



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 319 346**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99108463 .3**

(96) Fecha de presentación : **30.04.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0953646**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.1999**

(54) Título: **Plantas transgénicas tolerantes a los herbicidas en las cuales el herbicida inhibe la biosíntesis de la porfirina.**

(30) Prioridad: **30.04.1998 JP 10-120553**
02.10.1998 JP 10-281127
20.11.1998 JP 10-330981
02.03.1999 JP 11-54730

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2009

(73) Titular/es: **Sumitomo Chemical Company, Limited**
27-1, Shinkawa 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8260, JP

(72) Inventor/es: **Nakajima, Hiroki y**
Nagasawa, Akitsu

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 319 346 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 transgénicas tolerantes a los herbicidas en las cuales el herbicida inhibe la biosíntesis de la porfirina.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para proporcionar a las plantas resistencia a compuestos para el control de malas hierbas.

Descripción de la técnica relacionada

El control de las malas hierbas es un trabajo muy importante para mejorar los rendimientos y la calidad de las plantas cultivadas. Para este fin, se utilizan principalmente compuestos para el control de las malas hierbas tales como los herbicidas. Sin embargo, para utilizar compuestos para el control de las malas hierbas, no siempre es fácil distinguir las plantas cultivadas de las malas hierbas de especies aliadas para controlar selectivamente sólo las malas hierbas. En ese caso, se ha intentado la producción de plantas que tienen resistencia a los compuestos para el control de las malas hierbas (en adelante referida como resistencia al compuesto de control de las malas hierbas) y se han puesto en uso práctico algunas plantas resistentes.

Recientemente, se han utilizado técnicas de ingeniería genética para producir plantas que tienen resistencia a compuestos para el control de las malas hierbas. En cuanto a semejante técnica, por ejemplo, Hinchee, M.A.W. *et al.* describen un método para producir una planta que tiene resistencia a un herbicida, glifosato, donde el gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que es una enzima diana del glifosato es sometido a mutagénesis de manera que se reduce la afinidad por el glifosato, y el gen es introducido en una planta [Hinchee, M.A.W. *et al.*, BIO/TECHNOLOGY, 6: pág. 915 (1988)].

Objetos de la invención

Las variedades de métodos conocidos para proporcionar resistencia a compuestos para el control de las malas hierbas a las plantas no son necesariamente suficientes y se ha deseado desarrollar diversas clases adicionales de métodos para proporcionar resistencia a compuestos para el control de las malas hierbas a plantas.

El objeto principal de la presente invención es proporcionar una nueva clase de método para proporcionar resistencia a compuestos para el control de las malas hierbas a plantas.

Este objeto así como otros objetos y ventajas de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un mapa de restricción del plásmido pETBCH. bchH es un gen de la subunidad de unión a la protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de una bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. T7 pro representa la secuencia promotora del fago T7, y T7 ter representa la secuencia terminadora del fago T7. Amp^r es el gen de resistencia a ampicilina, lacI^q es un gen de la proteína represora de un operón lactosa, y ori es el origen de replicación.

La Fig. 2 es el mapa de restricción del plásmido pACYCSP. PPO es el gen de la protoporfirinógeno oxidasa IX de soja y lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Cm^r es un gen resistente a cloranfenicol y ori es el origen de replicación.

La Fig. 3 es el mapa de restricción del plásmido pTVBCH. bchH es el gen de la subunidad de unión a la protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r es un gen resistente a ampicilina y ori es el origen de replicación.

La Fig. 4 es el mapa de restricción del plásmido pBIBCH. bchH es el gen de la subunidad de unión a la protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. NP es la secuencia promotora de un gen de la nopalina sintasa, NT es la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII representa un gen resistente a la kanamicina, y RB y LB representan las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T respectivamente.

La Fig. 5 es el mapa de restricción del plásmido pNO. NP es la secuencia promotora de un gen de la nopalina sintasa, NT es la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintasa, y 35S es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII representa un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB representan las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 6 es el mapa de restricción del plásmido pTCHLH. TCHLH es el gen de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de tabaco cuya señal de tránsito a cloroplastos ha sido suprimida. lac pro representa

la secuencia promotora de un operón lactosa. Am^r es un gen de resistencia a ampicilina, Km^r es un gen de resistencia a kanamicina y ori es el origen de replicación.

