

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 690**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2013 PCT/US2013/034802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13151929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2013 E 13772583 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2833712**

54 Título: **Análisis de compuesto herbicida**

30 Prioridad:

05.04.2012 US 201261620952 P

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

19.10.2018

73 Titular/es:

**KOCH BIOLOGICAL SOLUTIONS, LLC (100.0%)
3935 Point Eden Way
Hayward, CA 94545-3702, US**

72 Inventor/es:

ARMSTRONG, JOSHUA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 686 690 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

5 Análisis de compuesto herbicida

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para la identificación de composiciones herbicidas.

Antecedentes

10 El mercado mundial de los herbicidas es un mercado amplio, creciente y que abarca todos los continentes. Las especies agrícolas objetivo para la protección incluyen los principales cultivos en hileras (p. ej., maíz, soja y arroz), pero la aplicación dominante se encuentra en las plantas de cereal valoradas en más de 3 mil millones de dólares al año. Los herbicidas existentes usan diversos mecanismos para matar plantas, tales como la inhibición de la síntesis de lípidos, la inhibición de la síntesis de aminoácidos, la regulación del crecimiento (auxinas sintéticas), la inhibición de la fotosíntesis, la inhibición del metabolismo del nitrógeno, la inhibición de la pigmentación, la disrupción de membranas celulares o la inhibición del crecimiento radicular o del vástago. La rápida aparición y propagación de las malas hierbas resistentes a los herbicidas supone un reto significativo. A pesar de rotar los herbicidas con diferentes mecanismos de acción para reducir la aparición de resistencia, cada vez resulta más evidente a partir de la propagación de la resistencia al glifosato que los herbicidas adicionales podrían ser necesarios para la gestión de cultivos, por lo que se requieren enfoques innovadores para el descubrimiento de herbicidas.

25 WO2004/022780 se refiere a un método para identificar compuestos con una acción herbicida. WO00/42205 se refiere a genes aislados de Arabidopsis que codifican proteínas esenciales para el crecimiento de los vástagos y métodos de uso de estas proteínas para descubrir nuevos herbicidas.

30 La presente descripción proporciona un enfoque novedoso para el descubrimiento de herbicidas con mecanismos nuevos que usan rutas vegetales involucradas en la muerte celular y procesos de desarrollo crítico que se pueden usar para identificar y priorizar compuestos herbicidas novedosos (y formulaciones de compuestos múltiples).

35 Se proporcionan ejemplos de cómo emplear estas rutas reguladoras de la planta para identificar herbicidas útiles. Otros aspectos y realizaciones de la presente descripción se describen a continuación y pueden derivarse de las enseñanzas de esta descripción en su conjunto.

Resumen

40 La presente descripción proporciona un método para identificar una composición herbicida activa que comprende compuestos que pueden potenciar las rutas reguladoras tóxicas de la planta. Los compuestos de la composición herbicida activan sinérgicamente las rutas reguladoras de la planta para inhibir el crecimiento de las células vegetales o matarlas, a pesar de su falta de función herbicida cuando actúan individualmente.

45 La presente invención proporciona un método para identificar una composición efectiva como herbicida que daña o mata las células de una planta objetivo, comprendiendo el método:

- 50 (a) proporcionar una primera planta y una segunda planta de la misma especie vegetal;
- (b) identificar una ruta reguladora capaz de dañar o matar un miembro de la especie vegetal cuando la actividad de la ruta reguladora se aumenta en el miembro de la especie vegetal;
- (c) aumentar condicionalmente la actividad de la ruta reguladora a un nivel sub-letal en la primera planta mediante su transformación con un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido regulador tóxico bajo el control de un impulsor inducible que puede activarse por medio de un tratamiento químico o medioambiental, y en donde, a falta de activación por tratamiento químico o medioambiental, el polipéptido regulador tóxico no mata a la primera planta;
- (d) identificar un primer compuesto que es más efectivo para dañar o matar a la primera planta que a la segunda planta, donde la actividad de la ruta reguladora no se incrementa cuando el primer compuesto entra en contacto con la primera y la segunda plantas; e
- 55 (e) identificar un segundo compuesto que,
- (1) cuando se combina con el primer compuesto en una composición activa, es capaz de dañar o matar a la segunda planta cuando la segunda planta entra en contacto con la composición activa; y
- (2) cuando entra en contacto con la segunda planta en una composición que carece del primer compuesto, es menos efectiva a la hora de dañar o matar a la segunda planta que la composición activa.

60 La identificación de las rutas reguladoras de la planta que se pueden inducir para conferir toxicidad o muerte celular facilitará el desarrollo de un primer método de selección para compuestos que pueden potenciar la ruta reguladora tóxica. Este método de selección incluye el uso de:

- 65 (i) un polinucleótido transformado en una planta que codifica un "polipéptido regulador tóxico" inducible que confiere toxicidad o muerte celular a la planta cuando se expresa;

(ii) un factor de inducción aplicado de manera exógena a la planta transformada para inducir la expresión del polipéptido regulador tóxico endógeno en una medida sub-letal;
 (iii) un compuesto herbicida que se aplica de manera exógena a la planta que es herbicida para la planta transformada a la cual se ha aplicado el factor de inducción debido a los efectos sinérgicos del co-herbicida y el polipéptido regulador tóxico inducido; y
 (iv) un “factor potenciador” que actúa para potenciar la ruta reguladora tóxica y provoca la expresión de un polipéptido regulador tóxico endógeno en una planta no transformada (por ejemplo, una planta de mala hierba). Este método de análisis se puede usar, por lo tanto, para determinar cantidades eficaces del compuesto co-herbicida aplicado de manera exógena y el factor potenciador en la planta no transformada que sean suficientes para dañar o matar a la planta no transformada.

En un aspecto de esta descripción, se identifica un polipéptido regulador tóxico que forma parte de la ruta reguladora de la planta que confiere toxicidad o muerte celular. Una línea vegetal se transforma con un polinucleótido que codifica el polipéptido regulador tóxico; en una realización preferida, la expresión del polipéptido regulador tóxico está regulada por un impulsor inducible. Mediante el uso de un nivel establecido de manera experimental de un factor de inducción aplicado exógenamente, el polipéptido regulador tóxico se expresa en la planta transformada a un nivel sub-letal. Un ejemplo de un factor de inducción adecuado es la dexametasona, igual que cuando la expresión del polipéptido regulador está regulada por un impulsor inducible por dexametasona. Dichos niveles sub-letales del factor de inducción se pueden aplicar a la línea o líneas de plantas transformadas en combinación con uno o más compuestos de prueba para identificar “co-herbicidas” que carecen de actividad herbicida cuando se aplican solos, pero que son herbicidas cuando los niveles sub-letales del polipéptido regulador inducible se expresan en la planta. En una etapa posterior del método de selección, los co-herbicidas se pueden aplicar a plantas no transformadas o sin el factor de inducción a las plantas transformadas para identificar los factores potenciadores, otra clase de compuestos que actúan para potenciar la ruta reguladora tóxica. Este método de selección permite determinar las cantidades eficaces del compuesto co-herbicida aplicado de manera exógena y el factor potenciador que son suficientes para dañar o matar a la planta no transformada.

La presente solicitud también corresponde a los genes marcadores de las rutas reguladoras tóxicas de la planta que se identifican a través de estudios de perfilado transcripcional del genoma completo, basados en su capacidad de ser inducidos tras el aumento de la actividad de la ruta reguladora de la planta. En una realización del método, la célula vegetal objetivo y la célula vegetal transgénica están comprendidas dentro de una planta objetivo y una planta transgénica, respectivamente.

La presente solicitud también proporciona un método para seleccionar una composición herbicida activa mediante la aplicación de una combinación de los compuestos que se identifican a través del sistema indicador descrito anteriormente para una célula vegetal y la selección de una combinación herbicida que consiste en compuestos que actúan sinérgicamente para matar a la célula vegetal.

En otra realización de la descripción, se aplicó una librería de compuestos a una segunda célula vegetal en combinación con un primer compuesto identificado a partir del sistema indicador de ensayo descrito anteriormente. Se selecciona un segundo compuesto que mata a la segunda célula vegetal al aplicarse en combinación con el primer compuesto, sin matar a la segunda célula vegetal cuando se aplica solo. Por lo tanto, se identifica una combinación herbicida que comprende el primer compuesto y el segundo compuesto que proporciona la función herbicida sinérgicamente en la composición activa.

La descripción proporciona, además, un método para controlar el crecimiento de una planta al poner en contacto a una planta objetivo o el área de crecimiento de la planta objetivo o una parte de la planta objetivo con una cantidad herbicida de la composición activa identificada anteriormente.

La solicitud proporciona, de forma adicional, un método para controlar el crecimiento de una planta nociva o no deseada en un campo de cultivo que comprende la etapa de aplicación de la combinación de compuesto herbicida identificada anteriormente en una cantidad efectiva en el campo.

En algunas realizaciones, la planta nociva o no deseada es una planta monocotiledónea.

La descripción también proporciona composiciones herbicidas que comprenden una cantidad herbicida de la composición activa identificada anteriormente.

Breve descripción de la lista de secuencia y los dibujos

El listado de secuencias proporciona secuencias ilustrativas de los polinucleótidos y polipéptidos de esta descripción.

Listado de secuencias. El listado de secuencias proporciona secuencias ilustrativas de polinucleótidos y polipéptidos.

Las **figuras 1-4** muestran los efectos negativos de la expresión constitutiva excesiva de cuatro proteínas reguladoras en plantas. Las secuencias A y D (Id. de sec. n.º: 2 y 8, respectivamente) son factores de transcripción de la familia AP2, la secuencia B (Id. de sec. n.º: 4) es un factor de transcripción de la familia de dedos de zinc (Z-C2H2) y secuencia C (Id. de sec. n.º: 6) es un factor de transcripción de la familia de homeobox (HB)

Figura 1. Vástagos transgénicos de doce o trece días de edad que incluyen diversos genes “tóxicos” (A-D) inducidos (+) por medio del uso de dexametasona o tratamiento simulado (-).

5 **Figura 2.** Los explantes del pecíolo de la hoja a partir de líneas transgénicas cultivadas en suelo de veintisiete días de edad (compuestos de genes “tóxicos” A-D) se trataron con dexametasona (+) o tratamiento simulado (-) durante siete días para observar los efectos de la inducción de genes “tóxicos”.

