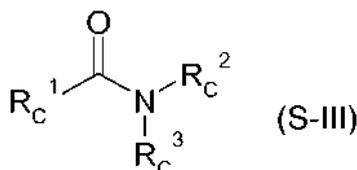
de manera preferida:

- a) compuestos del tipo del ácido 8-quinolinoxil-acético (S2), de modo preferido (5-cloro-8-quinolinoxil)-acetato de (1-metil-hexilo), (nombre común "cloquintocet-mexilo" (S2-1), (véase el Manual de los Plaguicidas), (5-cloro-8-quinolinoxil)-acetato de 1,3-dimetilbut-1-ilo (S2-2), (5-cloro-8-quinolinoxil)-acetato de 4-aliloxibutilo (S2-3), (5-cloro-8-quinolinoxil)-acetato de 1-aliloxiprop-2-ilo (S2-4), (5-cloro-8-quinolinoxil)-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-propilideniminoxi)-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 que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

R_C^1 es alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_4$), haloalqueno ($\text{C}_2\text{-C}_4$), cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_7$), de manera preferida diclorometilo;

R_C^2 , R_C^3 son idénticos o diferentes y son hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_4$), alquino ($\text{C}_2\text{-C}_4$), haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), haloalqueno ($\text{C}_2\text{-C}_4$), alquilcarbamóil ($\text{C}_1\text{-C}_4$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alquencilcarbamóil ($\text{C}_2\text{-C}_4$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), dioxolanil-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), tiazolilo, furilo, furil-alquilo, tienilo, piperidilo, fenilo sustituido o sin sustituir, o R_C^2 y R_C^3 forman en común un anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir,

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

de manera preferida:

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-dicloroacetamida),

"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),

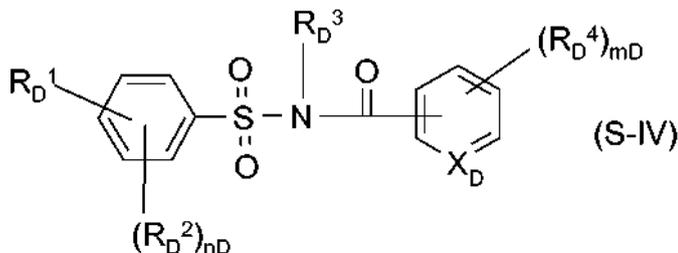
"AD-67" o "MON 4660" (= 3-dicloroacetil-1-oxa-3-aza-espiro[4,5]decano de Nitrokemia o Monsanto),

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

"diclonona" (diclonona) o "BAS145138" o "LAB145138" (= 3-dicloroacetil-2,5,5-trimetil-1,3-diazabicyclo[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

X_D es CH o N;

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

R_D^2 es halógeno, haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$), nitro, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alquilsulfonilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alcocarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$);

R_D^3 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), alqueno (C_2-C_4) o alquino (C_2-C_4);

R_D^4 es halógeno, nitro, alquilo (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), haloalcoxi (C_1-C_4), cicloalquilo (C_3-C_6), fenilo, alcoxi (C_1-C_4), ciano, alquiltio (C_1-C_4), alquilsulfinilo (C_1-C_4), alquilsulfonilo (C_1-C_4), alcoxycarbonilo (C_1-C_4) o alquilcarbonilo (C_1-C_4);

R_D^5 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), alqueno (C_2-C_6), alquino (C_2-C_6), cicloalqueno (C_5-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 (C_1-C_6), haloalcoxi (C_1-C_6), alquilsulfinilo (C_1-C_2), alquilsulfonilo (C_1-C_2), cicloalquilo (C_3-C_6), alcoxycarbonilo (C_1-C_4), alquilcarbonilo (C_1-C_4) y fenilo y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo (C_1-C_4) y haloalquilo (C_1-C_4);

R_D^6 es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_6) o alquino (C_2-C_6), 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 (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4) y alquiltio (C_1-C_4), 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;

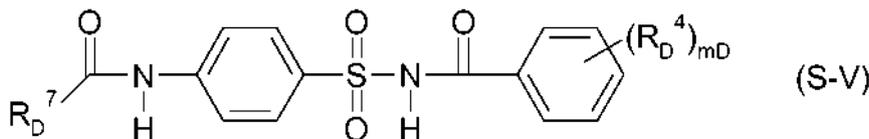
R_D^7 es hidrógeno, alquilamino (C_1-C_4), di-alquilamino (C_1-C_4), alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi (C_1-C_4), halógeno-alcoxi (C_1-C_6) y alquiltio (C_1-C_4) y en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo (C_1-C_4) y haloalquilo (C_1-C_4);

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 (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi (C_1-C_4), halógeno-alcoxi (C_1-C_6) y alquiltio (C_1-C_4) y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo (C_1-C_4) y haloalquilo (C_1-C_4);

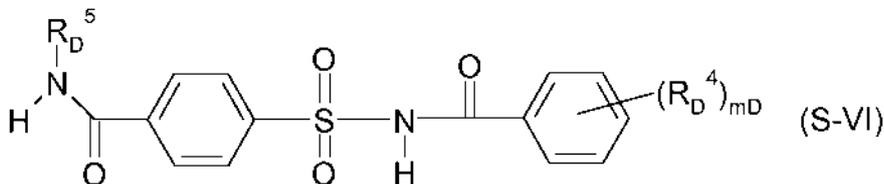
R_D^4 significa halógeno, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), CF_3 ;

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 ("ciprosulfamida", S3-1),

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

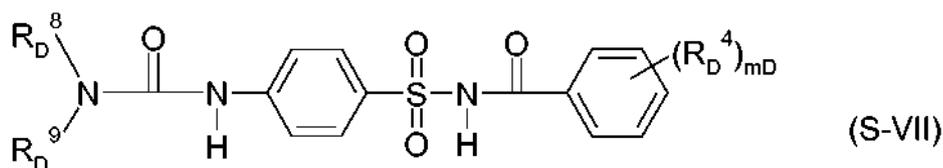
R_D^5 = etilo y (R_D^4) = 2-OMe (S3-3),

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 (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_8), alquenilo (C_3-C_6), alquinilo (C_3-C_6),
 R_D^4 es halógeno, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), CF_3
 m_D es 1 o 2;

de ellos en particular

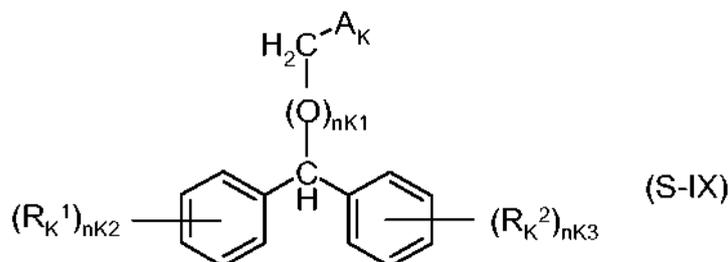
1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,
 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,
 1-[4-(N-4,5-dimetilbenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,
 1-[4-(N-naftoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,

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-hidroxibenzoico, 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 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,

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, "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 JP-A-60087254), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por algunos herbicidas, "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



en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

R_K^1 , R_K^2 independientemente uno de otro, son halógeno, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), haloalquilo (C_1-C_4), alquilamino (C_1-C_4), di-alquilamino (C_1-C_4), nitro;
 A_K es $COOR_K^3$ o $COOR_K^4$
 R_K^3 , R_K^4 independientemente uno de otro, son hidrógeno, alquilo (C_1-C_4), alquenilo (C_2-C_6), alquinilo (C_2-C_4), cianoalquilo, haloalquilo (C_1-C_4), fenilo, nitrofenilo, bencilo, halobencilo, piridinialquilo o alquilamonio,
 n_K^1 es 0 o 1
 n_K^2 , n_K^3 independientemente uno de otro, son 0, 1 o 2

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, nematocidas, repelentes de pájaros, nutrientes de plantas y agentes mejoradores de la estructura de los suelos.

10 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, de manera preferida 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 de manera preferible entre 0,5 y 5.000 g/ha, de manera particularmente preferible entre 0,5 y 1.000 g/ha y de manera muy particularmente preferible 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.

25 La divulgación se refiere también 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 se refiere también 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 documento.

35 En una particular realización, 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 N° 4 (desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382), 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 la especie Brassica, o algodón.

40 En otra particular realización, 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 particular realización, 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 (preeferato deshidrogenasa), o una enzima con por lo menos PDH.

45 La divulgación se refiere también 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 a partir 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.

50 La invención se refiere también 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 a partir 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.

55 La invención se refiere también 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.

60 La presente invención se refiere también 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 preeferato deshidrogenasa (abreviada en el presente documento como PDH).

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 pefenato en HPP. En particular, dicha enzima de PDH se puede originar a partir 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 substrato pefenato, o medir la acumulación de un producto derivado de la reacción enzimática, es decir HPP o uno de los cofactores NADH o NADPH.

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 Acceso 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 Acceso 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 Acceso S29934) tal como se describe en la cita de Xia y col. (1992) J. Gen. Microbiol. 138(7), 1309-1316.

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 (pefenato deshidrogenasa). En una particular realización, 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 topramezona, biciclopirona, tefuriltriona o sulcotriona.

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, se describen extensamente en el documento WO 04/024928. 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

FIG.1 Mapa del plásmido pSE420::FMP37e

FIG.2 Mapa del ADN-T introducido dentro de las plantas de tabaco

FIG.3 Mapa del ADN-T introducido 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 (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* (Pro197Ala y Trp574Leu); documento US 5378824, HA: promotor de histona procedente del gen de *Arabidopsis*, TEV: virus de corrosión del tabaco, FMP37e: gen que codifica una FMP37 optimizada para la expresión en *E coli* con una secuencia que codifica una marca His junto a su extremidad 5', FMP37t: gen que codifica una FMP37 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas con una secuencia que codifica una marca His junto a su extremidad 5', FMP37t-h, un gen que codifica una FMP37 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas, FMP37m, un gen que codifica una FMP37 optimizada para la expresión en plantas de *Zea mays*, LB, borde izquierdo, RB, borde derecho.