La Fig. 7 es el mapa de restricción del plásmido pBITCHLH. TCHLH es la subunidad de unión a la protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de tabaco cuya señal de tránsito a cloroplastos ha sido suprimida. NP es la secuencia promotora de la nopalina sintasa, NT es la secuencia terminadora de la nopalina sintasa y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII representa un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB representan las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 8 es el mapa de restricción del plásmido pTVGMP. GMP es el gen de la protoporfirinógeno IX oxidasa de soja cuya señal de tránsito a cloroplastos y cuya secuencia de unión a FAD han sido suprimidas. lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r representa un gen de resistencia a ampicilina y ori es el origen de replicación.

La Fig. 9 es el mapa de restricción del plásmido pBIGMP. GMP es el gen de la protoporfirinógeno oxidasa de soja cuya señal de tránsito a cloroplastos y cuya secuencia FAD han sido suprimidas. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 10 es el mapa de restricción del plásmido pTVCRP. CRP es el gen de la protoporfirinógeno oxidasa de *Chlamydomonas reinhardtii* cuya señal de tránsito a cloroplastos y cuya secuencia FAD han sido suprimidas. lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r es un gen de resistencia a ampicilina y ori es el origen de replicación.

La Fig. 11 es el mapa de restricción del plásmido, pBICRP. CRP es el gen de la protoporfirinógeno oxidasa de *Chlamydomonas reinhardtii* cuya señal de tránsito a cloroplastos y cuya secuencia de unión a FAD han sido suprimidas. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 12 es el mapa de restricción del plásmido pTVHVF1. HVF es el gen de la ferroquelatasa de la cebada cuya secuencia señal ha sido suprimida. lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r representa un gen de resistencia a ampicilina y ori es el origen de replicación.

La Fig. 13 es el mapa de restricción del plásmido pBIHVF. HVF es el gen de la ferroquelatasa de la cebada cuya secuencia señal ha sido suprimida. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 14 es el mapa de restricción del plásmido pTVCSF. CSF es el gen de la ferroquelatasa de pepino cuya secuencia señal ha sido suprimida. lac pro representa la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r es un gen de resistencia a ampicilina, y ori es el origen de replicación.

La Fig. 15 es el mapa de restricción del plásmido pBICSF. CSF es el gen de la ferroquelatasa de pepino cuya secuencia señal ha sido suprimida. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 16 es el mapa de restricción del plásmido pHEMF. HEMF es el gen de la coproporfirinógeno III oxidasa (hemF) de *Escherichia coli*. lac pro es la secuencia promotora de un operón lactosa. Amp^r es un gen de resistencia a ampicilina, y ori es el origen de replicación.

La Fig. 17 es el mapa de restricción del plásmido pBIHEMF. HEMF es el gen de la coproporfirinógeno III oxidasa (hemF) de *Escherichia coli*. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 18 es el mapa de restricción del plásmido pBIHASYS8. HASYS8 es un gen que codifica la proteína MG (HASYS)₈. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

La Fig. 19 es el mapa de restricción del plásmido pBIRASSL8. RASSL8 es la proteína MG(RASSL)₈. NP es la secuencia promotora de una nopalina sintasa y NT es la secuencia terminadora de una nopalina sintasa, y 35S es el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor. NPTII es un gen de resistencia a la kanamicina, y RB y LB son las secuencias limítrofes derecha e izquierda del ADN-T, respectivamente.

Compendio de la invención

En estas circunstancias, los autores de la presente invención han estudiado intensamente con el fin de desarrollar una nueva clase de métodos para proporcionar resistencia a los compuestos para el control de las malas hierbas a las plantas. Como resultado, han descubierto que se puede proporcionar resistencia a los compuestos para el control de las malas hierbas a las plantas permitiendo que las plantas produzcan cierta proteína en las células de la planta. De este modo, se ha completado la presente invención.