10 **Figura 3.** Vástagos transgénicos de catorce días (evento único, mezcla de individuos semihomocigotos y homocigotos) tras siete días de inducción del gen “tóxico” (+), en comparación con los vástagos con tratamiento simulado de control no inducido (-).

15 **Figura 4.** Vástagos segregantes de nueve días (mezcla de un evento único de individuos negativos segregantes, semihomocigotos y homocigotos) después de cuatro días de inducción del gen “tóxico” (+), en comparación con los vástagos con tratamiento simulado de control no inducido (-). La imagen se muestra en contraste inverso para destacar el tejido vivo (blanco) frente al tejido necrótico (oscuro).

Descripción detallada

20 La presente descripción se refiere generalmente a composiciones con eficacia herbicida y los métodos para identificarlas. Se proporcionan métodos para identificar compuestos químicos que se pueden aplicar a un organismo, por ejemplo, una planta o un cultivo *in vitro*, para mejorar el rendimiento o modificar los fenotipos del organismo. A lo largo de esta descripción, se hace referencia a diversas fuentes de información. Las fuentes de información incluyen artículos de revistas científicas, documentos de patentes, libros de texto y direcciones de página web no activas en la World Wide Web. La referencia a estas fuentes de información indica claramente que cualquier experto en la técnica puede utilizarlas. El contenido y las enseñanzas de cada una de las fuentes de información es fiable y puede usarse para preparar y utilizar realizaciones de esta descripción.

30 Como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a “una célula huésped” incluye una pluralidad de dichas células huésped y una referencia a “una tensión” es una referencia a una o más tensiones y equivalentes de estas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Definiciones

35 “Sinérgico” se refiere a (i) un efecto cooperativo de un sistema de múltiples componentes que es superior a un simple efecto acumulativo de los componentes individuales o (ii) un efecto cooperativo que produce un resultado que no se puede obtener de forma independiente o se puede obtener en el mismo nivel por los componentes individuales tomados individualmente. Por ejemplo, en la presente solicitud, muchos compuestos no inhiben el crecimiento de una planta o célula vegetal o la matan individualmente, pero cuando se combinan pueden actuar de manera sinérgica para inhibir el crecimiento de una planta o una célula vegetal o matarla.

40 “Ruta reguladora tóxica de plantas” se refiere a una ruta reguladora de plantas que puede inhibir el crecimiento de una planta o matarla cuando la ruta reguladora tóxica de la planta se induce en un grado suficiente.

45 “Potenciar las rutas reguladoras tóxicas de plantas” se refiere a una mejora de la activación de la ruta reguladora tóxica de la planta.

50 Un “polipéptido regulador tóxico” se refiere a un polipéptido regulador de plantas que puede inhibir el crecimiento de una planta o matarla cuando el polipéptido regulador tóxico se expresa en un nivel suficiente. En la lista de secuencias se proporcionan ejemplos de polipéptidos reguladores tóxicos entre los que se incluyen G12 (Id. de sec. n.º: 2), G2827 (Id. de sec. n.º: 4), G1540 (Id. de sec. n.º: 6) y G2298 (Id. de sec. n.º: 8).

55 Un “gen tóxico” se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido regulador tóxico.

“Sub-letal” se refiere a un estado en el cual no se mata a una planta. En esta descripción, sub-letal generalmente se refiere a un nivel de una sustancia química, compuesto o composición que es insuficiente para ocasionar la muerte de una planta cuando la sustancia química, compuesto o composición entra en contacto con la planta.

60 Una “dosis sub-letal” se refiere a una concentración de un tratamiento químico o medioambiental que se aplica a una planta o célula vegetal sin causar letalidad.

“Cantidad herbicida” se refiere a una combinación de compuestos químicos en una cantidad que pueda causar daños, necrosis, inhibición del crecimiento o muerte en la planta.

65

“Composición herbicida” se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto químico que, cuando se aplica en una cantidad eficaz, puede causar daños, necrosis, inhibición del crecimiento o muerte en la planta.

“Factor de inducción” con respecto a la presente descripción se refiere a un compuesto aplicado a una planta de manera exógena, tal como una planta transformada, que provoca la expresión de (“induce”) un polipéptido endógeno específico, tal como un polipéptido regulador tóxico endógeno. El factor de inducción se puede aplicar de tal manera que el polipéptido regulador tóxico se exprese en la planta en un grado sub-letal. La dexametasona es un ejemplo de un factor de inducción que puede usarse para regular la expresión de cualquier polipéptido que se encuentre bajo el control regulador de un impulsor inducible por dexametasona.

En la presente solicitud, un “co-herbicida” se define como un compuesto que carece de o tiene una actividad herbicida mínima al aplicarse solo en una planta, pero tiene un efecto herbicida más fuerte cuando un polipéptido regulador tóxico inducible se expresa en la planta, y el co-herbicida y el polipéptido regulador tóxico actúan de manera sinérgica para producir el efecto herbicida más fuerte y un daño significativo o la muerte de la planta.

Un “factor potenciador” se refiere a un compuesto que actúa para aumentar la actividad de una ruta reguladora tóxica endógena en una planta y produce la expresión de un polipéptido regulador tóxico endógeno en la planta. Aumentar la actividad de un polipéptido regulador tóxico endógeno sería útil para controlar las malas hierbas u otras especies de plantas no deseadas.

Una “planta transgénica o transformada” se refiere a una planta que contiene un polinucleótido recombinante introducido por medio de transformación. La transformación significa introducir una secuencia de nucleótidos en una planta de cualquier manera que pueda generar una expresión estable o transitoria de la secuencia. Esto puede lograrse por transfección con vectores virales, transformación con plásmidos, tales como vectores basados en partículas *Agrobacterium*-, o la introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección o aceleración por pistola de partículas. Una planta transformada puede referirse a una planta entera, así como a semillas, tejido vegetal, células vegetales o cualquier otro material vegetal y a la progenie de la planta.

Un “vector” es una estructura de ácido nucleico que se genera por recombinación o síntesis y comprende elementos de ácido nucleico que pueden causar la expresión de un gen. Un “vector donante” es una estructura para la expresión de una secuencia de polinucleótidos de un gen transactivador. El gen transactivador está operativamente unido a un impulsor. La región impulsora puede incluir impulsores específicos del tejido o activos, impulsores específicos o activos de la etapa de desarrollo, impulsores inducibles o impulsores constitutivos.

El término “transactivador específico de la secuencia de ADN” se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio vinculante a ADN que se une al ADN con cierto grado de especificidad y un dominio de activación transcripcional que tiene la función de activar la transcripción. Una característica común de algunos dominios de activación es que están diseñados para formar hélices alfa anfifílicas con carga negativa (Giniger y Ptashne (1987) *Nature* 330:670-672, Gill and Ptashne (1987) *Cell* 51:121-126, Estruch y co. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:3983-3989). Los ejemplos incluyen la región de activación de transcripción VP16 o GAL4 (Moore y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 376-381; y Aoyama y col. (1995) *Plant Cell* 7:1773-1785), péptidos derivados de secuencias bacterianas (Ma y Ptashne (1987) *Cell* 51; 113 - 119) y los péptidos sintéticos (Giniger y ptashne, *supra*), o el dominio EDLL de plantas (publicación PCT n.º WO2009158591). Los transactivadores ilustrativos son los descritos en Brent y Ptashne, US-4.833.080, o en Hasselhoff y Hodge, publicación PCT n.º WO1997030164.

Se considera que se ha logrado la “activación” de una estructura indicadora impulsora cuando el valor de la actividad en relación con el control, p. ej., una muestra no tratada con un compuesto de prueba es 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, o 1000-3000 % o mayor.

El término “planta” incluye la planta entera, órganos/estructuras vegetativos de brotes (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos/estructuras florales (por ejemplo, brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluidos embrión, endospermo y tegumento) y frutos (el ovario maduro), tejidos vegetales (por ejemplo, tejido vascular, tejido plantar y similares) y células (por ejemplo, células de guarda, óvulos y similares), así como la progenie de estas. La clase de plantas que puede usarse en el método de la presente descripción es, generalmente, tan amplia como la clase de plantas más altas y más bajas que se pueden tratar con técnicas de transformación, lo cual incluye angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos, equisetos, psilotales, licofitas, briofitas y algas multicelulares.

Un “rasgo” se refiere a una característica fisiológica, morfológica, bioquímica o física de una planta o material o célula vegetal particular. En algunos casos, esta característica es visible para el ojo humano, tal como el tamaño de la semillas o de la planta, o puede medirse mediante técnicas bioquímicas, tal como la detección de proteína, almidón o contenido de aceite de las semillas o las hojas, o mediante observación de un proceso fisiológico o metabólico, p. ej., midiendo la tolerancia a la privación de agua o una concentración particular de sal o azúcar, o mediante la observación del nivel de expresión de un gen o genes, p. ej., empleando el ensayo northern, RT-PCR, ensayos de la expresión génica en micromatriz, o sistemas de expresión del gen indicador o mediante observaciones agrícolas tales como la tolerancia de la tensión hiperosmótica o la producción. Sin embargo,

cualquier técnica puede usarse para medir la cantidad de, el nivel comparativo de o la diferencia en cualquier compuesto químico o macromolécula seleccionados en las plantas transgénicas.

La “modificación del rasgo” se refiere a una diferencia detectable en una característica de un organismo tratado con los compuestos químicos de la presente descripción con respecto a un organismo de control de la misma especie, incluyendo este último aquellos organismos tratados con un compuesto de control o un solvente portador o sin tratamiento. En algunos casos, la modificación del rasgo puede evaluarse cuantitativamente. Por ejemplo, la modificación del rasgo puede implicar un aumento o una disminución de al menos 2 %, aproximadamente, o incluso una mayor diferencia, en un rasgo observado en comparación con un organismo de control o natural. Se sabe que puede existir una variación natural en el rasgo modificado. Por lo tanto, la modificación del rasgo observado implica un cambio de la distribución y magnitud normales del rasgo en las plantas en comparación con los organismos de control o natural.