Lista de secuencias

SEQ ID Nº. 1: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum*
 SEQ ID Nº. 2: Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para *E. coli*, que contiene 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 *Blepharisma japonicum* optimizada para *Nicotiana tabaccum*, que contiene en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca HES.
 SEQ ID Nº. 4: Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Blepharisma japonicum* derivada de la SEQ ID Nº. 1

	SEQ ID N° 5:	Proteína codificada por la SEQ ID N° 2
	SEQ ID N° 6:	Secuencia de aminoácidos de la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> (SEQ ID N° 4) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (documento WO 2009/144079))
5	SEQ ID N° 7:	Proteína codificada por la SEQ ID N° 3
	SEQ ID N° 8:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Arabidopsis thaliana</i>
	SEQ ID N° 9:	Secuencia de aminoácidos de la HPPD de <i>Arabidopsis thaliana</i>
	SEQ ID N° 10:	Proteína codificada por la SEQ ID N° 8 más una adicional alanina directamente corriente abajo del inicial aminoácido metionina seguido por 6 aminoácidos histidina
10	SEQ ID N° 11:	Proteína de la SEQ ID N° 9 más la secuencia de OTP situada junto al extremo terminal de N de la proteína
	SEQ ID N° 12:	Proteína de la SEQ ID N° 10 más la secuencia de OTP directamente situada junto al extremo terminal de N de la proteína
	SEQ ID N° 13:	Secuencia de cebador de Xho-OTP-for
	SEQ ID N° 14:	Secuencia de cebador de NcoI-OTP-rev
15	SEQ ID N° 15:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas dicotiledóneas
	SEQ ID N° 16:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Zea mays</i>
20	SEQ ID N° 17:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Brassica napus</i>
	SEQ ID N° 18:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Beta vulgaris</i>
	SEQ ID N° 19:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Gossypium hirsutum</i>
25	SEQ ID N° 20:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Glycine max</i>
	SEQ ID N° 21:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Hordeum vulgare</i>
30	SEQ ID N° 22:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Oryza sativa</i>
	SEQ ID N° 23:	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Blepharisma japonicum</i> optimizada para plantas de <i>Triticum aestivum</i> ,

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 la HPPD de *Blepharisma japonicum*. (que se denomina FMP37e) de la SEQ ID N° 5 y de la HPPD de *Arabidopsis thaliana* identificada por la SEQ ID N° 10.

La secuencia codificadora de la HPPD de *Arabidopsis thaliana* AtHPPD (de 1335 pb (pares de bases); Genebank 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 fue denominado "pQE30-AtHPPD".

La secuencia original de la HPPD de *Blepharisma* (de 1149 pb) que codifica la proteína listada bajo el número de acceso A8R3H6 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, Ebersberg, Alemania). En este vector, la secuencia correspondiente al MCS (acrónimo de multiple cloning site = sitio de clonación múltiple) fue eliminada parcialmente de manera tal 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 HIS6 terminal de N (6x HIS, codificada por: cac cat cac cat cac). Corriente arriba del ATG, se añadieron dos adicionales pares 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. El resultante vector "pBluescript-FMP38e" fue digerido 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 (5.261 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^q* 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).

El resultante vector fue denominado "pSE420(RI)NX-FMP37e" (véase la Figura 1) y fue usado 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 o pSE420(RI)NX-FMP37e. 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⁻¹ 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*ml⁻¹), que se incubó durante 3 h a 37°C.

Para preparar el cultivo principal, 400 ml del medio TB (100 μg*ml⁻¹ 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 OD₆₀₀ 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 a 4 °C. Luego los sedimentos de células se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento y purificación de His₆-AtHPPD y His₆-FMP37e 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 His₆ 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 His₆ por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC = acrónimo de immobilized metal ion affinity chromatography)

El material lisado de células (10 ml), obtenido después de una 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 His₆ fue eluída con 2,5 ml del tampón de elución.

Desalinización de las soluciones de HPPD mediante filtración en gel.

Unas soluciones de HPPD, eluídas a partir de una Columna de Iniciación Rápida Ni-NTA Fast Start Column 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, eluídas a partir de la columna de desalinización, fueron congeladas a -80°C en partes alícuotas de 1 ml.

Determinación de la concentración de la proteína de 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).

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 ddH₂O). 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 N°. 5" y "SEQ ID N°. 10".

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_{max} 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_{max} 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 g. 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 absorbancia 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_{max} , 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 unireactivas 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. 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 N°. 10" y de *Blepharisma japonicum* "SEQ ID N°. 5") y su respectiva tolerancia al agente inhibidor de las HPPD dicetonitrilo.

En la Tabla 1 dada seguidamente, "Km" (la constante de Michaelis-Menten) significa el parámetro cinético que se usa para caracterizar a una enzima, y es definida como la concentración de un sustrato que permite una velocidad semimáxima de la reacción. La Km es definida adicionalmente como la concentración de un sustrato con la que la velocidad de reacción alcanza la mitad de su valor máximo ($V_{max}/2$) en que V_{max} 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		Dicetonitrilo		
	K_m (µM)	V_{max} (µM)	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{-1} (s ⁻¹)	K_i (µM)
SEQ ID N°. 10	6,3	1,2	6,1E+05	1,1E-02	0,018
SEQ ID N°. 5	83	0,1	9,8E+02	6,5E-03	6,6

En la anterior Tabla 1, puede verse con claridad que los parámetros cinéticos Km y Vmax de la HPPD de protista "SEQ ID N° 5" y de la HPPD de planta "SEQ ID N° 10" ya mostraron diferencias significativas. (6,3 µM frente a. 83 µM) que son incluso más altas en lo concerniente al nivel de tolerancia al dicetonitrilo (0,018 µM frente a 6,6 µM). La HPPD de protista "SEQ ID N° 5" era muchísimo más tolerante al agente inhibidor de las HPPD ensayado que la HPPD de planta "SEQ ID N° 10".

Tabla 2: Medición de la tolerancia in vitro de ambas enzimas HPPD procedentes de Arabidopsis (SEQ ID N° 10) y de *Blepharisma japonicum* (SEQ ID N° 5) al herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona. Los números dados representan el porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima en diferentes concentraciones del herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona en comparación con la actividad en ausencia del herbicida inhibidor de las HPPD. Estas mediciones se hicieron usando el procedimiento espectrofotométrico extensamente descrito en el documento WO 2009/144079.

Tembotriona Concentración (M)	% de inhibición	
	SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 5
2.5E-04	97	100
6,3E-05	97	86
2,5E-05	93	56
1,0E-05	97	13
5,0E-06	90	0
2,5E-06	82	0

En la Tabla 2, puede verse con claridad que la HPPD de *Blepharisma japonicum* (SEQ ID N° 5) es muchísimo más tolerante al herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona que la HPPD obtenida a partir de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID N° 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.

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.

Tabla 3: Determinación del pl_{50} de unas enzimas HPPD (de *Arabidopsis thaliana* "SEQ ID N° 10" y de *Blepharisma japonicum* "SEQ ID N° 5") y sus respectivas tolerancias a los diversos agentes inhibidores de las 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 N° 10	>>5,6	>>5,6	>>5,6	5,2	
SEQ ID N° 5	4,6	5,3	4,2	3,7	
	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID N° 10	5,4	>>5,6	5,4	>>5,6	>>5,6
SEQ ID N° 5	4,4	4,8	4,7	n.d.	5,5

Tabla 4: 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 N° 10) y a partir de *Blepharisma japonicum*. (SEQ ID N° 5).

	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID N° 10	92	87	86	29
SEQ ID N° 5	0	49	0	0

(continuación)

	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID N°. 10	69	74	61	100.	90
SEQ ID N°. 5	0	7	0	n.d.	85

En las anteriores Tablas 3 y 4, puede verse con claridad que la HPPD de protista "SEQ ID N°. 5" mostró 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 N°. 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 resultante vector fue denominado "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 resultante vector fue subsiguientemente digerido con las enzimas de restricción NcoI y XbaI. El vector pSE420(RI)NX-FMP37e (véase la Figura 1) fue sometido a las enzimas de restricción NcoI y XbaI con el fin de obtener el fragmento de ADN correspondiente a la SEQ ID N°. 2. El resultante vector fue digerido por empleo de la enzima de restricción HindIII para subclonar el casete CaMV35S::OTP::FMP37e::CaMV35-term (véase la Figura 2) dentro del vector binario pBin19 (Bevan (1984), Nucleic Acid Res. 12:8711-8721.) previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. El resultante vector fue denominado "FMP37ebv".

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 His₆ terminal de N 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 a partir 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 mismo vector pSE420(RI)NX cortado con las mismas enzimas de restricción.

El vector generado fue denominado "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 fue denominado "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 resultante vector fue subsiguientemente digerido con la enzima de restricción HindIII y el casete de expresión de interés fue clonado dentro del vector binario pBin19 previamente abierto y desfosforilado. El resultante vector fue denominado "AtHPPDbv".

Los vectores binarios FMP37ebv 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 (FMP37ebv 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 mm², 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 FMP37ebv 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 (10⁻⁶ 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^{-6} 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 5 siguiente.

- 5 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

- 10 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 N° 11 (*Arabidopsis thaliana*) o la SEQ ID N° 7 (*Blepharisma japonicum*) 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 N° 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 por la SEQ ID N° 7 desarrollaron manifiestamente raíces numerosas y sanas (véase la Tabla 5, siguiente).
- 15

Tabla 5

Callos que contienen:	Sucesos seleccionados para análisis molecular	% de elongación & enraizamiento en 10^{-6} M de tembotriona	Números de sucesos enraizados en medios sin tembotriona
SEQ ID N° 11	21	0	5
SEQ ID N° 7	31	65	20

Regeneración de discos de hojas

- 20 Se cortaron discos de hojas a partir de plantas que contienen las HPPD con SEQ ID N° 11 (*Arabidopsis thaliana*) o SEQ ID N° 7 (*Blepharisma japonicum*), seguido por una regeneración durante 6 semanas en condiciones clásicas de cultivo en un medio MS suplementado con BAP (1 mg/ml; benzilaminopurina), 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^{-6} M), dicetonitrilo ($5 \cdot 10^{-6}$ M), mesotriona (10^{-6} M) y biciclopirona (10^{-6} 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:

- 25 “-“ significa que los discos de hojas tenían el mismo aspecto que un disco de hoja procedente de tipo silvestre plantas de tabaco 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
 30 (++) y poco (+++) por la presencia de los inhibidores.