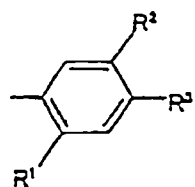
Esto es, la presente invención proporciona los siguientes apartados:

1. Un método para elaborar plantas resistentes a compuestos para el control de las malas hierbas que comprende las etapas de
 - (a) introducir en una célula vegetal un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en:
 - magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX;
 - ferroquelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX;
 - cobalto quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,
 - un péptido que tiene afinidad por la protoporfirina IX, compuesto por 6 a 100 aminoácidos, estando dicho péptido sustancialmente libre de regiones marco de regiones variables de una inmunoglobulina;
 - protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX; y coprotoporfirinógeno III oxidasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX,
 - no teniendo sustancialmente dicha proteína capacidad de modificar el protoporfirinógeno IX; y
 - (b) expresar el gen.
2. El método de acuerdo con el apartado 1, donde el compuesto para el control de las malas hierbas está inhibiendo la biosíntesis de porfirina de una planta.
3. El método de acuerdo con el apartado 1 o 2, donde el compuesto para el control de las malas hierbas es un compuesto herbicida de tipo inhibidor de la proto-porfirinógeno IX oxidasa.
4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es una magnesio quelatasa o una variante de dicha proteína que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX.
5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa, o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por la protoporfirina IX.
6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 5, donde la magnesio quelatasa deriva de un microorganismo fotosintético o una planta.
7. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 6, donde la magnesio quelatasa deriva de tabaco.
8. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es una protoporfirinógeno IX oxidasa variante que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene afinidad específica por el protoporfirinógeno IX.
9. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es protoporfirinógeno IX oxidasa variante que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene una afinidad específica por el compuesto herbicida de tipo inhibidor de la protoporfirinógeno IX oxidasa.
10. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, 8 o 9, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de una planta.
11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3 u 8 a 10, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de soja.

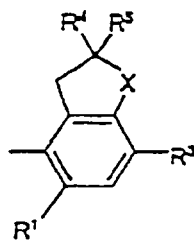
ES 2 319 346 T3

12. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, 8 o 9, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de algas.
- 5 13. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, 8, 9 o 12, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de *Chlamydomonas*.
14. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es ferroquelatasa o una variante de dicha proteína que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX.
- 10 15. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3 o 14, donde la ferroquelatasa deriva de una planta.
16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, 14 o 15, donde la ferroquelatasa deriva de cebada o pepino.
- 15 17. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, o SEQ ID NO: 60.
- 20 18. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, o 17, donde el péptido comprende la repetición de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53, 55, 57 o 59 cuatro veces u ocho veces.
19. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, donde la proteína es coproporfirinógeno III oxidasa o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por el protoporfirinógeno IX.
- 25 20. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3 o 19, donde la coproporfirinógeno III oxidasa deriva de un microorganismo.
21. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, 19 o 20, donde la coproporfirinógeno III oxidasa deriva de *Escherichia coli*.
- 30 22. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 21, donde el gen es introducido en la célula vegetal de forma que está ligado operablemente a un promotor y un terminador ambos los cuales son funcionales en la célula vegetal.
- 35 23. El método del apartado 1, donde el compuesto para el control de las malas hierbas está inhibiendo la transferencia de electrones en la fotosíntesis, la biosíntesis de carotenoides, la biosíntesis de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos o la biosíntesis de pared celular, influyendo en la biosíntesis de proteínas, la biosíntesis de ácidos nucleicos o la división celular o tiene una actividad antagónica de la auxina.
- 40 24. El método del apartado 23, donde el compuesto para el control de las malas hierbas que inhibe la transferencia de electrones en la fotosíntesis es un compuesto que inhibe la transferencia de electrones del sistema fotoquímico I o II o que inhibe la 4-hidroxifenil-piruvato dioxigenasa (4-HPPD); el que inhibe la biosíntesis de carotenoides es un compuesto que inhibe la fitoeno-desaturasa (PDS); el que inhibe la biosíntesis de aminoácidos es un compuesto que inhibe EPSPS, acetolactato sintasa (ALS), glutamina sintetasa (GS) o dihidropteroato sintasa (DHP); el que inhibe la biosíntesis de lípidos es un compuesto que inhibe la acetil CoA carboxilasa (ACC); el que inhibe la biosíntesis de la pared celular es un compuesto que inhibe la biosíntesis de celulosa; el que influye en la biosíntesis de proteínas, la biosíntesis de ácidos nucleicos o la división de la pared celular es un compuesto que inhibe la formación de microtúbulos; o el que tiene actividad antagónica de auxina es un compuesto que potencia la elongación y diferenciación celular.
- 45 25. El método del apartado 24, donde el compuesto que inhibe la transferencia de electrones en el sistema fotosintético I es paracuat o dicuat; el que inhibe la transferencia de electrones en el sistema fotoquímico II es un compuesto de triazina, un compuesto de urea o un compuesto de nitrilo; el que inhibe 4-HPPD es un isoxazol, pirazol o tricetona; el que inhibe la PDS es norflurazon, flurocloridon, fluridona, flurtamona o diflufenican; el que inhibe la EPSPS es glifosato; el que inhibe la ALS es una sulfonilurea, una imidazolinona, un pirimidiniltiobenzoato o una triazolopirimidina; el que inhibe la GS es bialafos o glufosinato; el que inhibe la DHP es asulam; el que inhibe la ACC es una ciclohexanediona o un ariloxifenoxipropionato; o el que inhibe celulosa es diclobenilo.
- 60 26. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 22, donde el compuesto para el control de las malas hierbas es un compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa seleccionado entre los compuestos de los apartados (1) a (3) de más abajo:
- 65 (1) clormetoxinil, bifenox, clornitrofen, acifluorfen y su éster etílico, acifluorfen-sodio, oxifluorfen, oxadiazon, 2-[4-cloro-2-fluoro-5-(prop-2-inilo)fenil]-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-isoindol-1,3-diona, clorftalim, TNPP-etilo, o N3-(1-feniletil)-2,6-dimetil-5-propionilnicotinamida;