“Expresión ectópica o expresión alterada o expresión modificada” en referencia a un polinucleótido indican que el patrón de expresión en un organismo o tejido transgénico, p. ej., es diferente del patrón de expresión en un organismo natural o un organismo de referencia de la misma especie. El patrón de expresión también puede compararse con un patrón de expresión de referencia de una planta natural de la misma especie. Por ejemplo, el polinucleótido o polipéptido se expresa en una célula o tipo de tejido que no sea una célula o tipo de tejido en el cual la secuencia se exprese en el organismo natural o por expresión en un momento diferente del momento en el que la secuencia se expresa en la planta natural o por respuesta a distintos agentes inducibles, tales como hormonas o señales ambientales, o a niveles de expresión diferentes (ya sea mayores o menores) en comparación con los detectados en un organismo natural. El término también se refiere a patrones de expresión alterados que se producen al reducir los niveles de expresión por debajo del nivel de detección o al eliminar la expresión por completo. El patrón de expresión resultante puede ser transitorio o estable, constitutivo o inducible. Con referencia a un polipéptido, el término “expresión ectópica o expresión alterada” puede referirse, además, a niveles de actividad alterados como resultado de las interacciones de los polipéptidos con moduladores exógenos o endógenos o de las interacciones con factores o como resultado de la modificación química de los polipéptidos.

El término “expresión excesiva”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un mayor nivel de expresión de un gen en un organismo, una célula o un tejido, en comparación con la expresión en una planta, célula o tejido natural, en cualquier etapa de desarrollo o temporal del gen. La expresión excesiva puede ocurrir cuando, por ejemplo, los genes que codifican uno o más polipéptidos se encuentran bajo el control de un impulsor fuerte (p. ej., la región de inicio de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor 35S). La expresión excesiva puede producirse también bajo el control de un impulsor inducible o específico del tejido. Por lo tanto, la expresión excesiva puede producirse a través de un organismo, en tejidos específicos del organismo o en presencia o ausencia de señales ambientales particulares, dependiendo del impulsor usado.

La expresión excesiva puede ocurrir en células que normalmente carecen de expresión de polipéptidos funcionalmente equivalentes o idénticos a los polipéptidos presentes. La expresión excesiva también puede producirse en células donde la expresión endógena de los polipéptidos presentes o las moléculas funcionalmente equivalentes se produce normalmente, pero dicha expresión normal se sitúa a un nivel inferior. Por lo tanto, la expresión excesiva genera una producción superior a lo normal o “producción excesiva” del polipéptido en el organismo, célula o tejido.

La “regulación positiva” se refiere a un aumento en la expresión de un gen, un polinucleótido, un producto génico (p. ej., ARNm o un polipéptido) o la actividad de una ruta reguladora de interés en un organismo. El término puede, por ejemplo, referirse a la situación en la que se incrementa la transcripción de un ARNm específico, pero también puede referirse a un aumento en los niveles de ARNm o proteínas debido a la mayor estabilidad del ARNm específico.

La “regulación positiva condicional” es un incremento en la expresión de un gen, un polinucleótido, un producto génico o la actividad de una ruta reguladora en respuesta a una señal particular *ex vivo* o *in vivo* p. ej., una condición ambiental o celular, contacto o exposición. Se puede usar un impulsor inducible o una estabilidad de ARN alterada para aumentar condicionalmente la expresión del gen, el polinucleótido o el producto génico.

El “daño” a una planta se refiere a un efecto perjudicial para la salud de la planta y puede ser provocado por diversas influencias, que incluyen un tratamiento que afecta negativamente, ya sea directa o indirectamente, solo o en tratamiento combinado, a una planta y tiene un efecto perjudicial sobre el crecimiento, la fisiología, la calidad y/o la fertilidad. El daño también puede referirse a un efecto perjudicial sobre la salud de la planta que puede ocurrir en una especie vegetal de interés o en un miembro representativo de una especie vegetal de interés. El daño puede manifestarse en forma, por ejemplo, de una producción reducida de gametos o un recuento reducido de semillas, la inhibición del crecimiento, una biomasa reducida, marchitamiento, enlentecimiento, clorosis, fomento de la senescencia o necrosis.

Descripción de las realizaciones específicas

Rutas reguladoras tóxicas de la planta

Los ensayos de cribado patentados han producido un gran número de proteínas reguladoras conferidas a fenotipos perjudiciales cuando se expresan de forma ectópica y constitutiva. Estas secuencias se clasificaron según la

gravedad de sus efectos en las plantas. Las secuencias ilustrativas que incluyen fenotipos perjudiciales conferidos donde las secuencias se expresaron de forma ectópica incluyen G12 (Id. de sec. n.º: 2), G2827 (Id. de sec. n.º: 4), G1540 (Id. de sec. n.º: 6) y G2298 (Id. de sec. n.º: 8) mostradas en la Tabla 1. También pueden concebirse otras proteínas reguladoras que confieren fenotipos perjudiciales cuando se expresan de forma ectópica y constitutiva.

5 Tabla 1. Secuencias que confirieron fenotipos perjudiciales cuando se expresaron constitutivamente en las plantas

Identificador de secuencia	Id. de secuencia n.º:	Número de AGI	Familia de proteínas	Tipo: Dominio (aminoácidos de terminal N)
G12	2	AT4G36900	AP2	AP2: 27-94
G2827	4	AT3G49930	Z-C2H2	C2H2 - tipo dedo de cinc: 96-116, 151-171
G1540	6	AT2G17950	HB	Homeodominio: 35-98
G2298	8	AT5G21960	AP2	AP2: 4-70

10 La presencia de cada uno de los dominios indicados en la Tabla 1 tienen funciones específicas requeridas para las funciones de la proteína reguladora, incluidas las proteínas reguladoras enumeradas en la Tabla 1, en las que se encuentran:

15 Los dominios AP2 son dominios vinculantes a ADN que se hallan en los reguladores transcripcionales de las plantas; un ejemplo de un dominio AP2 se encuentra en EREBP (proteína vinculante del elemento sensible al etileno).

Los dominios de dedo de zinc tipo C2H2 son estructuras proteicas vinculantes del ácido nucleico. Para los dominios C2H2, el primer par de residuos de coordinación del cinc son cisteínas, mientras que el segundo par son histidinas.

20 Los homeodominios vinculantes de ADN están implicados en la regulación transcripcional de procesos de desarrollo eucariota clave. Los homeodominios puede unirse al ADN como monómeros o como homo y/o heterodímeros, de forma específica para la secuencia.

El dominio Dof es un dominio de dedo de zinc vinculante de ADN que presenta semejanza con el dedo de zinc Cys2.

25 El gancho de AT es un patrón vinculante de ADN. Por lo general, las proteínas gancho de AT contienen al menos un dominio de gancho de AT. Un segundo dominio conservado, el dominio DUF-296 se asocia con las proteínas que contienen ganchos de AT, lo que sugiere firmemente una función de unión al ADN de las proteínas en su conjunto.

30 Muchas de las proteínas reguladoras en la Tabla 1 probablemente desempeñan un papel crucial en el destino celular, la homeostasis y el desarrollo de la identidad, y su actividad está estrechamente regulada tanto a nivel transcripcional y postraduccional en plantas naturales. Expresada ectópicamente, la proteína transgénica resultante inicia una cascada de ciclos de transcripción genética cuya consecuencia es la amplia gama de fenotipos morfológicos y de desarrollo aberrantes. En unos pocos e intrigantes casos, la expresión constitutiva conduce a la necrosis celular después de aproximadamente una semana de crecimiento. En este caso, los genes pueden controlar la apoptosis como parte de la respuesta de defensa hipersensible.

35 La posibilidad de activar químicamente estas rutas de necrosis celular es un modo de acción herbicida atractivo. Estas rutas de factor de transcripción pueden desencadenar un fenotipo tóxico en múltiples etapas del desarrollo, pudiendo ser herbicidas objetivo priorizados si se tiene la oportunidad de determinar una sustancia química que resulte en la desregulación de la actividad del factor de transcripción objetivo y, análogamente, inducir las rutas cascada perjudiciales. Se espera que muchos de los fenotipos observados resulten de la expresión ectópica de los factores de transcripción durante el crítico desarrollo embrionario temprano y la inducción de la expresión de los factores de transcripción en las últimas etapas tendrá pocas consecuencias negativas. Es posible identificar las rutas reguladoras tóxicas de la planta cuando un fenotipo tóxico deseable se puede inducir en varias etapas del desarrollo de la planta.

45 La regulación en múltiples niveles de las proteínas del factor de transcripción tóxico puede implicar la necesidad de múltiples compuestos para aumentar la actividad de la ruta objetivo y activar la ruta objetivo. Por lo tanto, la identificación de compuestos con actividad herbicida sinérgica es de gran interés.

50 Bibliotecas químicas

Prácticamente cualquier compuesto químico de interés se puede probar por su capacidad para potenciar las rutas reguladoras tóxicas de las plantas y la función herbicida al aplicarse junto con otros compuestos. Más comúnmente, los compuestos se pueden disolver en soluciones acuosas u orgánicas (*p. ej.*, soluciones de sulfóxido de dimetilo (base de DMSO)). Los ensayos están diseñados para examinar grandes bibliotecas químicas y suelen incluir la automatización de las etapas del ensayo, que normalmente se desarrollan en paralelo (*p. ej.*, en formatos de microtitulación sobre placas microtituladoras en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluidos Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO), Fluka® Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En una realización preferida, se llevan a cabo métodos de detección de alto rendimiento que proporcionan una biblioteca química combinatoria que contiene un gran número de compuestos de prueba. Dichas “bibliotecas químicas combinatorias” se analizan en uno o más ensayos, tal como se describe en la presente memoria, para identificar aquellos miembros de biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que activan o regulan la actividad de los impulsores de la presente descripción. Los compuestos identificados de esta manera como “compuestos de plomo” convencionales pueden utilizarse como agentes potenciales o reales para tratar plantas u otros organismos.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica mediante la combinación de varias “bases fundamentales” o reactivos químicos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma al combinar un conjunto de bases fundamentales químicas (aminoácidos) en numerosas iteraciones para una longitud de compuesto determinada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Los millones de compuestos químicos pueden sintetizarse a través de dicho mezclado combinatorio de las bases fundamentales químicas.