Los resultados de los experimentos están recopilados en la Tabla 6.

Tabla 6: 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 N° 11) o a partir de *Blepharisma japonicum* SEQ ID N° 7.

Discos de hojas que contienen	Testigo	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID N° 11	++++	-	-	-	-
SEQ ID N° 7	++++	++++	+++	++++	++++

- 35 Mientras que en el caso de plantas que contienen la HPPD definida por la SEQ ID N° 7 (*Blepharisma japonicum*) 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 SEQ ID N° 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 las HPPD ensayados.

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

Preparación de linajes de plantas transgénicas que expresan enzimas HPPD o bien de *Arabidopsis* o de FMP37. Ensayo en invernadero en cuanto a tolerancia a herbicidas.

Respuesta a tembotriona, isoxaflutol y biciclopirona

Unas plantas de tabaco T0 que contenían o bien el gen procedente de Arabidopsis que codifica una HPPD o el gen FMP37e procedente de Blepharisma japonicum que codifica una HPPD de FMP37, 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 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

- 5
- 10
- 15
- tembotriona a razón de 100 g de IA/ha preparada a partir de una formulación WP20 (polvo humectable al 20 %) suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, o
- isoxaflutol a razón de 100 g de IA/ha preparado a partir de una formulación de WP20 suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, o
- biciclopirona a razón de 100 g de IA/ha preparada a partir de una formulación suplementada con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza, o
- “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 7: Plantas de tabaco de tipo silvestre (A) y poblaciones de sucesos en tabaco que contienen alternativamente, los 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 FMP37e que codifica la HPPD de FMP37 (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 FMP37e fueron 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.

A		% de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha		
De tipo silvestre	Linaje		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		% de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha		
HPPD de Arabidopsis	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol
	258	1	100	100
	258	2	100	100
	258	3	100	100

ES 2 668 198 T3

(continuación)

B		% de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha			
HPPD de Arabidopsis	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol	
	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	
	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, 7 DAT, 100 g de IA/ha			
FMP37e	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol	
	113	1		5	
	113	2		10	
	113	3		10	
	113	4		40	
	113	5		70	
	113	6		n.d.	30
	113	7		n.d.	30
	113	8		n.d.	30

(continuación)

C			% de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha	
FMP37e	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol
	113	9	n.d.	30
	113	10	n.d.	50
	207	1		
	207	2		
	207	3		
	207	4		
	207	5		
	207	6		
	207	7		
	207	8		
	207	9		
	207	10	n.d.	
	207	11	n.d.	
	207	12	n.d.	40
	208	1		
	208	2		
	208	3		
	208	4		
	208	5		
	208	6		
	208	7		
	208	8		
	208	9		
	208	10		
	208	11		
	208	12		n.d.
	208	13		n.d.
	208	14		n.d.
	208	15		n.d.

Respuesta a biciclopirona.

- 5 Semillas de plantas de tabaco de tipo silvestre y plantas de tabaco T1 que eran portadoras del gen FMP37e procedente de *Blepharisma japonicum* que codifica una HPPD 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
- 10 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.
- 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.

Tabla 8:

Biciclopirona, 100 g de IA /ha 7 DAT				
Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	% de plantas tolerantes
-	WT	0	12	0
FMP37e	113	60	78	56
FMP37e	207	65	>100	>60
FMP37e	208	44	90	67

Las plantas que contenían la HPPD de FMP37 presentaron tolerancia al herbicida inhibidor de las HPPD biciclopirona.

- 5 Puede resumirse a partir de las tablas antes presentadas que las plantas que expresan el gen FMP37e procedente de *Blepharisma japonicum* que codifica la HPPD de FMP37, obtenidas a partir de diferentes sucesos transgénicos independientes son altamente tolerantes a varios herbicidas inhibidores de HPPD en dosis aplicadas en condiciones agronómicas clásicas.

10 **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 FMP37t (SEQ ID N°. 3), FMP37t-h (SEQ ID N°. 15)

15 Se diseñaron un gen con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas que codifican la proteína de HPPD FMP37, y denominado FMP37t-h (SEQ ID N°. 15) y el mismo gen con una secuencia adicional que codifica una OTP y con una marca HIS junto a su extremidad 5' denominado FMP37t (SEQ ID N°. 3). La secuencia correspondiente al gen FMP37t-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 resultante vector fue denominado pRT100-OTP-FMP37t-h. La secuencia correspondiente al FMP37t fue clonada en el vector pRT100-OTP-FMP37t. Los fragmentos correspondientes a PromCaMV35S-OTP-FMP37t-h-TerCaMV35S y PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP37t-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-FMP37t-h (Fig.3C) y pBin19-FMP37t (Fig.3B) 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 la 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.

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

30 Como un ejemplo, unas plantas enraizadas que contienen el ADN-T PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP37t-TerCaMV35S, serán 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 9.

40 Tabla 9: Respuesta de plantas de tabaco T0 que expresan la HPPD de FMP37.

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
FMP37t	38	6	10	13	7

En conclusión, varias plantas de tabaco que expresan la HPPD de FMP37 son tolerantes a tembotriona.

Ejemplo 6: Clonación de los genes FMP37e, FMP37t y FMP37m que codifican la HPPD de FMP37 en un vector para transformar plantas de Zea mays

FMP37e (SEQ ID N°. 2), FMP37t (SEQ ID N°. 3), FMP37m-h (SEQ ID N°. 16)

- 5 a- FMP37e 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 His.
El vector pRT100-FMP37e que contiene el gen que codifica la HPPD de FMP37, optimizado para la expresión en E. coli bajo el control del promotor de CaMV35S, fue digerido con la enzima de restricción HindIII. El casete CaMV35S::OTP::FMP37e::CaMV35S-term fue clonado posteriormente dentro del el vector binario pHoe6/Ac (documento US 6.316.694) previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado. El resultante vector fue denominado pHoe6/Ac/FMP37e.
- 10 b- FMP37t en pHoe6/Ac (SEQ ID N°. 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 His. FMP37t en pRT100. Una versión del gen que codifica la proteína FMP37 optimizado para la expresión en *Nicotiana tobaccum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un optimizado péptido de tránsito y una marca His, fue encargada y denominada FMP37t. 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 FMP37t 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 resultante vector fue denominado pRT100-FMP37t, y digerido con la enzima de restricción HindIII para separar el ADN correspondiente al casete CaMV35S::OTP::FMP37t::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 resultante vector fue denominado pHoe6/Ac/FMP37t (Fig.3).
- 15 c- FMP37m en pHoe6/Ac (SEQ ID N°. 16): Gen con un trato con codones optimizado para plantas monocotiledóneas más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP. FMP37m en pRT100-OTP (NcoI-XbaI) luego HindIII
- 20 La variante del gen optimizado para la expresión en plantas monocotiledóneas que codifican FMP37, denominada FMP37m, 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 FMP37m fue digerida con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, luego separada por electroforesis en gel, y finalmente aislada a partir 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 resultante vector fue denominado pRT100-OTP-FMP37m, que contiene el casete de expresión CaMV35S::OTP::FMP37m::CaMV35Sterm, que fue aislado usando la enzima de restricción HindIII y luego clonada posteriormente 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 resultante plásmido fue denominado pHoe6/Ac/FMP37m (Fig.3F)
- 25
30
35
40

Transformación de maíz:

- Los plásmidos pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), pHoe6/Ac/FMP37e, pHoe6/Ac/FMP37t y pHoe6/Ac/FMP37m se usaron para transformar un cultivo de maíz.
- 45 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 fosfinotricina. 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.
- 50

Ejemplo 7: Construcción de un vector que contiene el gen FMP37e que ha de ser expresado en plantas de arroz.

- 55 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 FMP37e, con un trato con codones optimizado para la expresión en bacterias E. coli y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codificaba una marca 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 un casete del gen de PAT en el 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
- 60

de transformación (véase la Fig. 3I). El vector binario fue denominado pTMV370. Se construye similarmente un vector binario similar pero que comprende un casete de expresión que expresa el gen de Arabidopsis que codifica la enzima HPPD.

Ejemplo 8: Transformación de plantas de arroz.

5 La transformación de arroz se consiguió 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
 10 semillas fueron inducidas previamente con ácido acetilsalicílico. 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 fosfinotricina durante 3 semanas a 28 °C con un ritmo de fotoperiodo de 16 horas. Luego los callos en
 15 crecimiento fueron cortados desde los embriones, y transferidos a un medio de nueva aportación que contenía triacilina, fosfinotricina, L-prolina y sulfato de cobre (II).

Para cada linaje de callo y por cada concentración de tembotriona, 3 vástagos, y aislados al azar a partir 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
 20 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 sobre la base del blanqueo y asignadas a categorías en 3 grupos:

- 25 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
 30 unos vástagos con nuevas hojas casi totalmente blanqueadas.

Tabla 10:

Concentración de tembotriona.		AtHPPD	FMP37e
1 µM	Nº de vástagos sin blanqueo	27	19
	Nº de vástagos con blanqueo intermedio	19	24
	Nº de vástagos completamente blanqueados	12	17
5 µM	Nº de vástagos sin blanqueo	0	0
	Nº de vástagos con blanqueo intermedio	2	17
	Nº de vástagos completamente blanqueados	58	43

Unas plántulas T0 enraizadas fueron transferidas a tierra en el invernadero. A continuación de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que han crecido suficientemente se tratan con los diferentes herbicidas inhibidores de
 35 las HPPD. Como un ejemplo, las plantas T0 son rociadas con tembotriona del tipo de formulación WP20 a razón de 100 g de IA/ha suplementada con sulfato de amonio y 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.