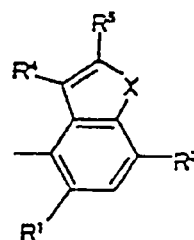
- (2) un compuesto representado por la fórmula general: J-G (I), donde G es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales G-1 a G-9 y J es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales J-1 a J-30:



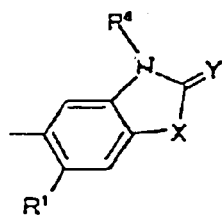
G-1



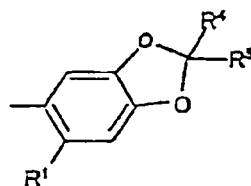
G-2



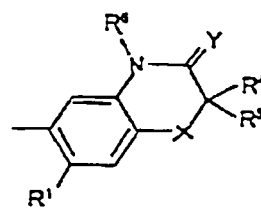
G-3



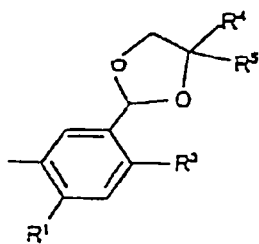
G-4



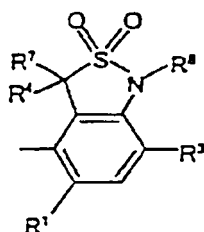
G-5



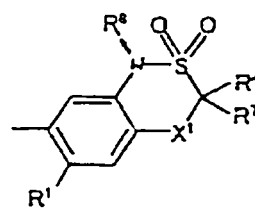
G-6



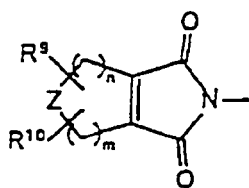
G-7



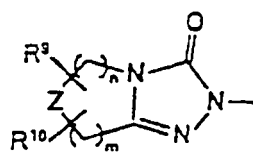
G-8



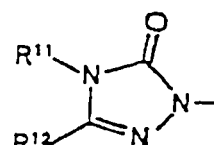
G-9



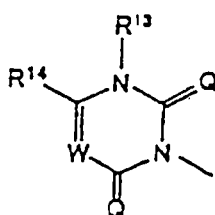
J-1



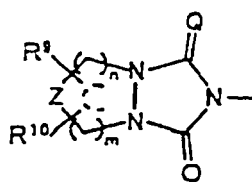
J-2



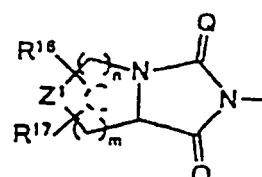
J-3



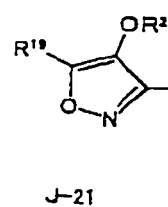
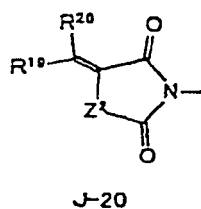
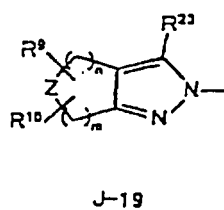
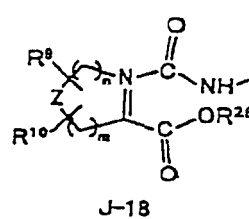
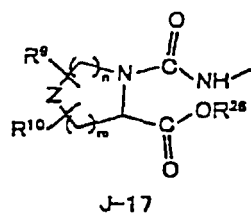
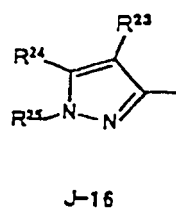