La preparación y el cribado de bibliotecas químicas combinatorias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, aunque no de forma limitativa, bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, *p. ej.*, la patente US-5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, la patente US-5.549.974; pirrolidinas, las patentes US-5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolino, la patente US-5.506.337; y similares). Además, pueden usarse otras sustancias químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Las bibliotecas de diversidad química también están comercialmente disponibles, *p. ej.*, de empresas como pueden ser 3-Dimensional Pharmaceuticals Inc., Albany Molecular Research Inc., Alchemia Pty. Ltd., Argonaut Technologies Inc., ArQuie Inc, Biofocus DPI, Array Biopharma (12, 22) Inc., Axys Pharmaceutical Inc., Cambridge Combinatorial Ltd., Charybdis Technologies Inc, ChemBridge Corp., CombiChem Inc., ComGenex Inc., Discovery Partners International Inc., Diversa Corp., EnzyMed Inc. Versicor, Gryphon Sciences Inc, Ixsys Inc., Kosan Biosciences Inc., Maxygen Inc., Molecumetics Ltd., Nanoscale Combinatorial Synthesis Inc., Ontogen Corp., Orchid Biocomputer Inc., Oxford Asymmetry Ltd., Oxford Molecular Group PLC, Panlabs Inc., Pharmacopeia Inc., Phytera Inc., Proto Gene Inc., Sphere Biosystems Inc., Symyx Technologies Inc., y Systems Integration Drug Discovery Co.

Frecuentemente, las bibliotecas químicas que se analizan con los métodos de la presente descripción comprenden compuestos con pesos moleculares de entre 150 y 600, un valor promedio de coeficiente de reparto de 3 (intervalo de 0 a 9), un número promedio de grupos de unión R de 3,5 (intervalo de 0 a 9), un número promedio de donantes de unión R de uno (intervalo de 0 a 4) y un promedio de tres enlaces rotativos (intervalo de 0 a 9). Dichas características son típicas de los agroquímicos conocidos en la técnica.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias se encuentran comercialmente disponibles (*ver, p. ej.*, 35357 MPS, 390 MPS, Advanced Chern Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas bibliotecas combinatorias se encuentran comercialmente disponibles (*ver, p. ej.*, Chembridge, Inc., San Diego, CA; ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.) y se pueden analizar mediante los métodos instantáneos.

Genes indicadores

La presente descripción proporciona también un sistema de ensayo indicador que puede ser utilizado para identificar compuestos herbicidas que pueden activar genes marcadores de una ruta reguladora tóxica de una planta de interés. Los vectores de expresión que comprenden un impulsor o su parte funcional de un gen marcador de la ruta reguladora tóxica de una planta se pueden usar para identificar estos compuestos. Los indicadores pueden ser cualquier proteína que pueda usarse para proporcionar una señal perceptible e incluir, pero sin limitarse a, proteínas fluorescentes, tales como proteínas fluorescentes verdes o rojas, o variantes que producen un color fluorescente; β glucuronidasa (GUS); luciferasa; cloranfenicol acetiltransferasa; beta galactosidasa; y fosfatasa alcalina. Los genes indicadores que se usan comúnmente incluyen aquellas proteínas codificadoras que pueden generar señales fluorescentes, colorimétricas o luminiscentes cuantificables. La transcripción de las secuencias que codifican el gen indicador se puede determinar usando cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la actividad de proteínas del gen indicador se mide, *p. ej.*, mediante el uso de un lector fluorescente u otra instrumentación apropiada para el sistema indicador. Los productos que ayudan a la determinación de la actividad indicadora están comercialmente disponibles.

Las muestras tratadas con un compuesto de prueba o conjunto de compuestos de prueba se comparan con muestras de control sin el compuesto de prueba para examinar el grado de modulación. Las muestras de control (no tratadas con activadores) tienen asignado un valor de actividad relativo. A continuación, la activación se obtiene cuando el valor de la actividad indicadora en relación con el control es de 105 %, 105-150 %, opcionalmente 150 %, 150-500 % o 500-2000 % o superior, mientras que la subregulación se obtiene cuando el valor de la actividad indicadora con respecto al control es del 70-90 %, 66 %, 20-50 % o 5-10 %.

En otras realizaciones, se analizan los extremos distintos a la actividad indicadora. Por ejemplo, los niveles de expresión del ARNm o la proteína se pueden medir para evaluar los efectos de un compuesto de prueba en la activación indicadora.

En este caso, la expresión de la estructura indicadora se mide evaluando el nivel del ARNm que codifica el gen indicador o la fusión traslacional del gen indicador y un polipéptido de interés o, alternativamente, del producto proteico. Estos ensayos se pueden realizar utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica que se considere adecuado. Por ejemplo, la expresión de ARNm se puede detectar usando metodologías basadas en la amplificación, ensayos northern o blot, protección de la nucleasa y similares. Los productos del polipéptido pueden identificarse usando inmunoensayos.

Introducción de estructuras indicadoras en huéspedes o células huésped

Las estructuras indicadoras se pueden introducir en los huéspedes o las células deseados derivados de plantas, microbios, mamíferos, levadura, *Drosophila*, *C. elegans* mediante una variedad de técnicas convencionales bien conocidas. Por ejemplo, el vector se puede introducir directamente en las células huésped mediante el uso de técnicas tales como electroporación, la microinyección y métodos biolísticos, tales como el bombardeo de partículas.

Las técnicas de microinyección son conocidas en la técnica y se describen bien en la literatura científica y de patentes. La introducción de estructuras de ADN utilizando una precipitación de polietilenglicol como se describe, *p. ej.*, en Paszkowski y col. (1984) e *EMBO J.*: 2717 -2722. Se describen técnicas de electroporación en Fromm y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 1985 82:5824-5828. Se describen técnicas de transformación biolística en Klein y col. (1987) *Nature*, 327: 70-73.

Se contempla que los métodos de transformación, identificación y aumento de la actividad de las rutas reguladoras, y los métodos de tratamiento de compuesto descritos en la presente memoria puede aplicarse tanto a las plantas como a las células vegetales. Para transformar plantas o células vegetales, también se pueden combinar estructuras indicadoras con regiones de flaqueo de ADN-T adecuadas e introducirse en un vector huésped de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del huésped de *Agrobacterium tumefaciens* dirigen la inserción de la estructura y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula es infectada por las bacterias. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*-, que incluyen la desactivación y el uso de vectores binarios, se describen bien en la literatura científica. Véase, por ejemplo Horsch y col. (1984) *Science* 223:496-498, y Fraley y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 80:4803-4807.

Las células huésped vegetales para el análisis de estructuras indicadoras pueden ser de cualquier planta, incluidas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Típicamente, las células vegetales son de *Nicotiana benthamiana* o *Arabidopsis thaliana* u otra planta que pueda transformarse, y preferiblemente, sea transformada de manera rutinaria y se analice en la técnica.

También pueden utilizarse otras plantas en los métodos de cribado mostrados en la presente memoria. Estos incluyen cereales, por ejemplo, maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, avena, centeno, milo, lino o gramosía. Otros géneros vegetales incluyen, aunque no de forma limitativa, *Cucurbita*, *Rosa*, *Vitis*, *Juglans*, *Gragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*; *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Ciahorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Heterocallis*, *Nemesis*, *Pelargonium*, *Panieum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Lolium*, *Oiyza*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale*, *Allium*, *Setaria*, y *Triticum*.

Después de la transformación de las estructuras indicadoras en la célula vegetal, las células o el tejido vegetal transformados se selecciona o analiza mediante técnicas convencionales. La célula o el tejido vegetal transformados que contienen la estructura indicadora pueden regenerarse, si se desea, mediante procedimientos conocidos. Es posible encontrar metodología adicional para la generación de plantas que comprenden estructuras de expresión para las sustancias químicas de análisis en la técnica (véase, *p. ej.*, la patente US- 5.614.395).

Ensayos de alto rendimiento

En ensayos de alto rendimiento, es posible analizar numerosos, por ejemplo varios miles, de compuestos de prueba diferentes en un solo día. Por ejemplo, cada pocillo de una placa de microtitulación puede usarse para realizar un ensayo separado frente a un compuesto de prueba seleccionado o, si se deben observar efectos de concentración o tiempo de incubación, cada uno de los 5-10 pocillos puede probar un solo compuesto de prueba. Además, se pueden analizar conjuntos de compuestos de prueba si se incluyen 25 compuestos múltiples en una única muestra de ensayo. Si se identifica un 'blanco' (un resultado positivo o un resultado de interés), las sustancias químicas incluidas en el conjunto pueden probarse individualmente para identificar los compuestos capaces de potenciar las rutas reguladoras tóxicas de las plantas. Además, los compuestos de blanco iniciales se someten a un análisis de alto rendimiento posterior para identificar un segundo compuesto que, en combinación con el compuesto blanco inicial, confiere la letalidad de células vegetales. La relación y concentración de los dos compuestos se optimizan en base a la capacidad de inhibir o dañar la planta o célula vegetal y, a continuación, se identifica una composición herbicida que contiene la combinación efectiva de los dos compuestos.

Tratamiento de plantas

Una vez que se identifica una composición herbicida activa y se valida de acuerdo con los métodos de la presente descripción, esta puede aplicarse al campo para erradicar plantas nocivas o no deseadas.

Las sustancias químicas seleccionadas pueden formularse para tratar plantas en forma líquida o sólida. Por ejemplo, en formulaciones líquidas, las plantas pueden tratarse con un pulverizador, en una aplicación por inundación, una aplicación por goteo o mediante irrigación. Las formulaciones se preparan por medio de la metodología conocida y pueden comprender otros reactivos convencionalmente empleados en la formulación de sustancias químicas agrícolas, *p. ej.*, agentes emulsionantes, surfactantes, etc. Ejemplos de formulaciones incluyen concentrados emulsionables, soluciones diluibles o que pueden rociarse directamente, emulsiones diluidas, polvos humectantes, polvos solubles, polvos, gránulos o microcápsulas. Los métodos de aplicación, tales como el rociado, la atomización, la pulverización, la humectación, la dispersión o el vertido, se seleccionan de acuerdo con la aplicación deseada. Por ejemplo, una formulación de liberación lenta puede aplicarse como tratamiento del suelo de manera que una planta se exponga frecuentemente a una sustancia química aislada (*p. ej.*, hierba de césped). En otro ejemplo, puede ser deseable incorporar un compuesto químico seleccionado de acuerdo con el método de la presente descripción en agua de irrigación para plantas que experimentan sequías frecuentes (*p. ej.*, algodón).

Ejemplos

La presente memoria descriptiva, que se describe ahora de forma general, se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente a título ilustrativo de ciertos aspectos y realizaciones de la presente descripción y no pretenden limitar la descripción.