Respuesta a tembotriona en pruebas en invernadero.

40 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 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.

5 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 %).
10 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.

Tabla 11:

Transgén	Número de plantas tratadas	Tembotriona, 100 g de IA/ha 7 DAT		
		Clase I	Clase II	Clase III
-	20	0	0	20
AtHPPD	23	1	13	9
FMP37e	23	1	6	16

15 En conclusión, puede observarse que las plantas de arroz que expresan la proteína FMP37 son más tolerantes a la aplicación del herbicida inhibidor de las HPPD tembotriona que las plantas de arroz del tipo silvestre.

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

20 Un vector binario para la transformación de soja es construido, por ejemplo, con el promotor CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP37t-h (SEQ ID N°. 15), 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 Tabaco Etch Virus = virus de corrosión de tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP37t-h se da en SEQ ID N°. 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también un casete del gen de PAT en el 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 un casete de gen 2mEPSPS en el 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. 3H). El vector binario fue denominado pFCO112.

Ejemplo 10: Establecimiento y selección de plantas T0 de soja

30 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 total, un 1,5 % 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 FMP37 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.

40 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.

45 Ocho sucesos que expresan la proteína de HPPD FMP37 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. Cuatro de los ocho sucesos no muestran ningún fenotipo de blanqueo y tenían 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. Otro suceso mostró síntomas

transitorios de blanqueo local, pero se recuperó completamente a los 7 días después de la aplicación de tembotriona. Los dos restantes sucesos exhibieron el mismo blanqueo que la planta de soja de tipo silvestre no transgénica después del tratamiento con tembotriona. Todos estos datos confirman que la FMP37 confiere tolerancia a los herbicidas inhibidores de las HPPD, como la tembotriona, en plantas de soja.

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

Un vector binario para la transformación de algodón es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP37t-h (SEQ ID N°. 15), 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 de corrosión de tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35. La secuencia de nucleótidos del gen FMP37t-h está dada en SEQ ID N°. 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también un casete del gen de PAT en el 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 el 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. 3J). El vector binario fue denominado pTSIH21.

Ejemplo 12: Establecimiento y selección de plantas T0 de algodón

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.

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.

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

Un vector binario para la transformación de plantas dicotiledóneas es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP37t-h (SEQ ID N°. 15), 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 FMP37t-h se da en la SEQ ID N°. 15. Adicionalmente el vector de transformación también contiene un casete de gen de PAT en el 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. 3G)

Los casetes de genes son finalmente clonados dentro del vector pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), y el vector final es denominado pHoe6/FMP37t-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.

45 **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 FMP37t-h (SEQ ID N°. 15), 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 de la corrosión del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35. La secuencia de nucleótidos del gen FMP37t-h está dada en SEQ ID N°. 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también un casete del gen de PAT en el 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 el 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. 3H). El vector binario fue denominado pFCO112. El anterior vector se usó para transformar discos de hojas obtenidos a partir 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 rociaron, respectivamente, con:

- 5 - glufosinato-amoni 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 evaluaron los síntomas causados por las respectivas aplicaciones de herbicidas, tal como se recopila en la Tabla 12, siguiente.

10 Las plantas fueron clasificadas en tres categorías basándose en el fenotipo desarrollado como respuesta al (a los) respectivo(s) herbicida(s) 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 %). Las plantas de tabaco no transgénicas fueron aniquiladas completamente por

15 un tratamiento que usaba uno o más de los anteriores herbicidas.

Tabla 12:

Glufosinato amonio 1.000 g de IA /ha				
9 DAT				
Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	Clase III
FMP37t-h	634	10	0	0
FMP37t-h	713	10	0	0
Glifosato 1.121 g de IA /ha				
9 DAT				
Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	Clase III
FMP37t-h	634	10	0	0
FMP37t-h	713	10	0	0
Tembotriona 100 g de IA /ha				
9 DAT				
Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	Clase III
FMP37t-h	634	0	3	7
FMP37t-h	713	0	6	4
Glifosato + tembotriona				
1.121 g de IA /ha + 100 g de IA /ha				
9 DAT				
Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	Clase III
FMP37t-h	634	0	5	5
FMP37t-h	713	0	2	8

20 Todos estos datos confirman que estas plantas que codifican varios genes de tolerancia que conciernen a herbicidas inhibidores de las HPPD, glifosato y glufosinato-amoni, confieren tolerancia a cualquiera de estos herbicidas aplicados a solas o en una combinación entre sí.

Esta es la primera vez en que unas plantas transgénicas que contienen estos tres genes de tolerancia en un único lugar (locus) exhiben una tolerancia a herbicidas a tales herbicidas en una tasa de aplicación que es de relevancia

25 agronómica.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer CropScience AG
- 30 <120> Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD
- <130> BCS 09-1040-PCT

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

5

<210> 1

<211> 1149

<212> ADN

<213> *Blepharisma japonicum*

10

<400> 1

```

atgacttatt acgacaagca agaaacgcgt ccagatcttg gcgaattcta tggtttccat      60
cacgttcggt tttacgtctc caactcagag caagccgctt cgttctacac atctcgcttt      120
gggttttctc cgggtgccta tgaaggattg gaaacaggaa accaaaaatt ctgtaccaat      180
gtcgtccgaa gcaaccatgt agtcatcgtt tttacctcag ctctcactcc tgaagacaat      240
gaagtgaacc gtcacgttgg caagcatagt gatggagttc aagacattgc ctttagtgta      300
agtgacgcaa gagggatgta tgagaaagcg atagctaaag gctgtaaaag cttccgtgag      360
ccacaggttt tacaagatca atttggatct gttataatag cgtctctcca gacttatgga      420
gacactgttc acacattagt ccaaaatgtc gactatacag gacccttttt gcctggcttc      480
agagcaatca caaaagatga tccattaaac tctgcctttc ctcaggtaaa ttatgacatt      540
attgatcatg ttgtaggaaa tcagcctggt ggcgatatga ctctacagt agaatggtat      600
gagaaatatc tagaatttca tcgatattgg tctgctgatg agtctgtaat ccataccgat      660
tattcagcat taaggctctg tgtggttgcg gattgggatg aagtgatcaa aatgcctatt      720
aatgagcctg ctgatggact tagaaaaagt caaatccaag aatatgtcga atattatggt      780
ggagcagggc tacaacatat tgccttaaaa gtcaatgata ttatttcagt aataagcacc      840
ttaagggcta gaggtgtgga attccttagaa gttcctccta aatattatga tagcttaaga      900
aaaagacttg cgcattctgc ggtacaaatt gaagaagact taaaaagaat tgaagacctt      960
catattttgg ttgactttga cgaccgtggg tatttacttc agattttcac aaaaccagta     1020
gaagacagac ctactctggt ttatgaaatt attcaaagac ataataacaa tggattcgga     1080
attggaaatt ttaaagccct atttgaatca ttggaacaag agcaagaaag aagaggtaat     1140
ttgatctaa                                     1149
    
```

15

<210> 2

<211> 1170

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para *E. coli*, que contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina.

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> Secuencia que codifica Ala

ES 2 668 198 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(24)
 <223> Secuencia que codifica una marca His que contiene 6 His
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(24)
 <223> Secuencia que codifica una marca HIS que contiene 6 HIS
 10
 <400> 2

 atggcgcac atcatcacca tcacacgtat tatgacaaac aggaaacccg ccctgatctg 60
 ggagagtttt atggctttca ccacgtacgc ttttacgtga gcaatagtga gcaagctgcc 120
 agcttttaca cgtcacgctt tgggttttct ccagtggcct atgaaggcct ggaaaccoggt 180
 aaccagaagt tctgtacgaa cgtggtacgc agcaatcatg tggatgatagc gtttaccagt 240
 gctctgactc ccgaagacaa cgaagttaac cggcatgtag gcaaaccattc ggatggcggt 300
 caggatattg cgtttagtgt gtctgatgct cgtgggatgt acgagaaagc catagcgaaa 360
 ggctgcaaat cctttcgga accccaagta ctgcaagatc agtttggtag cgttatcatt 420
 gcctccctcc agacatatgg tgatacagtg catacgcttg ttcaaacgt tgactatact 480
 ggtccgttct taccggggtt tcgcgctatt accaaagacg atccgctcaa ttccggcgttc 540
 ccacaagtga actatgacat catcgatcac gtggtgggta atcagccggg tggagatatg 600
 acccctactg tggaatggta cgaaaagtat ctgcaattcc accgctactg gagtgcgat 660
 gaaagcgtca ttcacaccga ttatagcgcg ttacggtcgg ttgtcgtagc cgactgggat 720
 gaagtgatca aatgccgat taacgaacca gcggtggct tgcgtaagtc gcagattcag 780
 gagtatgtcg agtactatgg tggggcagga gtgcaacata tcgcactgaa agtcaatgac 840
 atcatttccg tcatctcaac gttgcgtgca cgtggcgttg agttcctgga agttccgccg 900
 aagtactatg atagccttcg caaacgcctg gcacattcag cggtcagat cgaagaagac 960
 ctgaaacgta ttgaggactt gcatattctg gttgatttcg acgatcgtgg ttacctttta 1020
 cagattttca ccaaaccggg cgaagatcgt cctaccctgt tctacgagat cattcagcgc 1080
 cacaataaca atggctttgg cattggcaac ttcaaagcac tgtttgaatc tctggagcaa 1140
 gaacaggaac gtcgcgggaa tctgatctaa 1170
 15
 <210> 3
 <211> 1545
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para *Nicotiana tobaccum* que contiene en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca HIS
 25
 <220>

ES 2 668 198 T3

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

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (376)..(378)
 <223> secuencia que codifica un Met

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (379)..(381)
 <223> secuencia que codifica un Ala

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (382)..(399)
 <223> secuencia que codifica una marca HIS constituida por 6 HIS