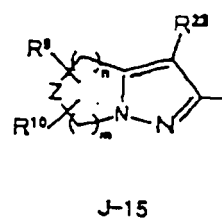
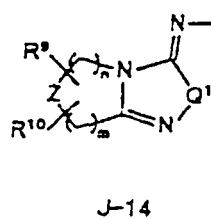
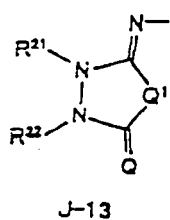
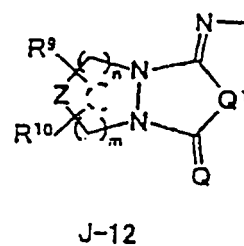
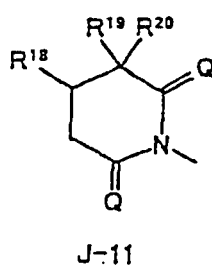
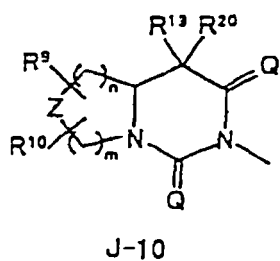
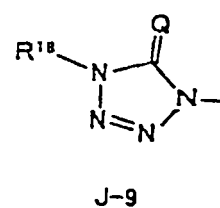
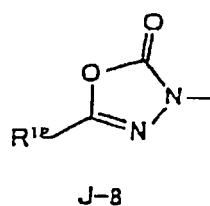
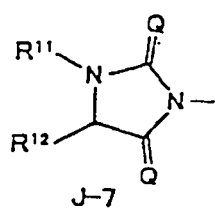
J-4

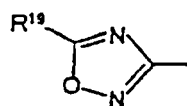


J-5

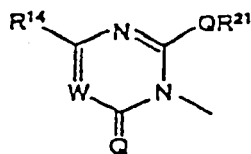


J-6

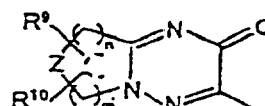




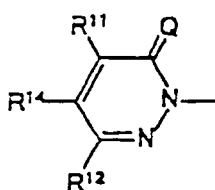
J-22



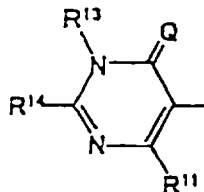
J-23



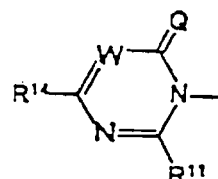
J-24



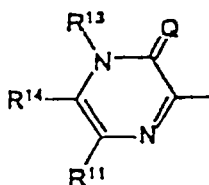
J-25



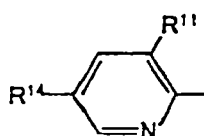
J-26



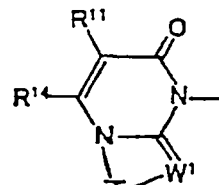
J-27



J-28



J-29



J-30

donde las líneas discontinuas de las fórmulas J-5, J-6, J-12 y J-24 representan que el anillo de la izquierda contiene solamente enlaces sencillos, o un enlace en el anillo es un doble enlace entre átomos de carbono;