Ejemplo I. Identificación de rutas reguladoras de plantas que son capaces de inhibir el crecimiento de las plantas o matarlas

Se generaron líneas transgénicas de dos componentes para permitir un estudio de la toxicidad dependiente del gen. El primer componente comprende una fusión traslacional del dominio vinculante de ADN LexA, el dominio del activador transcripcional de GAL4 y el receptor de glucocorticoide (GR) que imparte una localización nuclear dependiente de la dexametasona en el activador transcripcional sintético de dominios múltiples. Este componente se expresa constitutivamente utilizando el impulsor vírico CaMV 35S y una secuencia reguladora potenciadora. El segundo componente (introducido mediante transformación) comprende una fusión transcripcional de la secuencia reguladora opLexA y la secuencia que codifica la proteína para el gen tóxico objetivo candidato. Las líneas transgénicas resultantes se sometieron a un tratamiento simulado o con dexametasona para evaluar el inicio de la muerte y defectos morfológicos severos dependiente del gen.

Transformantes primarios (estudio de vástago T1)

Los transformantes primarios de origen supertransformados se seleccionaron utilizando la expresión del gen marcador (*p. ej.*, resistencia herbicida a la sulfonamida). Las semillas se esterilizaron en la superficie y, después de siete días de crecimiento (90 μM m-2 s-1, 22-25 °C continuo) en medios de selección (80 % MS, 1 % sacarosa, 0,65 % de fitomezcla, 0,05 % MES, 1,5 mg/l de asulam), se trasplantó un panel de al menos 48 especímenes a medios de crecimiento (50 % MS, 0,05 % MES, 0,6 % de fitomezcla, 0,65 mM de fosfato monopotásico, 0,75 mM de sulfato de magnesio) que contiene bien dexametasona (50 μM) o DMSO (tratamiento de simulación). La morfología de los vástagos se evaluó diariamente durante al menos una semana para priorizar genes que regulan las rutas altamente tóxicas (Figura 1). Posteriormente, se trasplantó una selección de vástagos de tratamiento simulado al suelo (mezcla Sunshine n.º 1) y las plantas se cultivaron bajo luz continua (100-150 μM m-2 s-1, 22-25 °C) para análisis adicional. Cuando las plantas se encontraban entre las tres y cuatro semanas de edad, se extrajeron múltiples explantes de las hojas (que contenían el peciolo) de plantas representativas y se remojaron en una solución acuosa de dexametasona (5 μM) o DMSO (simulación). Se hizo un seguimiento diario de la necrosis del tejido durante hasta una semana para priorizar aún más las rutas tóxicas para su análisis posterior (Figura 2). Las semillas se cosecharon a partir de plantas individuales de líneas transgénicas que comprenden el polipéptido recombinante que codifica el polipéptido regulador tóxico.

Poblaciones segregantes (estudio de vástago T2)

Las semillas de las líneas priorizadas T1 se esterilizaron en la superficie y los vástagos transgénicos T2 se cultivaron en medios de selección durante siete días. Posteriormente, un panel de vástagos de cada línea se trasplantó a medios de crecimiento que contenían bien dexametasona (50 μM), bien DMSO (tratamiento simulado). La morfología de los vástagos se evaluó diariamente durante al menos una semana para priorizar genes que regulan las rutas altamente tóxicas. Posteriormente, se trasplantó una selección de vástagos de tratamiento simulado al suelo (mezcla Sunshine n.º 1) y las plantas se cultivaron bajo luz continua (100-150 μM m-2 s-1, 22-25 °C) y las existencias de semillas se recolectaron de plantas individuales de las líneas priorizadas (Figuras 3 y 4).

Se descubrió que las proteínas reguladoras enumeradas en la Tabla 1 (*supra*) confieren efectos perjudiciales significativos a las plantas cuando las proteínas se expresan constitutivamente en dichas plantas.

Ejemplo II. Optimización del ensayo de detección del compuesto (líneas homocigotas T3)

Las líneas transgénicas homocigotas que alojan un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido regulador tóxico de interés se seleccionan evaluando el patrón de resistencia de la selección de herbicidas. Posteriormente, las existencias de semillas seleccionadas se esterilizan en la superficie y se distribuyen en los pocillos de placas de múltiples pocillos (típicamente, 96 pocillos) con una densidad de aproximadamente 3-10 semillas por pocillo utilizando una mezcla de medio de crecimiento (50 % MS, 0,05 % MES, 0,5 % sacarosa, 0,1 % de fitomezcla). Después, los vástagos se germinan y cultivan bajo luz continua (90 μ M m-2 s-1, 22-25 °C) durante tres a seis días antes de la adición de dexametasona (0,1 a 50 μ M de concentración final). Se identifican las condiciones para cada línea seleccionada compuesta por un gen tóxico inducible, donde el tratamiento de dexametasona resulta en la inducción del gen objetivo (según lo evaluado por qRT-PCR), pero donde la inducción es insuficiente para producir una necrosis del tejido notable, senescencia o defectos de crecimiento durante el transcurso del ensayo (1-4 días de crecimiento posterior).

Ejemplo III. Demostración de ruta de conservación entre especies

Los genes tóxicos priorizados de *Arabidopsis* se usan para generar *Setaria* transgénica (p. ej., *Setaria viridis*) que expresa altos niveles del transgén constitutivamente o en un sistema de inducción génica. Las líneas transgénicas resultantes se analizan para evaluar la toxicidad del transgén y la demostración de la conservación entre especies de la ruta herbicida objetivo. Además, se realiza un análisis filogenético para identificar el ortólogo más cercano de una especie monocotiledónea seleccionada (p. ej., *Setaria* spp.). La proteína que codifica la secuencia de nucleótidos se clona y usa para generar *Setaria* y *Arabidopsis* que expresen el transgén constitutivamente o mediante el uso de un sistema de inducción génica y las líneas transgénicas resultantes evaluadas para los efectos tóxicos del transgén.

Ejemplo IV. Identificación de compuesto blanco y selección de composición herbicida principal

Una vez que las condiciones optimizadas (concentración y tiempo de aplicación de dexametasona) se identifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo II, se analiza una biblioteca de compuestos para identificar compuestos que potencien el gen tóxico objetivo, lo que resulta en una necrosis más rápida del tejido que en los vástagos de control (tratamiento de simulación). Posteriormente, se evalúan los blancos del compuesto para efectos herbicidas en ausencia de expresión génica tóxica inducida y aquellos con efectos herbicidas se despriorizan a favor de aquellos compuestos que requieren la expresión elevada del gen tóxico de la actividad herbicida.

La actividad herbicida aditiva o sinérgica de los compuestos blanco se evalúa posteriormente. Los vástagos naturales se distribuyen en placas de múltiples pocillos (como se describió anteriormente) y se cultivan durante varios días antes de añadir combinaciones de compuestos blanco. La salud del vástago se evalúa tras varios días de crecimiento adicionales para establecer si las combinaciones específicas de los compuestos blanco confieren actividad herbicida.

En un enfoque alternativo, se selecciona un compuesto blanco para un análisis de alto rendimiento posterior de sustancias químicas que podrían actuar junto con el compuesto blanco para conferir actividad herbicida. Igual que en el estudio inicial anterior, solo los compuestos que carecen de actividad herbicida cuando se aplican solos se seleccionan para su posterior evaluación. La combinación del compuesto blanco del primer estudio y el compuesto blanco del segundo estudio se considera una composición principal y se realizan ensayos posteriores para optimizar las concentraciones relativas de ambos compuestos para la actividad herbicida.

Ejemplo V. Identificar genes marcadores de la ruta reguladora. Identificación de compuesto blanco y selección de composición herbicida principal

Identificación de los genes marcadores

Se llevaron a cabo estudios de determinación del perfil transcripcional sobre rutas tóxicas identificadas (ver Ejemplo I) utilizando una placa patentada de Affymetrix® GeneChip® o una secuencia de ARNm utilizando la plataforma Illumina® GA2. En cada experimento, las muestras de múltiples momentos posteriores a la inducción se analizan para identificar genes marcadores que se inducen inmediatamente después de la expresión del gen objetivo y aquellos que se expresan de manera de forma persistente en niveles altos en relación con las plantas de control tratadas por simulación.

Desarrollo, caracterización y optimización del ensayo indicador.

Los fragmentos impulsores se amplificarían para cada gen marcador y se introducirían en un vector indicador patentado, incluidos (aunque no de forma limitativa) el sistema de inducción de dos componentes que potencia el complejo activador transcripcional sintético LexA:GAL4 para la posterior activación el gen indicador de la green fluorescent protein (proteína fluorescente verde - GFP). Las estructuras resultantes se usarán para transformar *Arabidopsis* para obtener un panel de líneas transgénicas independientes para su posterior caracterización. Los sistemas indicadores que generan señales suficientes de señales de ruido se usan para un estudio químico de alto

rendimiento. Se usa cualquier condición de inducción conocida (de estudios públicos o patentados) del gen marcador para identificar líneas con una regulación positiva fuerte de la señal indicadora después de la activación del impulsor.

5 De forma alternativa, se aíslan protoplastos de líneas indicadoras candidatas y se transfieren con el polipéptido regulador tóxico ascendente para identificar líneas candidatas para una mayor optimización. Las líneas seleccionadas para cada sistema indicador marcador que abarcan las rutas TF tóxicas priorizadas se cultivarán para la producción de semillas homocigotas a granel y experimentos de optimización del ensayo posteriores en placas de 96 pocillos.

10 Identificación de compuesto blanco y selección de composición herbicida principal

Una vez identificadas las condiciones óptimas de crecimiento y tratamiento, se realiza un estudio piloto de alto rendimiento de una biblioteca de compuestos químicos en las líneas indicadoras seleccionadas. Se identifican los compuestos que inducen la expresión del gen indicador, pero no inhiben significativamente el crecimiento de las plantas *Arabidopsis* naturales ni las mata.

15 La actividad herbicida aditiva o sinérgica de los compuestos blanco se evalúa posteriormente. Los vástagos naturales se distribuyen en placas de múltiples pocillos (como se describió anteriormente) y se cultivan durante varios días antes de añadir combinaciones de compuestos blanco. La salud del vástago se evalúa tras varios días de crecimiento adicionales para establecer si las combinaciones específicas de los compuestos blanco confieren actividad herbicida.