20 <400> 3

atggcttcta	tttcttcttc	tgtggctact	gtttctagga	ctgctccagc	tcaagctaat	60
atggtggctc	cattcacagg	cttgaaatcc	aatgctgctt	tccaactac	taagaaggct	120
aacgatttct	ctactctccc	atctaattgt	ggaaggggtc	agtgtatgca	agtttgcca	180
gcttacggaa	ataagaagtt	cgagactctt	tcttaccttc	caccactttc	tatggctcca	240
actgtgatga	tggcttcttc	tgctaactgt	gttgctccat	tccaaggatt	gaagtctact	300
gcttctttgc	cagttgctag	aaggctcatct	cgttctcttg	gaaacgtttc	taacggtgga	360
aggattagat	gtgctatggc	tcatcatcat	caccatcaca	cttactacga	taagcaagag	420
actagaccag	atcttggaga	gttctacgga	ttccaccatg	ttaggttcta	cgtgtctaata	480
tctgagcaag	ctgcttcttt	ctacaacttc	cgtttcggat	tttctccagt	tgcttacgaa	540
ggacttgaga	ctggaaatca	gaagttctgc	actaacggtg	ttaggtctaa	ccacgtggtg	600
attgctttta	cttctgctct	cactccagag	gataatgagg	ttaacaggca	tgttgaaaag	660
cactctgatg	gtgttcagga	tattgctttc	tctgtgtctg	atgctagagg	aatgtacgag	720
aaggctattg	ctaagggatg	caagtctttc	agagagccac	aagttcttca	agatcagttc	780
ggatccgtga	ttattgcttc	ccttcagact	tacggtgata	ctgttcacac	tctcgttcag	840
aacgttgatt	acactggacc	attccttcca	ggtttcaggg	ctatcactaa	ggatgatcca	900
cttaactctg	ctttcccaca	ggtgaaactac	gatatcattg	atcacgttgt	gggaaatcag	960
ccaggtggag	atatgactcc	aactggtgag	tggtacgaga	agtaccttga	gtttcacagg	1020
tattggagtg	ctgatgagtc	tgtgatccac	actgattact	ctgctcttag	atctgttgtt	1080

ES 2 668 198 T3

gtggctgatt gggatgaggt tatcaagatg cctattaacg aaccagctga tggacttagg 1140
aagtcccaga ttcaagagta cgttgagtat tatgggtggag ctgggtgttca acacattgct 1200
ctcaaggtga acgatatcat ttccgtgatt tccactctta gagctagagg agttgagttt 1260
cttgaagtcc caccaaagta ctacgattct ctcagaaaga ggcttgctca ttctgctggt 1320
cagatcgaag aggatcttaa acgtattgag gaccttcaca tctctgtgga ttttgatgat 1380
aggggatacc ttctccagat tttcactaag ccagttgagg ataggccaac tttgttctac 1440
gagatcatcc aaaggcataa caacaacgga ttcggaatcg gaaatttcaa ggctcttttc 1500
gagtctcttg agcaagaaca agagagaagg ggaaacctca tctga 1545

<210> 4

<211> 382

<212> PRT

<213> *Blepharisma japonicum*

5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 668 198 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 389

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína codificada por SEQ ID N°. 2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Ala

5

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(8)
<223> Marca HIS constituida porf 6 HIS

10

<400> 5

ES 2 668 198 T3

Met Ala His His His His His His Thr Tyr Tyr Asp Lys Gln Glu Thr
1 5 10 15

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

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

Phe Ser Pro Val Ala Tyr Glu Gly Leu Glu Thr Gly Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Cys Thr Asn Val Val Arg Ser Asn His Val Val Ile Ala Phe Thr Ser
65 70 75 80

Ala Leu Thr Pro Glu Asp Asn Glu Val Asn Arg His Val Gly Lys His
85 90 95

Ser Asp Gly Val Gln Asp Ile Ala Phe Ser Val Ser Asp Ala Arg Gly
100 105 110

Met Tyr Glu Lys Ala Ile Ala Lys Gly Cys Lys Ser Phe Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Leu Gln Asp Gln Phe Gly Ser Val Ile Ile Ala Ser Leu Gln
130 135 140

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

Gly Pro Phe Leu Pro Gly Phe Arg Ala Ile Thr Lys Asp Asp Pro Leu
165 170 175

Asn Ser Ala Phe Pro Gln Val Asn Tyr Asp Ile Ile Asp His Val Val
180 185 190

Gly Asn Gln Pro Gly Gly Asp Met Thr Pro Thr Val Glu Trp Tyr Glu
195 200 205

Lys Tyr Leu Glu Phe His Arg Tyr Trp Ser Ala Asp Glu Ser Val Ile

ES 2 668 198 T3

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

- <210> 6
- <211> 507
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Blepharisma japonicum* (SEQ ID N°. 4) fusionada con OTP (péptido de tránsito optimizado (WO 2009/144079))
- <220>
- <221> TRÁNSITO
- <222> (1)..(125)
- 15 <223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos
- <400> 6

ES 2 668 198 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 Tyr
 115 120 125

Tyr Asp Lys Gln Glu Thr Arg Pro Asp Leu Gly Glu Phe Tyr Gly Phe
 130 135 140

His His Val Arg Phe Tyr Val Ser Asn Ser Glu Gln Ala Ala Ser Phe
 145 150 155 160

Tyr Thr Ser Arg Phe Gly Phe Ser Pro Val Ala Tyr Glu Gly Leu Glu
 165 170 175

Thr Gly Asn Gln Lys Phe Cys Thr Asn Val Val Arg Ser Asn His Val
 180 185 190

Val Ile Ala Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Glu Asp Asn Glu Val Asn
 195 200 205

Arg His Val Gly Lys His Ser Asp Gly Val Gln Asp Ile Ala Phe Ser
 210 215 220

Val Ser Asp Ala Arg Gly Met Tyr Glu Lys Ala Ile Ala Lys Gly Cys
 225 230 235 240

Lys Ser Phe Arg Glu Pro Gln Val Leu Gln Asp Gln Phe Gly Ser Val
 245 250 255

Ile Ile Ala Ser Leu Gln Thr Tyr Gly Asp Thr Val His Thr Leu Val
 260 265 270

ES 2 668 198 T3

Gln Asn Val Asp Tyr Thr Gly Pro Phe Leu Pro Gly Phe Arg Ala Ile
 275 280 285

Thr Lys Asp Asp Pro Leu Asn Ser Ala Phe Pro Gln Val Asn Tyr Asp
 290 295 300

Ile Ile Asp His Val Val Gly Asn Gln Pro Gly Gly Asp Met Thr Pro
 305 310 315 320

Thr Val Glu Trp Tyr Glu Lys Tyr Leu Glu Phe His Arg Tyr Trp Ser
 325 330 335

Ala Asp Glu Ser Val Ile His Thr Asp Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Val
 340 345 350

Val Val Ala Asp Trp Asp Glu Val Ile Lys Met Pro Ile Asn Glu Pro
 355 360 365

Ala Asp Gly Leu Arg Lys Ser Gln Ile Gln Glu Tyr Val Glu Tyr Tyr
 370 375 380

Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Leu Lys Val Asn Asp Ile Ile
 385 390 395 400

Ser Val Ile Ser Thr Leu Arg Ala Arg Gly Val Glu Phe Leu Glu Val
 405 410 415

Pro Pro Lys Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg Lys Arg Leu Ala His Ser Ala
 420 425 430

Val Gln Ile Glu Glu Asp Leu Lys Arg Ile Glu Asp Leu His Ile Leu
 435 440 445

Val Asp Phe Asp Asp Arg Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
 450 455 460

Val Glu Asp Arg Pro Thr Leu Phe Tyr Glu Ile Ile Gln Arg His Asn
 465 470 475 480

Asn Asn Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Leu
 485 490 495

Glu Gln Glu Gln Glu Arg Arg Gly Asn Leu Ile
 500 505

<210> 7
 <211> 514
 <212> PRT

ES 2 668 198 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína codificada por la SEQ ID N°. 3

5 <220>
 <221> TRÁNSITO
 <222> (1)..(125)
 <223> Péptido de tránsito optimizado para cloroplastos

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (127)..(127)
 <223> Ala

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (128)..(133)
 <223> Marca HIS constituida por 6 HIS

20 <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
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	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Gln	Glu	Thr	Arg	Pro	Asp
	130					135					140				
Leu	Gly	Glu	Phe	Tyr	Gly	Phe	His	His	Val	Arg	Phe	Tyr	Val	Ser	Asn
145					150					155					160
Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Ser	Phe	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Gly	Phe	Ser	Pro
				165					170					175	

ES 2 668 198 T3

Val Ala Tyr Glu Gly Leu Glu Thr Gly Asn Gln Lys Phe Cys Thr Asn
180 185 190

Val Val Arg Ser Asn His Val Val Ile Ala Phe Thr Ser Ala Leu Thr
195 200 205

Pro Glu Asp Asn Glu Val Asn Arg His Val Gly Lys His Ser Asp Gly
210 215 220

Val Gln Asp Ile Ala Phe Ser Val Ser Asp Ala Arg Gly Met Tyr Glu
225 230 235 240

Lys Ala Ile Ala Lys Gly Cys Lys Ser Phe Arg Glu Pro Gln Val Leu
245 250 255

Gln Asp Gln Phe Gly Ser Val Ile Ile Ala Ser Leu Gln Thr Tyr Gly
260 265 270

Asp Thr Val His Thr Leu Val Gln Asn Val Asp Tyr Thr Gly Pro Phe
275 280 285

Leu Pro Gly Phe Arg Ala Ile Thr Lys Asp Asp Pro Leu Asn Ser Ala
290 295 300

Phe Pro Gln Val Asn Tyr Asp Ile Ile Asp His Val Val Gly Asn Gln
305 310 315 320

Pro Gly Gly Asp Met Thr Pro Thr Val Glu Trp Tyr Glu Lys Tyr Leu
325 330 335

Glu Phe His Arg Tyr Trp Ser Ala Asp Glu Ser Val Ile His Thr Asp
340 345 350

Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Val Val Val Ala Asp Trp Asp Glu Val Ile
355 360 365

Lys Met Pro Ile Asn Glu Pro Ala Asp Gly Leu Arg Lys Ser Gln Ile
370 375 380

Gln Glu Tyr Val Glu Tyr Tyr Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala
385 390 395 400