X es un átomo de oxígeno o un átomo azufre;

Y es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

R¹ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

R² es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un átomo de halógeno, un grupo OH, un grupo OR²⁷, un grupo SH, un grupo S(O)_pR²⁷, un grupo OR²⁷, un grupo CO₂R²⁷, un grupo C(O)SR²⁷, un grupo C(O)NR²⁹R³⁰, un grupo CHO, un grupo CR²⁷=NOR³⁶, un grupo CH=CR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CH₂CHR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CO₂N=CR³¹R³², un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo NHSO₂R³³, un grupo NHSO₂NHR³³, un grupo NR²⁷R³⁸, un grupo NH₂ o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo C₁-C₄ iguales o diferentes;

p es 0, 1 o 2;

R³ es un grupo alquilo C₁-C₂, un grupo haloalquilo C₁-C₂, un grupo OCH₃, un grupo SCH₃, un grupo OCHF₂, un átomo de halógeno, un grupo ciano o un grupo nitro;

R⁴ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un grupo haloalquilo C₁-C₃ o un átomo de halógeno;

R⁵ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un átomo de halógeno, un grupo haloalquilo C₁-C₃, grupo ciclopropilo, un grupo vinilo, un grupo alquilo C₂, un grupo ciano, un grupo C(O)R³⁸, un grupo CO₂R³⁸, un grupo C(O)NR³⁸R³⁹, un grupo CR³⁴R³⁵CN, un grupo CR³⁴R³⁵C(O)R³⁸, un grupo CR³⁰R³⁵CO₂R³⁸, un grupo CR³⁴R³⁵C(O)NR³⁸R³⁹, un grupo CHR³⁴OH, un grupo CHR³⁴OC(O)R³⁸ o un grupo OCHR³⁴OC(O)NR³⁸R³⁹, o, cuando G es G-2 o G-6, R⁴ y R⁵ pueden formar un grupo C=O junto con el átomo de carbono al que están anclados;

ES 2 319 346 T3

R⁶ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alcoxialquilo C₂-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆ o un grupo alquinilo C₃-C₆;

X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NH, un grupo N (alquilo C₁-C₃), un grupo N(haloalquilo C₁-C₃) o un grupo N(alilo);

R⁷ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo S(O)₂(alquilo C₁-C₆) o un grupo C(=O)R⁴⁰;

R⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo alquenilo C₃-C₈, un grupo alquinilo C₃-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un grupo alcoxialquilo C₂-C₈, un grupo alcoxialcoxialquilo C₃-C₈, un grupo alcoxialquinilo C₃-C₈, un grupo haloalquenilo C₃-C₈, un grupo alquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo haloalquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo alcoxicarbonilalquilo C₃-C₈, un grupo S(O)₂NH(alquilo C₁-C₈), un grupo C(O)R⁴¹ o un grupo bencilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con R⁴²;

n y m son independientemente 0, 1, 2 o 3 y m + n es 2 o 3;

Z es un grupo CR⁹R¹⁰, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo S(O), un grupo S(O)₂ o un grupo N(alquilo C₁-C₄);

cada R⁹ es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo haloalcoxi C₁-C₆, un grupo alquilcarboniloxi C₂-C₆ o un grupo haloalquilcarboniloxi C₂-C₆;

cada R¹⁰ es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, y un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R¹¹ y R¹² son independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆ o un grupo haloalquilo C₁-C₆;

R¹³ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆, un grupo haloalquenilo C₃-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆, un grupo haloalquinilo C₃-C₆, un grupo HC(=O), un grupo (alquilo C₁-C₄)C(=O) o un grupo NH₂;

R¹⁴ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alquil(C₁-C₆)tio, un grupo haloalquilo C₁-C₆ o un grupo N(CH₃)₂;

W es un átomo de nitrógeno o CR¹⁵;