20 En un enfoque alternativo, se usa un compuesto blanco identificado a partir del ensayo indicador en un posterior ensayo de alto rendimiento para analizar sustancias químicas que podrían actuar junto con el compuesto blanco para conferir actividad herbicida. Igual que en el estudio inicial anterior, solo los compuestos que carecen de actividad herbicida cuando se aplican solos se seleccionan para su posterior evaluación. La combinación del compuesto blanco del primer estudio y el compuesto blanco del segundo estudio se considera una composición principal y se realizan ensayos posteriores para optimizar las concentraciones relativas de ambos compuestos para la actividad herbicida.

30 Ejemplo VI. Cribado de una biblioteca química utilizando un ensayo de detección en un formato de alto rendimiento

Un μl de cada una de las sustancias químicas de una biblioteca adquirida a partir de una fuente comercial (tal como ChemBridge™. Inc., San Diego, CA) se añade a 96 pocillos que contienen 5-10 semillas de *Arabidopsis* en cada pocillo, cada uno de los cuales aloja una estructura indicadora que codifica GFP, por ejemplo, del tipo mostrado en las Figuras 1-4. El volumen de los medios en cada pozo es de 250 μl y la concentración final de la sustancia química en cada pocillo es de 28 μM . Las semillas se dejan germinar y crecer en el medio. Los datos se normalizan en base a los controles negativos en la misma placa que no se tratan con la sustancia química durante una semana y la señal de GFP se cuantifica en un lector fluorescente de 96 pocillos (TriStar, Berthold, Oak Ridge, TN).

40 Un método de cribado alternativo implica la germinación y el crecimiento de los vástagos de *Arabidopsis* que alojan la estructura de GFP en placas de 96 pocillos durante 4-7 días antes de añadir las soluciones madre del compuesto. Los vástagos se exponen a la solución del compuesto durante otros 1-3 días y la señal de GFP se cuantifica en un lector de placas fluorescentes de 96 pocillos (TriStar, Berthold, Oak Ridge, TN).

45 Ejemplo VII. Preparación de semillas

Antes de colocarse en las placas, las semillas de todos los experimentos se esterilizan en superficie de la siguiente manera: (1) 5 minutos de incubación con mezclado en etanol al 70 %; (2) 20 minutos de incubación con mezclado en 30 % de lejía, 0,01 % de Triton® X-100; (3) cinco enjuagues con agua estéril. Las semillas se vuelven a suspender en 0,1 % de agarosa estéril y se estratifican a 4 °C durante 2-4 días.

50 Ejemplo VIII. Tratamiento de compuesto de trasplante

Las semillas naturales estratificadas de forma estéril (100 por placa) se siembran en placas cuadradas que contienen el siguiente medio: 80 % de solución MS, 1 % de sacarosa, 0,05 % de MES y 0,65 % de agar de fitomezcla. Las placas se incuban a 22 °C bajo luz las 24 horas (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de crecimiento de germinación. El día 8, los vástagos se transfieren a placas de ensayo de 6 pocillos a una densidad de 10 vástagos por pocillo. Las placas de ensayo contenían medio de crecimiento al que se añadió un compuesto de prueba único o DMSO (solvente portador, 0,4 % v/v) por pocillo. Los vástagos tratados con el compuesto se incuban a 22 °C bajo una luz de 24 horas (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de crecimiento de germinación.

60 Ejemplo IX. Procedimiento del tratamiento de pulverización del compuesto

Las semillas estériles (50 por placa) se sembraron en placas de Petri estándar que contienen el siguiente medio: 80 % de solución MS, 1 % de sacarosa, 0,05 % de MES y 0,65 % de fito agar. Las placas se incuban a 22 °C bajo luz las 24 horas (95 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de crecimiento de germinación. En el día 8, los vástagos se transfieren a placas de crecimiento cuadradas que contienen medio fresco (15-25 vástagos por placa) y se disponen de manera que

5 sus raíces principales se exponen y alinean en paralelo a lo largo de la superficie de la placa. Las placas se sellan con cinta de ventilación y se devuelven a la cámara de crecimiento, orientadas para el crecimiento vertical. Por lo general, en el día 9, las placas se rocían con una solución surfactante dispersadora a 0,01 % que contiene el compuesto de prueba o DMSO (solvente portador, 0,4 % v/v) utilizando un rociador Preval® (1,5 ml/placa). Las placas se vuelven a sellar y se devuelven a la cámara de crecimiento (orientación horizontal) para su análisis adicional.

Ejemplo X. Realizaciones de la descripción

10 Realización 1. El método descrito incluye la identificación de una composición efectiva como herbicida que daña o mata una célula de una planta objetivo de la siguiente manera:

- (a) proporcionando una planta objetivo y planta de control de la misma especie vegetal;
- (b) identificando una ruta reguladora tóxica capaz de dañar o matar a una planta objetivo cuando la actividad de la ruta reguladora aumenta en la planta objetivo;
- (c) aumentando condicionalmente o por inducción la actividad de la ruta reguladora tóxica a un nivel que sea sub-letal en la planta objetivo, por ejemplo, al transformar la planta objetivo con un polinucleótido que codifique un "polipéptido regulador tóxico" inducible que confiera toxicidad o la muerte celular a la planta cuando se exprese bajo el control regulador de un factor de inducción; en donde la planta objetivo seguidamente entra en contacto con el factor de inducción hasta un nivel que es suficiente para aumentar la actividad de la ruta reguladora tóxica en una medida que no sea letal para la planta objetivo;
- (d) analizando e identificando un co-herbicida que es más dañino o letal para la planta objetivo que para la planta de control (en la cual no se ha incrementado la actividad de la ruta reguladora) cuando el co-herbicida se pone en contacto con las plantas objetivo y de control;
- (e) identificando un segundo compuesto que,
 - (1) cuando se combina con el primer compuesto en una composición activa, es capaz de dañar o matar a la segunda planta cuando la segunda planta entra en contacto con la composición activa; y
 - (2) cuando entra en contacto con la segunda planta en una composición que carece del primer compuesto, es menos efectivo a la hora de dañar o matar a la segunda planta que la composición activa; e
- (f) identificando una concentración efectiva como herbicida del co-herbicida y el factor potenciador de forma que, cuando se aplica de forma exógena a la planta no deseada, el co-herbicida y el factor potenciador actúan de manera sinérgica para dañar o matar a la planta no deseada.

35 Realización 2. En otros aspectos de la presente descripción, la primera célula vegetal se genera mediante la transformación de una célula vegetal objetivo con un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido regulador tóxico que inhibe el crecimiento de una planta o la mata cuando se expresa en un nivel suficiente. Una dosis sub-letal de una sustancia química o un tratamiento ambiental se aplica a la primera célula vegetal para inducir la ruta reguladora de la planta sin matar a la célula vegetal.

40 Realización 3. En otro aspecto de esta descripción, la primera célula vegetal, la célula objetivo o la segunda célula vegetal están comprendidas dentro de una primera planta, una planta objetivo o una segunda planta, respectivamente.

45 Realización 4. En algunos aspectos de la descripción, se emplea un sistema de ensayo indicador para identificar un compuesto que aumenta la actividad de una ruta reguladora tóxica de la planta. Las etapas del método comprenden:

- (a) identificar un polinucleótido de gen marcador de la ruta reguladora de la planta, en donde la ruta reguladora de la planta puede dañar o matar a una célula vegetal objetivo y la expresión del gen marcador se altera al incrementarse la actividad de la ruta reguladora;
- (b) introducir un cassette de expresión que comprende una parte funcional de la región impulsora del gen marcador y un polinucleótido del gen indicador en una planta para generar una célula vegetal transgénica;
- (c) seleccionar uno o más compuestos que alteran la expresión del polinucleótido de gen indicador en la célula vegetal transgénica relativa a un compuesto de control cuando se pone en contacto con dicha célula de planta transgénica;
- (d) aplicar cada compuesto o más compuestos seleccionados en el paso (c) a una célula vegetal, en donde la actividad de la ruta reguladora se ha incrementado condicionalmente sin causar letalidad; y
- (e) seleccionar un compuesto que mata a la célula vegetal, en donde la actividad de la ruta reguladora se ha aumentado condicionalmente, en donde el compuesto no mata a una célula vegetal del mismo tipo y la misma especie en la que no se incrementa la actividad de la ruta reguladora.

55 Los ejemplos anteriores se presentan para ilustrar la descripción, pero no para limitar su alcance. Aunque la descripción anterior se ha descrito en detalle por medio de ilustraciones y ejemplos para mayor claridad de comprensión, resultará obvio que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 686 690 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mendel Biotechnology, Inc.
Armstrong, Joshua I

<120> ANÁLISIS DE COMPUESTO HERBICIDA

<130> MBI-0140P

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 588
<212> ADN
<213> Arabdiopsis thaliana

<220>
<223> G12 (familia AP2)

<400> 1
atggagacgg cgactgaagt ggccacggtg gtgtcaactc cggcgggttac ggttgccggcg 60
gtggcgacga ggaagagaga taagccgtat aaagggataa ggatgaggaa gtgggggaag 120
tgggtggcgg agataagaga gcctaataaa aggtcaagga tctggcttgg ctcttactct 180
actcctgaag cggcggcggc tgcttacgac acggcgggtgt tttatctccg aggtccttct 240
gctcggctta acttcccgga gcttttagcc ggagtgcggg tgacgggagg aggcggagga 300
ggagtgaacg gtggtggaga tatgtcggcg gcgtatataa ggagaaaagc ggcggagggtt 360
ggagcacaag tggatgcggtt agaagcggcg gggcggggag ggaatcgta tcatcatcat 420
catcaacatc aacgtggtaa tcatgattac gtagataatc atagtgatta tcgtattaat 480
gatgatctta tggagtgtag tagtaaagaa gggtttaaga ggtgtaatgg atcgttggaa 540
cgggttgatt taaacaaatt acccgatccg gaaacttcag atgacgat 588

<210> 2
<211> 196
<212> PRT
<213> Arabdiopsis thaliana

<220>
<223> Polipéptido G12 (dominio AP2 en coordenadas AA 27-94)

<400> 2

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

ES 2 686 690 T3

Met Ala Leu Asp Thr Leu Asn Ser Pro Thr Ser Thr Thr Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Phe Leu Arg Cys Leu Asp Glu Thr Glu Pro Glu Asn
 20 25 30

Leu Glu Ser Trp Thr Lys Arg Lys Arg Thr Lys Arg His Arg Ile Asp
 35 40 45

Gln Pro Asn Pro Pro Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Ala Leu Cys Leu
 50 55 60