Leu Lys Val Asn Asp Ile Ile Ser Val Ile Ser Thr Leu Arg Ala Arg
405 410 415

Gly Val Glu Phe Leu Glu Val Pro Pro Lys Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg
420 425 430

ES 2 668 198 T3

Lys Arg Leu Ala His Ser Ala Val Gln Ile Glu Glu Asp Leu Lys Arg
435 440 445

Ile Glu Asp Leu His Ile Leu Val Asp Phe Asp Asp Arg Gly Tyr Leu
450 455 460

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Glu Asp Arg Pro Thr Leu Phe Tyr
465 470 475 480

Glu Ile Ile Gln Arg His Asn Asn Asn Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe
485 490 495

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

Leu Ile

<210> 8

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

5

ES 2 668 198 T3

atgtgtctat cgttagcttc tacagctcaa ogaaacacac agttccgtag cagagtttta 60
gtttttagcag agttggtgaa atcaatgggc caccaaaacg ccgccgtttc agagaatcaa 120
aaccatgatg acggcgctgc gtcgctcgccg ggattcaagc tcgtcggatt ttccaagttc 180
gtaagaaaga atccaaagtc tgataaattc aaggttaagc gcttccatca catcgagttc 240
tgggtgcgcg acgcaaccaa cgtcgctcgt cgcttctcct ggggtctggg gatgagattc 300
tccgccaaat ccgatctttc caccggaaac atggttcacg cctcttacct actcacctcc 360
ggtgacctcc gattcctttt cactgctcct tactctccgt ctctctccgc cggagagatt 420
aaaccgacaa ccacagcttc tatcccaagt ttogatcacg gctcttgcg ttctctcttc 480
tcttcacatg gtctcggtgt tagagccggt gcgattgaag tagaagacgc agagtcagct 540
ttctccatca gtgtagctaa tggcgctatt ccttcgtcgc ctctatcgt cctcaatgaa 600
gcagttacga tcgctgaggt taaactatac ggcgatgttg ttctccgata tgtagttac 660
aaagcagaag ataccgaaaa atccgaattc ttgccagggt tcgagcgtgt agaggatgcg 720
tcgtcgttcc cattggatta tggatccgg cggcttgacc acgccgtggg aaacgttctc 780
gagcttggtc cggctttaac ttatgtagcg gggttcactg gttttacca attcgcagag 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 cttctcctcc gcctacttac taccagaatc tcaagaaacg ggtcggcgac 1140
gtgctcagcg atgatcagat caaggagtgt gaggaattag ggattcttgt agacagagat 1200
gatcaaggga cgttgcttca aatcttcaca aaaccactag gtgacaggcc gacgatattt 1260
atagagataa tccagagagt aggatgcatg atgaaagatg aggaagggaa ggcttaccag 1320
agtggaggat gtggtggttt tggcaaaggc aatttctctg agctcttcaa gtccattgaa 1380
gaatacgaag agactcttga agccaaacag ttagtgggat ga 1422

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

5

<400> 9

ES 2 668 198 T3

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
 100 105 110

Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
 115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
 130 135 140

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160

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

ES 2 668 198 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 668 198 T3

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

5 <210> 10
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Proteína codificada por SEQ ID N°. 8 más una alanina adicional situada directamente corriente abajo del aminoácido inicial metionina seguido por 6 aminoácidos histidina

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(8)
 <223> Marca His constituido por 6 His

<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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 668 198 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Gly Ile 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

ES 2 668 198 T3

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 la SEQ ID N°. 9 más la secuencia del péptido de tránsito optimizado situada junto a la
 extremidad terminal de N de la proteína.

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

<400> 11

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 Gln Asn
 115 120 125

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

ES 2 668 198 T3

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

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

ES 2 668 198 T3

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

- <210> 12
- <211> 575
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Proteína de la SEQ ID N°. 10 más la secuencia de péptido de tránsito optimizado situada directamente junto a la extremidad de N de la proteína

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

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

- <220>

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

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (128)..(133)
 <223> Marca His constituída por 6 His

10 <400> 12

ES 2 668 198 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 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

ES 2 668 198 T3

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

- 5 <210> 13
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador XhoI-OTP-for

- <400> 13
- ctcgagatgg ctcgatctc ctctc 26

- 15 <210> 14
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador NcoI-OTP-rev

- <400> 14
- cccatggcgc accgattct tccgcc 26

- 25 <210> 15
- <211> 1152
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas dicotiledóneas

- 35 <400> 15

ES 2 668 198 T3

```

atggctactt actacgataa gcaagagact agaccagatc ttggagagtt ctacggattc      60
caccatgta  ggttctacgt gtctaattct gagcaagctg cttctttcta caottcccgt      120
ttcggatfff  ctccagttgc ttacgaagga cttgagactg gaaatcagaa gttctgcact      180

aacgttgta  ggtctaacca cgtggtgatt gcttttactt ctgctctcac tccagaggat      240
aatgaggta  acagggcatg tggaaagcac totgatggtg ttcaggatat tgctttctct      300
gtgtctgatg ctagaggaat gtacgagaag gctattgcta agggatgcaa gtctttcaga      360
gagccacaag ttottcaaga tcagttcggg tcagtgatta ttgcttccct tcagacttac      420
ggtgatactg ttcacactct cgttcagaac gttgattaca ctggaccatt ccttccaggt      480
ttcagggcta tcaactaagga tgatccactt aactctgctt tcccacaggt gaactacgat      540
atcattgatc acgttggtgg aaatcagcca ggtggagata tgactccaac tgttgagtgg      600
tacgagaagt accttgagtt tcacaggtat tggagtgtctg atgagtctgt gatccacact      660
gattactctg ctcttagatc tgttgtgtg gctgattggg atgaggttat caagatgcct      720
attaacgaac cagctgatgg acttaggaag tcccagattc aagagtacgt tgagtattat      780
ggtggagctg gtgttcaaca cattgctctc aaggtgaacg atatcatttc cgtgatttcc      840
actcttagag ctagaggagt tgagtttctt gaagtcccac caaagtacta cgattctctc      900
agaaagaggc ttgctcattc tgetgttcag atcgaagagg atcttaaacg tattgaggac      960
cttcacatcc tcgtggattt tgatgatagg ggataccttc tccagatfff cactaagcca     1020
gttgaggata ggccaacttt gttctacgag atcatccaaa ggcataaaca caacggattc     1080
ggaatcggaa atttcaaggc tcttttcgag tctcttgagc aagaacaaga gagaagggga     1140
aacctcatct ga                                                                1152

```

5 <210> 16
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de Zea mays

<400> 16

ES 2 668 198 T3

atggccaacct actacgacaa gcaggagact agaccggacc tgggcgagtt ctacgggttc 60
 catcacgtgc gcttctacgt gagcaacagc gagcaggctg ccagcttcta caccagccgc 120
 ttcggcttca gcccggtggc ctacgagggc cttgagactg gcaaccagaa gttctgcacc 180
 aacgtcgtgc gcagcaacca tgtggtgatc gccttcacca gcgcctgac ccccgaggac 240
 aacgaggtga accgccacgt gggcaagcac agcgacggcg tgcaggatat cgccttcagc 300
 gtgagcgagc ccaggggcat gtacgagaag gctatcgcca agggctgcaa gagcttcgc 360
 gagcctcagg tgctgcagga ccagttcggc agcgtgatca tcgccagcct gcagacctac 420
 ggcgacactg tgcacaccct ggtgcagaac gtggactaca ccggcccgtt cctcccgggc 480
 ttccgcgcca tcaccaagga cgaccgctg aacagcgctt tccccaggt gaactaogac 540
 atcatcgacc acgtggtggg caaccagcca ggcggcgaca tgaccccaac cgtcgagtgg 600
 tacgagaagt accttgagtt ccaccgctac tggctccgcg acgagagcgt gatccacacc 660
 gactacagcg ccctgcgcag cgtggtggtg gccgactggg acgaggtgat caagatgccg 720
 atcaacgagc cggctgacgg cctgcgcaag agccagatcc aggagtacgt tgagtactac 780
 gggggcgctg gcgtccagca tatcgccctg aaggatgaac acatcatcag cgtgatcagc 840
 actctgcgcg ccagggggcgt cgagttcctt gaggtgccgc cgaagtaeta cgacagcctc 900
 cgcaagegcc tggcccacag cgccgtgcag atcgaggagg acctgaagcg catcgaggac 960
 ctgcacatcc tgggtggactt cgacgaccgc ggctacctgc tgcagatctt caccaagccg 1020
 gtcgaggacc gcccgaccct gttctacgag atcatccagc gccacaacia caacggcttc 1080
 ggcacggcca acttcaaggc cctgttcgag agccttgagc aggagcagga gaggcgcggc 1140
 aacctgatct ga 1152

<210> 17

<211> 1152

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Brassica napus*

<400> 17

ES 2 668 198 T3

atggcaacct attacgataa gcaagaaact cggccagact tgggagagtt ctacggtttc 60
 catcatgtca gattttatgt ttccaatagc gaacaggccg cttcatttta cacttctagg 120
 ttcggcttta gccctgtagc gtacgaaggc cttgaaactg gtaaccagaa gttttgtact 180
 aacgttgtgc gttcaaacca tgtggtgatt gcgtttacta ggccttgac gcctgaagat 240
 aatgaggtta accgtcatgt ggtaagcac tctgacggtg tccaagatat cgctttcagc 300
 gttagcagtg cgcgtggaat gtatgaaaag gctattgcta agggttgtaa gtcgtttcgt 360
 gaaccacagg tacttcagga ccagttcggg tctgttatca tcgctagtct ccagacttac 420
 ggcgatacag ttcatactct tgtccaaaac gttgattata ccggaccatt cttaccagggc 480
 ttcagggcta tcaccaagga cgacccgttg aactccgcct ttctcaagt gaattatgat 540
 ataattgatc atgtcgtggg gaaccagccg ggtggagata tgactcccac tgttgagtgg 600
 tatgagaagt acctcgaatt tcacagatac tggagtgccg atgagagtgt gattcatact 660
 gattactccg cgcttagatc ggttgtcgtc gcggattggg atgaggtcat caaaatgccc 720
 attaacgaac cggctgatgg ccttcgaaaa tcgcaaatac aggagtacgt ggaatactat 780
 ggggggtcgtg gtgtccagca catcgccttg aaagttaacg acataatttc tgttatttct 840
 accctgcgtg ctagaggggt ggagttcctg gaagtgcctc cgaagtatta cgacagctta 900
 agaaaaagac tagctcacag cgccgtgcag atcgaggaag acctaaaag gattgaagac 960
 cttcatatcc tcgttgactt cgatgatagg ggatacttat tgcagatatt taccaagccg 1020
 gttgaggata ggcctacact tttctatgag attattcagc gccataacaa caacggtttc 1080
 ggtattggaa atttcaaagc tctctttgag agtcttgaac aggagcagga gcgtagggga 1140
 aacctcatct ga 1152