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

His His Ser Leu Ser Pro Leu Ser Asp His Gln Lys Asp Tyr Lys Cys
 85 90 95

Ser Val Cys Gly Lys Ser Phe Pro Ser Tyr Gln Ala Leu Gly Gly His
 100 105 110

Lys Thr Ser His Arg Lys Pro Val Ser Val Asp Val Asn Asn Ser Asn
 115 120 125

Gly Thr Val Thr Asn Asn Gly Asn Ile Ser Asn Gly Leu Val Gly Gln
 130 135 140

Ser Gly Lys Thr His Asn Cys Ser Ile Cys Phe Lys Ser Phe Pro Ser
 145 150 155 160

Gly Gln Ala Leu Gly Gly His Lys Arg Cys His Tyr Asp Gly Gly Asn
 165 170 175

Gly Asn Ser Asn Gly Asp Asn Ser His Lys Phe Asp Leu Asn Leu Pro
 180 185 190

Ala Asp Gln Val Ser Asp Glu Thr Ile Gly Lys Ser Gln Leu Ser Gly
 195 200 205

Glu Glu Thr Lys Ser Val Leu
 210 215

<210> 5
 <211> 1227
 <212> ADN
 <213> Arabdiopsis thaliana

<220>
 <223> G1540 (familia HB)

<400> 5
 atctctttac taccagcaag ttgttttctt gctaacttca aacttctctt tctcttggtc 60
 ctctctaagt cttgatctta tttaccgtta actttgtgaa caaaagtcga atcaaacaca 120
 catggagccg ccacagcatc agcatcatca tcatcaagcc gaccaagaaa gcggaacaa 180
 caacaacaag tccggctctg gtggttacac gtgtcgccag accagcacga ggtggacacc 240
 gacgacggag caaatcaaaa tctcaaaaga actttactac aacaatgcaa tccggtcacc 300
 aacagccgat cagatccaga agatcactgc aaggctgaga cagttcggaa agattgaggg 360
 caagaacgtc ttttactggt tccagaacca taaggctcgt gagcgtcaga agaagagatt 420
 caacggaaca aacatgacca cccatcttc atcacccaac tcggttatga tggcggctaa 480

ES 2 686 690 T3

```

cgatcattat catcctctac ttcaccatca tcacggtggt cccatgcaga gacctgctaa      540
ttccgtcaac gttaaactta accaagacca tcctctctat catcataaca agccatatcc      600
cagcttcaat aacgggaatt taaatcatgc aagctcaggt actgaatgtg gtgttggttaa      660
tgcttctaataa ggctacatga gtagccatgt ctatggatct atggaacaag actgttctat      720
gaattacaac aacgtaggtg gaggatgggc aaacatggat catcattact catctgcacc      780
ttacaacttc ttcgatagag caaagcctct gtttgggtcta gaaggatcgc aagacgaaga      840
agaatgtggg ggcgatgctt atctggaaca tcgacgtacg cttcctctct tccctatgca      900
cggtgaagat cacatcaacg gtggtagtgg tgccatctgg aagtatggcc aatcggaagt      960
tcgcccttgc gcttctcttg agctacgtct gaactagctc ttacgccggg gtcgctcggg    1020
attaaagctc tttcctctct ctctctcttt cgtactcgta tgttcacaac tatgcttcgc    1080
tagtgattaa tgatgcagtt gttatattag tagttaacta gttatctctc gttatgtgta    1140
atgtgtaatt actagctaag tatcgtctag gtttaattgt aattgacaac cgtttatctc    1200
tatgatgaat aagttaaatt tatatat                                          1227

```

```

<210> 6
<211> 291
<212> PRT
<213> Arabdiopsis thaliana

```

```

<220>
<223> Polipéptido G1540 (homeodominio en coordenadas AA 35-98)
<400> 6

```

```

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

```


ES 2 686 690 T3

tattcttttctt cttcttttttg gttattataaaa ccaatctggt tcatatgatt ttt

1013

<210> 8

<211> 216

<212> PRT

<213> Arabdiopsis thaliana

<220>

<223> Polipéptido G2298 (dominio AP2 en coordenadas AA 4 -70)