5 <210> 18
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Beta vulgaris*

<400> 18

ES 2 668 198 T3

```

atggcaacat actacgataa gcaggaaacc cgaccocgact tgggtgagtt ttacggattc      60
catcatgtgc gtttctacgt gtccaatagc gaacaagccg cttectteta tacgagtaga      120
tttggttttt caccoggtagc ctacgagggt ctggagactg gtaatcaaaa gttttgcaca      180
aatgtagtac gttcgaatca tgtggttadc gcatttactt cagcccttac accagaagac      240
aatgaagtca acaggcacgt ggggaagcat agcgacggtg ttcaagatat cgcatttagc      300
gtctcggacg cgaggggtat gtatgagaag gcaatcgcga aggggtgtaa gagttttaga      360
gaaccgcaag tgcttcaaga tcaattcggc tctggtatta tcgcctcttt acagacctac      420
ggggatactg ttcatacgcg tgtccagaat gtcgattaca caggaccatt tcttctgggt      480
tttagggcta ttactaaaga tgaccattg aattctgctt tcccgcaggt taattatgac      540
attatcgatc acgtcgttgg taatcagcct ggaggggata tgacaccac tgctcagtggt      600
tatgagaagt atttggaatt tcaccggtat tggagtgcctg acgagtcagt aatacatacc      660
gattattcag cactccgaag cgttgtagtc gctgactggg atgaggtaat taaaatgcca      720
atcaacgagc cagcagacgg tttgagaaag agtcagatac aggagtatgt tgaatactac      780
gggggtgcag gagtacaaca cattgcgctc aagggtgaacg atattatcag cgttattagc      840
actcttaggy ctaggggagt cgagtttctt gaagtaccgc caaaatatta tgatagcttg      900
agaaaaagat tagctcattc agctggtcaa attgaagaag acctcaaaag gattgaggac      960
ctacatattt tagtggactt tgatgataga ggttatttgc tccagatctt cacaaaacca     1020
gttgaggata gacctactct tttttatgag atcatacaac gacataataa taacggtttc     1080
ggaattggaa acttcaaggc tcttttcgaa tccttggaac aagaacaaga acggcgaggt     1140
aaccttatct ga                                                                1152

```

- <210> 19
- <211> 1152
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Gossypium hirsutum*

- <400> 19

ES 2 668 198 T3

atggccacct attatgacaa gcaagaaacc agaccagatc taggggaatt ctacggtttc 60
 catcatgttc gattctatgt tagcaactct gagcaagctg caagtttcta cacatcaagg 120
 tttggatttt cgccagtggc atatgaaggc ctggagactg gaaatcaaaa gttttgtaca 180
 aatgtggttc gttctaataca tgtcgtgac gcttttactt cagctctgac accggaggac 240
 aacgaagtga acaggcacgt tggaaagcat agtgatggtg tgcaggacat agctttttct 300
 gtttcggatg cgcgaggatg gtacgaaaag gccatcgcca agggatgtaa atccttcagg 360
 gaaccacagg tgttgcaaga tcaatttggga agtgtgataa ttgcatcgtt gcaaacttac 420
 ggggacacag tccacacttt ggtccaaaat gtggattaca ctggaccctt tcttccaggg 480
 tttcgagcaa taactaagga tgaccctctg aattcagctt tcccacaggt caattatgat 540
 ataattgatc acgttgttgg caaccaacca ggaggcgaca tgactcctac tgtggaatgg 600
 tatgagaaat acttgaatt tcacagatac tgggtccggc atgaaagcgt gatccatacc 660
 gattactctg cgctgagatc ggtggtggtc gctgactggg acgaggttat taaaatgcct 720
 attaatgaac ctgcggatgg tcttaggaag tctcaaactc aagaatacgt agagtactat 780
 ggaggggccc ggtccaaca cattgccttg aaggatgatg atatcataag cgtaatttcc 840
 actctaaggg cacgaggagt ggagttcttg gaggttcctc cgaagtacta cgattctctt 900
 agaaagaggc ttgccattc tgccgtccag atagaggagg atcttaaaag gattgaagac 960
 ctacatattc ttgttgattt tgacgatagg ggttacttgt tgcaaatttt cacaagcct 1020
 gttgaggaca gacctactct gttctacgaa atcatccaga gacataataa taatggtttt 1080
 ggtattggaa atttcaaagc attgtttgaa tctcttgaac aggaacaaga aaggaggggc 1140
 aacttgattt ga 1152

<210> 20

<211> 1152

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Glycine max*

<400> 20

atggccacat actatgataa acaggaaacc cgcccagacc taggagaatt ttatggtttt 60
 catcatgttc gattttatgt ttccaactca gagcaagctg cttcctttta cacttcgagg 120
 tttgattct cacccttgc ctatgaaggc ctcgaaaccg gtaatcagaa attttgtacc 180
 aatgtagtga gatcgaacca cgttgtaatt gcttttacia gtgctctcac gccagaagat 240
 aatgaggtga acagacacgt gggcaagcac tcagatggag tgcaagatat tgccttttcc 300

ES 2 668 198 T3

gtttccgacg ctaggggat gtacgagaag gccatcgcaa aggggtgtaa atcttttagg 360
 gaaccgcagg tactccagga tcagtttggg tccgttatca tcgcctctct gcgacttat 420
 ggtgacaccg tgcacacact tgttcaaaat gtggactaca cggggccggt cctccctgga 480
 tttagagcta taacgaagga tgatcctctt aacagtgctt tccccaggt gaactacgat 540
 attattgatc acgtagtagg aaaccagcca ggtggagata tgacccccac agtagagtgg 600
 tatgagaagt atctggaatt tcacoggtat tggagtgccg acgagtcagt tatccataca 660
 gattacagcg ccctcagatc cgtggtggta gctgactggg acgaggttat aaagatgcct 720
 atcaatgagc ccgcagatgg attacgcaa tctcaaattc aagagtatgt agagtattat 780
 ggcggagccg gggttcaaca tattgctcta aaagtaaag atataatcag tgtcatttca 840
 aactccgtg ccaggggtgt ggagtttctg gaggtgcccc caaagtacta cgatagcttg 900
 aggaaaaggc ttgcacattc agccgtgcaa attgaagaag atttaaagcg gattgaagat 960
 ttgcacatat tggtagattt tgacgataga ggatatcttc tccaaatttt cacaaaacca 1020
 gtcgaggacc gcccaacact gttttacgag atcattcagc gccataaca taacggtttt 1080
 ggaattggga acttcaaggc gttgtttgag agccttgaac aggagcagga aagaagagga 1140
 aacttaatct ga 1152

<210>21

<211> 1152

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Hordeum vulgare*

<400>21

ES 2 668 198 T3

```

atggccactt attacgacaa gcaggagaca cggccggact tgggagagtt ttacggattt      60
caccacgtaa ggttttacgt gtctaacagt gagcaagcag ccagcttcta cacctctcgg      120
ttcggctttt caccgggtgc gtacgagggga cttgagaccg gtaaccagaa gttctgtacg      180
aatgtggtga ggagcaatca cgttgtgatt gcgtttacat ctgcccttac ccccgaggat      240
aatgaggtca atcgacacgt gggtaaacac tcggacggcg tgcaagatat cgcattctct      300
gtttctgatg ccoggggaat gtatgagaag gccatcgcca agggctgcaa gtccttccgc      360
gagccacagg tcctacaaga ccagttcggc tccgtcatta tcgcctcact tcagacotac      420
ggggacaccg tgcatacgt cgttcagaac gtggactaca ccgggccctt cctcccaggc      480
tttcgggcca tcacaaagga tgacccgcta aactccgcct tccccaggt gaattatgac      540
attatcgatc acgtttagg caatcagccc ggcggtgata tgaccccgac agtggagtg      600
tacgagaagt atttgagtt tcatcgctat tggtcggcgg acgagtcagt gatacacacc      660
gactacagcg ccctcaggag cgtggtggtc gccgattggg atgaggtgat caagatgccg      720

atcaacgagc ccgcgatgg gctaaggaaa agccagatcc aagagtaoqt cgagtattat      780
ggcggagccg gtgtccagca cattgogctc aaggttaacg acataatctc ggtgatctcc      840
accctccgcg ccaggggctg ggagttccta gaggtgccac ctaaatacta cgattctttg      900
cgcaagecggc tcgcgcattc cgctgtccag atcgaggaag atttaaagag gatagaggat      960
ctacatatac tggttgattt cgatgaccgc ggctacctcc tgcagatctt tacgaagcct     1020
gtcgaggatc gtcccacgct cttctacgag attatccaaa ggcataataa caacggtttt     1080
gggatcggca acttcaaggc tttgttcgaa tccttagagc aggagcagga gcgtagggga     1140
aacctgatct ga                                                                1152