<400> 8

```

Met Asp Ala Ser Pro Lys Tyr Thr Gly Val Arg Lys Arg Lys Trp Gly
1          5          10          15

Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Leu Pro Asn Ser Arg Asp Arg Ile Trp
          20          25          30

Leu Gly Ser Phe Asp Ser Ala Glu Lys Ala Ala Arg Ala Phe Asp Ala
          35          40          45

Ala Leu Tyr Cys Leu Arg Gly Pro Gly Ala Arg Phe Asn Phe Pro Asp
          50          55          60

Asn Pro Pro Glu Ile Pro Gly Gly Arg Ser Leu Thr Pro Gln Gln Ile
65          70          75          80

Gln Val Val Ala Ser Arg Phe Ala Cys Glu Glu Glu Leu Leu Pro Pro
          85          90          95

Glu Gln His His Pro Ser Pro Pro Arg Gly Asp His Asn Thr Glu Glu
          100          105          110

Glu Val Ile Ile Ser Ala Arg Gly Glu Ile Asn Ser Gly Ser Gly Gly
          115          120          125

Pro Thr Leu Gly Gln Val Gly Glu Asp Asn Asn Asn Glu Gly Asn Ser
          130          135          140

Asn Asp Thr Ser Ser Tyr Trp Pro Leu Ile Trp Glu Glu Glu Asn Phe
          145          150          155          160

Val Gly Pro Pro Asn Ser Asp His Glu Phe Gly Phe Phe Thr Asp Asp
          165          170          175

Ser Thr Asn Leu Tyr Phe Pro Thr Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Leu
          180          185          190

Ser Ser Asp Phe Tyr Tyr Asp Gly Ala Cys Glu Asp Asp Phe Ser His
          195          200          205

Tyr Asn Ile Asn Leu Trp Asn Phe
          210          215
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una composición efectiva como herbicida que daña o destruye una célula de una planta objetivo, comprendiendo el método:
- 5
- (a) proporcionar una primera planta y una segunda planta de la misma especie vegetal;
 - (b) identificar una ruta reguladora capaz de dañar o destruir un miembro de la planta cuando la actividad de la ruta reguladora aumenta en el miembro de la planta;
 - 10 (c) aumentar condicionalmente la actividad de la ruta reguladora a un nivel sub-letal en la primera planta mediante su transformación con un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido regulador tóxico bajo el control de un impulsor inducible que puede activarse por medio de un tratamiento químico o medioambiental, y
 - 15 en donde en ausencia de activación con tratamiento químico o medioambiental, el polipéptido regulador tóxico no mata a la primera planta;
 - (d) identificar un primer compuesto que es más efectivo para dañar o matar a la primera planta que a la segunda planta en el que la actividad de la ruta reguladora no se incrementa cuando el primer compuesto entra en contacto con la primera y la segunda plantas; e
 - 20 (e) identificar un segundo compuesto que,
 - (1) cuando se combina con el primer compuesto en una composición activa, es capaz de dañar o matar a la segunda planta cuando la segunda planta entra en contacto con la composición activa; y
 - 25 (2) cuando entra en contacto con la segunda planta en una composición que carece del primer compuesto es menos efectiva a la hora de dañar o matar a la segunda planta que la composición activa.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la planta es una planta dañina o no deseada.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en donde la planta dañina o no deseada es una planta monocotiledónea.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la planta dañina o no deseada es una planta dicotiledónea.
5. Un método para identificar un compuesto que aumenta la actividad de una ruta reguladora tóxica de la planta, comprendiendo el método:
- 35
- (a) identificar un polinucleótido de gen marcador de una ruta reguladora de la planta, en donde la ruta reguladora de la planta puede dañar o matar a una célula vegetal objetivo y la expresión del gen marcador se altera cuando se incrementa la actividad de la ruta reguladora;
 - 40 (b) introducir un cassette de expresión que comprende una parte funcional de la región promotora del gen marcador y un polinucleótido del gen indicador en una planta para generar una célula vegetal transgénica;
 - (c) seleccionar uno o más compuestos de una biblioteca de compuestos que alteran la expresión del polinucleótido del gen indicador en la célula vegetal transgénica referente a un compuesto de control cuando entra en contacto con la célula vegetal transgénica, en donde uno o más compuestos no son herbicidas para la célula vegetal objetivo cuando se aplica individualmente;
 - 45 (d) aplicando cada compuesto o compuestos seleccionados en el paso (c) a una célula vegetal en donde la actividad de la ruta reguladora se ha incrementado condicionalmente sin causar letalidad; e
 - 50 (e) identificar al menos un compuesto que mata a la célula vegetal en la cual se ha incrementado condicionalmente la actividad de la ruta reguladora.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el gen marcador se identifica mediante la caracterización transcripcional de todo el genoma basada en su expresión alterada tras la mayor actividad de la ruta reguladora de la planta.
- 55
7. El método de la reivindicación 5, que además comprende los pasos de:
- 60 (f) aplicar una combinación de compuestos identificados en el paso (e) a una célula vegetal;
 - (g) seleccionar una combinación de eficacia herbicida de compuestos que matan sinérgicamente a la célula vegetal.
8. El método de la reivindicación 5, en donde se identifica un primer compuesto en el paso (e), además comprendiendo el método:
- 65

- 5 (f) identificar un segundo compuesto que mata a una segunda célula vegetal cuando la segunda célula vegetal entra en contacto con una composición activa que comprende el primer y el segundo compuesto, pero en donde el segundo compuesto no mata a la segunda célula vegetal cuando la segunda célula vegetal entra en contacto con el segundo compuesto en ausencia del primer compuesto; y
- (g) combinar el primer y el segundo compuesto en una composición con eficacia herbicida, en donde el primer compuesto y el segundo compuesto proporcionan sinérgicamente la función herbicida en la composición activa.
- 10 9. El método de la reivindicación 5, que además comprende los pasos de:
- (f) seleccionar una combinación de compuestos identificados en el paso (e) que mata a una planta en la cual no se incrementa la actividad de la ruta reguladora.

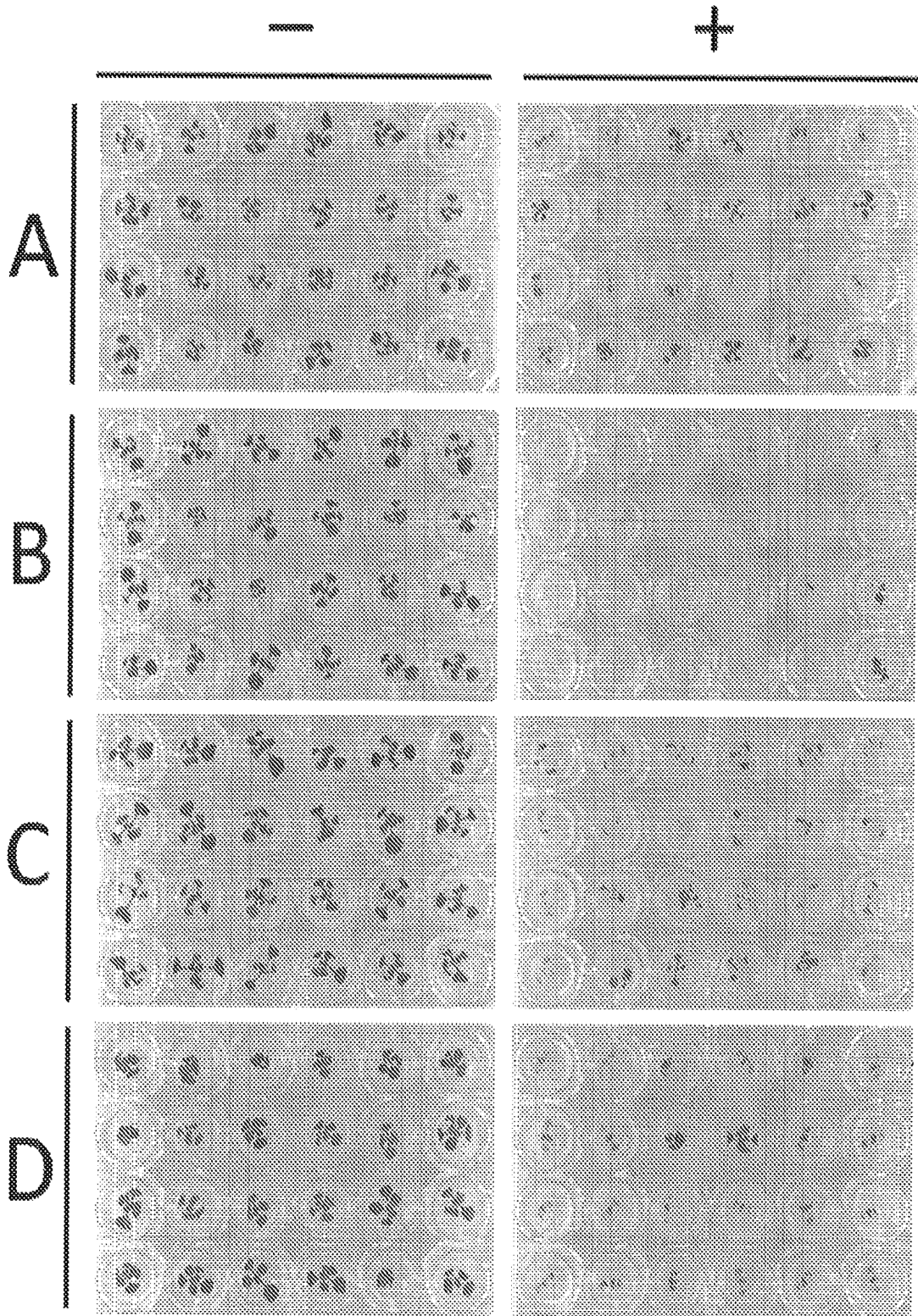


Fig. 1

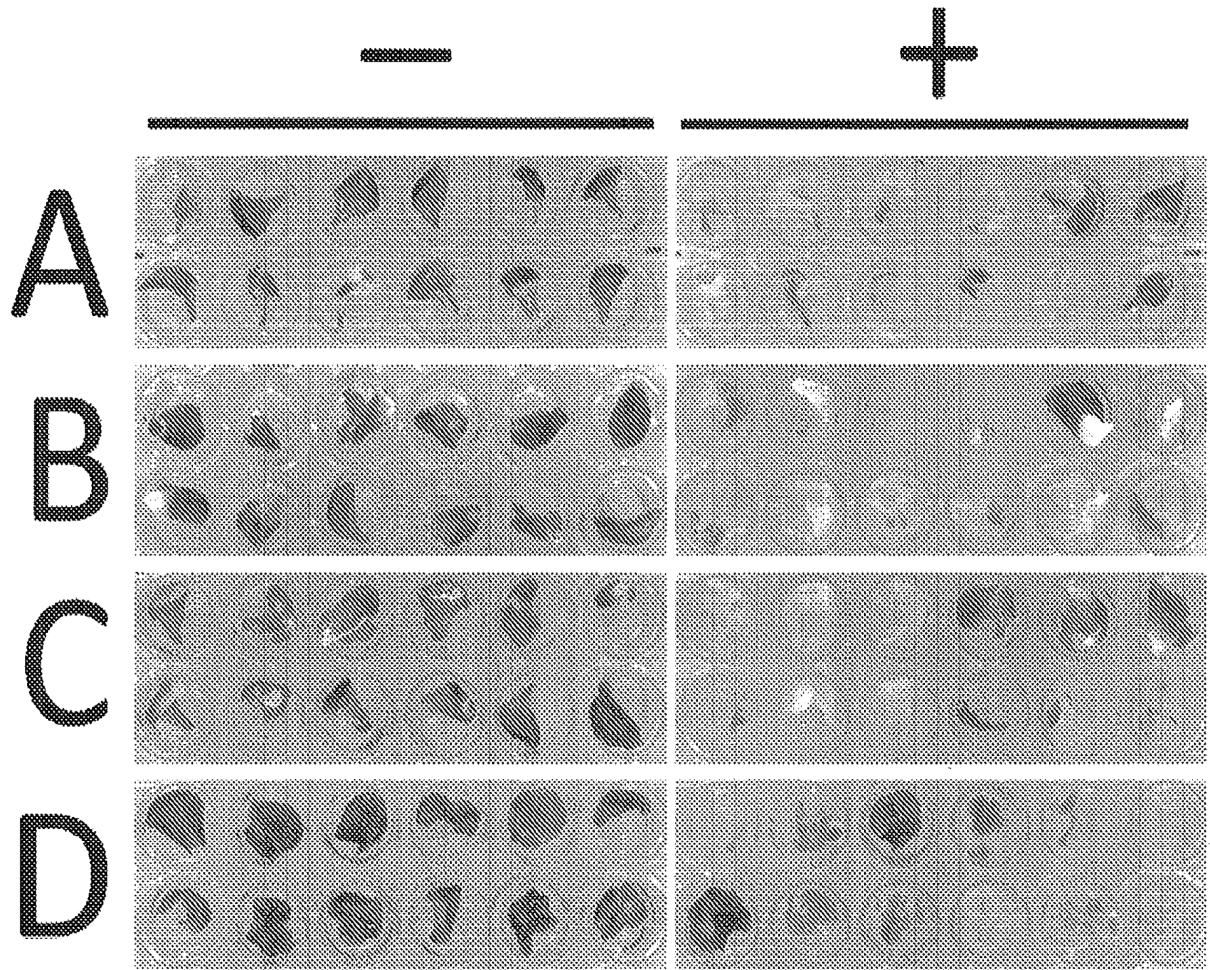


Fig. 2

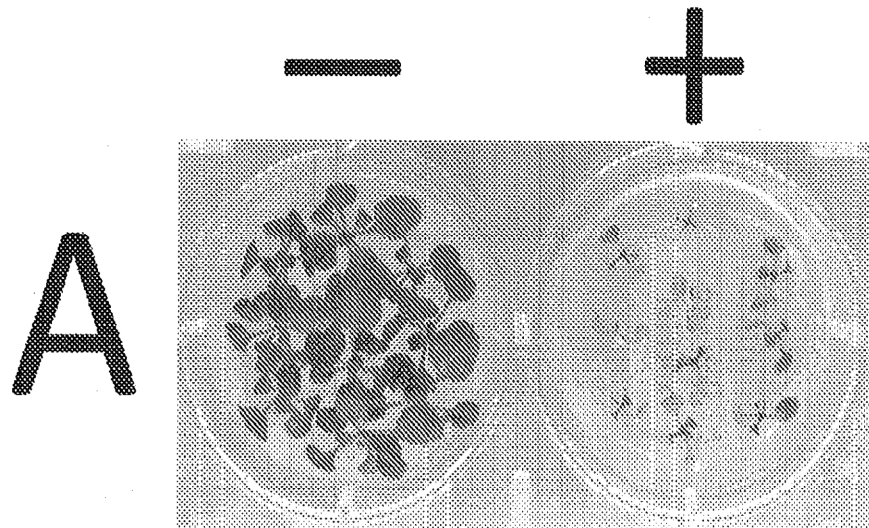


Fig. 3

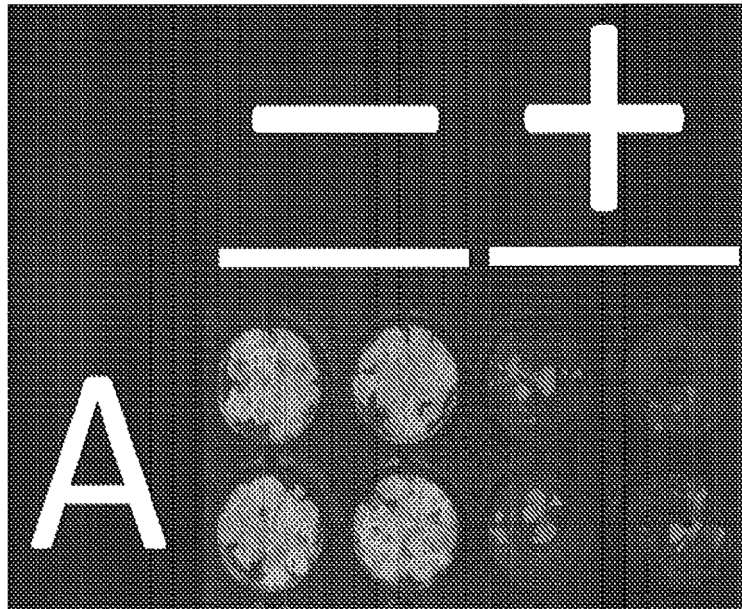


Fig. 4