```

<210> 22

<211> 1152

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Oryza sativa*

<400> 22

5

10

ES 2 668 198 T3

```

atggccacct actacgacaa acaggagacc cgccccgata ttggtgaatt ttatggtttc      60
catcatgtga ggttttacgt ctccaacagc gagcaagccg cgtcgtttta cacctcgccg      120
tttggctttt ccccggtagc ttacgaaggc ctcgaaacag gtaaccagaa attctgtacg      180
aacgtcgtcc ggagcaatca tgttgtgata gcctttacgt ccgcgcttac gccagaggac      240
aacgaagtga accgccacgt cgggaagcac agcgatggtg tccaggatat tgcgttcagc      300
gtctcagatg cccgcgggat gtacgaaaag gccatcgcaa agggctgcaa gtcattccgc      360
gagccccagg tgttgcaaga ccagttcggg tccgtgatta tagcgtcact acagacgtac      420
ggggacaccg tacacactct cgtacagaat gttgactata ccgggcgctt cttaccaggc      480
tttagggcta taacgaagga cgaccctctg aactctgctt tcccacaggt caattacgac      540
ataatagacc acgtagtcgg caatcagcca ggcggagata tgacccccac agttgagtgg      600
tacgagaaat atcttgaatt ccatagatac tggagtgccg atgaatcggg cattcatact      660
gattactctg ccttgccggtc agtcgtggtg gccgactggg acgaggtcac taagatgccc      720
atcaacgaac ctgcccagcg attgcgaaaag tctcaaatcc aggagtacgt ggaatattac      780
ggcgggtgcag gggttcagca tattgctctt aaagtcaatg acattatctc agtgatctcg      840
acgcttcgcg cacgcggcgt agagtttttg gaagtgccac caaataacta cgatagtctg      900
aggaagcgtc tcgcgcattc tgccgtccag atcgaggaag acctcaaaag gattgaggat      960
ctacacatat tgggtgattt tgacgatagg gggtaacctc tgcagatttt cactaaacca     1020
gttgaagacc ggccgacttt gttctacgaa atcattcagc ggcataacia caacgggttt     1080
ggtattggta actttaaggc tctctttgag agtcttgagc aggaacaaga gcgcagggga     1140

aacctcatct ga                                                                1152

```

<210> 23

<211> 1152

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Blepharisma japonicum* optimizada para plantas de *Triticum aestivum*

<400> 23

ES 2 668 198 T3

atggcgacgt actacgacaa acaagagacc agaccagacc ttggggagtt ctacggcttc	60
catcacgtta ggttttatgt ctcaaattct gagcaggccg cctctttcta tacatcgagg	120
ttcggtttct caccggtcgc ctacgagggg ctggagaccg gcaaccagaa gttctgtacg	180
aacgttgctc ggagtaacca cgtcgtgata gcatttacga ggccttgac tccagaggac	240
aacgaggtta accgccacgt tggcaagcat tccgatggtg tacaggacat tgccttcagc	300
gtctctgacg ccaggggtat gtacgagaaa gcaatagcga agggatgtaa gagcttccgt	360
gagcctcagg ttttgcagga tcaattcggg tccgtcatca tcgcttcttt gcagacctac	420
ggggacacog tccataccct cgtgcaaaac gtgcactata cgggcccggt cctcccaggg	480
ttcagagcga ttaccaagga cgtcctctg aactcggcct tcccgcaagt caactacgac	540
atcattgac atgtcgtcgg caatcaacca ggccggcgaca tgacgccgac tgtcaggtgg	600
tacgagaagt accttgagtt tcataggtat tggctccgcg atgagagcgt catccacact	660
gactatagcg cccttaggtc tgttgtcgtt gccgactggg atgaggtcat caaaatgccg	720
atcaacgagc ccgctgacgg tctacgcaa tctcagatcc aggaatacgt cgagtactac	780
ggtggagcag gggtgcaaca tattgccta aagggtcaatg atataatctc cgttattagc	840
acactccgcg ccaggggagt ggaattctta gaggtacctc cgaataacta cgactctttg	900
aggaagaggt tggctcatag tgccgtccaa atcgaggagg atctgaaaag aatcgaggac	960
ttgcatattc tcgttgactt tgacgatagg ggttatctac tccaaatctt tactaagccg	1020
gtcagaggaca gaccgacctt gttctacgag atcatccaac gtcacaacaa caacggcttc	1080
ggaattggca acttcaaggc cctgtttgaa tctctggaac aggagcagga gcgacggggg	1140
aatctaattt ga	1152

REIVINDICACIONES

1. Un gen quimérico que comprende una secuencia de codificación enlazada operativamente a un promotor expresable en plantas, este último siendo un elemento regulador heterólogo para la secuencia de codificación, **caracterizado porque** la secuencia de codificación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°. 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382 o una proteína de HPPD con al menos una identidad de secuencia de por lo menos el 80 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°. 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 382, presentando las propiedades de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato en homogentisato, y siendo menos sensible a un herbicida inhibidor de la HPPD que la HPPD endógena de la planta hospedadora.
2. El gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende corriente arriba de la secuencia codificadora de HPPD, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito activo en las plantas, de manera tal que una proteína de fusión del péptido de tránsito/HPPD es codificada por dicho gen quimérico.
3. Un vector que comprende por lo menos un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 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 hasta 3.
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 (preeferato deshidrogenasa).
6. La célula de planta, parte de planta, planta o semilla de la reivindicación 4 o 5, que comprende también uno o varios genes quiméricos que confieren tolerancia a los 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).
7. Un procedimiento de obtención de una planta tolerante a un herbicida inhibidor de la HPPD, caracterizado porque un gen quimérico es introducido en dicha planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 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 tratar dicha planta con un herbicida inhibidor de la HPPD, cosechar los granos y moler los granos para producir la harina y opcionalmente extraer el aceite.
9. Uso de una proteína de HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°. 4 o una proteína de HPPD con una identidad de secuencia de por lo menos el 80 % de la SEQ ID N°. 4 y dicha proteína de HPPD presenta las propiedades de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato en homogentisato para volver las plantas tolerantes a los herbicidas inhibidores de la HPPD.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los herbicidas inhibidores de la HPPD se seleccionan entre el grupo que consiste en isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topramezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ fenil)propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona, dicetonitrilo y pirazoxifeno.

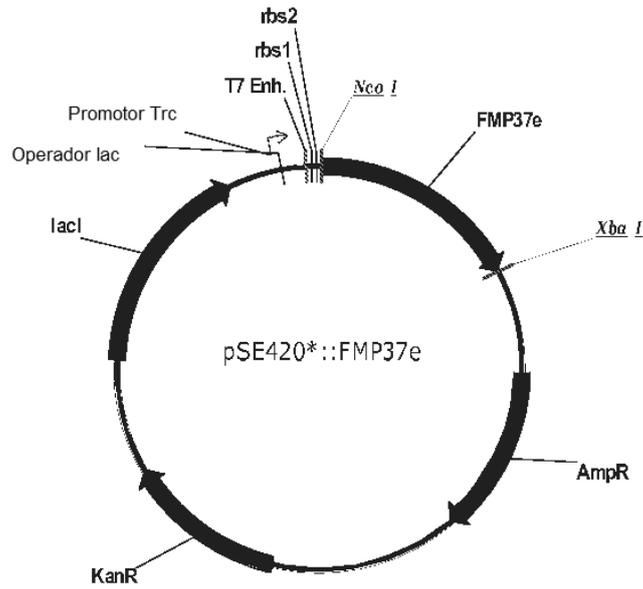


Figura 1: mapa del plásmido pSE420-FMP37e

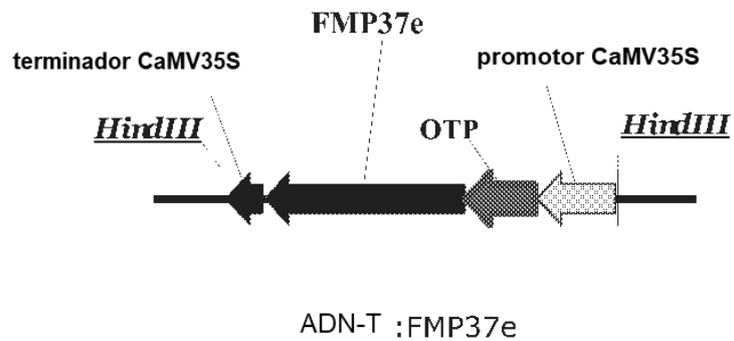


Figura 2: mapa del ADN-T insertado en las plantas de tabaco.

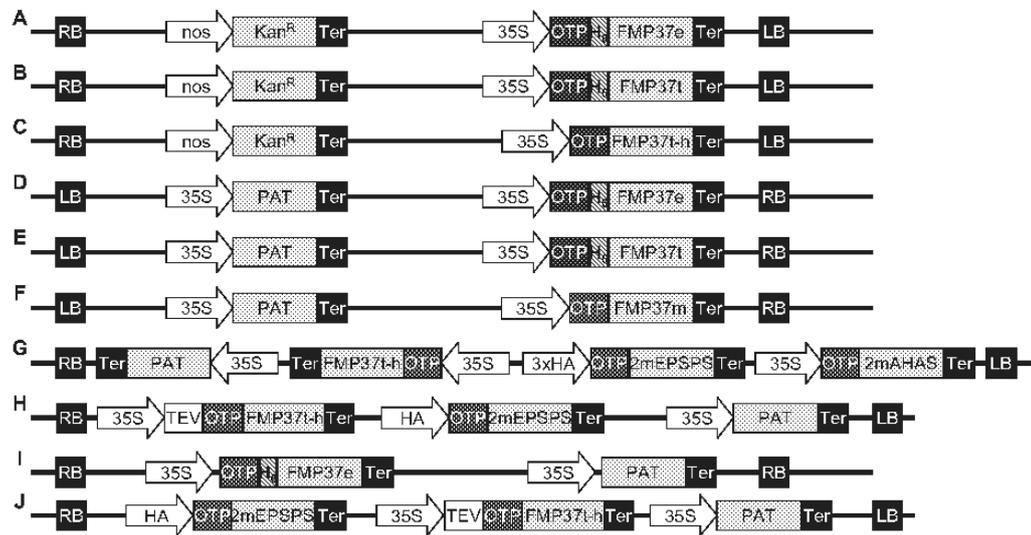


Figura 3: mapa de diferente ADN-T insertado en las plantas.