R¹⁵ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno, o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C₁-C₆, uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo CF₃;

cada Q es independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Q¹ es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Z¹ es un grupo CR¹⁶R¹⁷, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo S(O), un grupo S(O)₂ o un grupo N(alquilo C₁-C₄);

cada R¹⁶ es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo haloalcoxi C₁-C₆, un grupo alquilcarboniloxi C₂-C₆ o un grupo haloalquilcarboniloxi C₂-C₆;

cada R¹⁷ es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R¹⁸ es un grupo alquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo C₁-C₆;

R¹⁹ y R²⁰ son independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, o un grupo haloalquilo C₁-C₆;

Z² es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NR⁹ o un grupo CR⁹R¹⁰;

R²¹ y R²² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆, un grupo haloalquenilo C₃-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆ o un grupo haloalquinilo C₃-C₆;

ES 2 319 346 T3

R²³ es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo ciano;

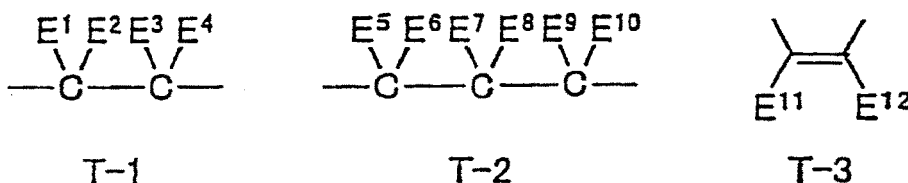
R²⁴ es un grupo alquil(C₁-C₆)sulfonilo, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo haloalcoxi C₁-C₆ o un átomo de halógeno;

R²⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₃-C₆ o un grupo alquinilo C₃-C₆;

R²⁶ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆ o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con C₁-C₆ alquilo, uno o dos átomos de halógeno, uno o dos grupos nitro, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo CF₃;

W¹ es un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

T es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales T-1, T-2 y T-3;



(donde E¹, E², E³, E⁴, E⁵, E⁶, E⁷, E⁸, E⁹, E¹⁰, E¹¹ y E¹² son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃);

R²⁷ es un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo alquenilo C₃-C₈, un grupo alquinilo C₃-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un grupo alcoxialquilo C₂-C₈, un grupo alquiltioalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfinil-alquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfonilalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo fenilsulfonilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxialcoxialquilo C₄-C₈, un grupo cicloalquilalquilo C₄-C₈, un grupo cicloalcoxialquilo C₆-C₈, un grupo alqueniloxialquilo C₄-C₈, un grupo alquiniloxialquilo C₄-C₈, un grupo haloalcoxialquilo C₃-C₈, un grupo haloalqueniloxialquilo C₃-C₈, un grupo haloalquiniloxialquilo C₃-C₈, un grupo cicloalquiltioalquilo C₆-C₈, un grupo alqueniltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquiniltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquilo C₁-C₄ cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo benciloxi cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo trialkilsililalquilo C₄-C₈, un grupo cianoalquilo C₃-C₈, un grupo halocicloalquilo C₃-C₈, un grupo haloalquenilo C₃-C₈, un grupo alcoxialquenilo C₅-C₈, un grupo haloalcoxialquenilo C₅-C₈, un grupo alquiltioalquenilo C₅-C₈, un grupo alcoxialquinilo C₃-C₈, un grupo alcoxialquinilo C₅-C₈, un grupo haloalcoxialquinilo C₅-C₈, un grupo alquiltioalquinilo C₅-C₈, un grupo alquilcarbonilo C₂-C₈, un grupo bencilo cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo CHR³⁴COR²⁸, un grupo CHR³⁴COOR²⁸, un grupo CHR³⁴P(O)(OR²⁸)₂, CHR³⁴P(S)(OR²⁸)₂, un grupo CHR³⁴C(O)NR²⁹R³⁰ o un grupo CHR³⁴C(O)NH₂;

R²⁸ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alquenilo C₂-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆ o un grupo tetrahydrofuranilo;

R²⁹ y R³¹ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R³⁰ y R³² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃; o,

R²⁹ y R³⁰ pueden formar juntos -(CH₂)₅-, -(CH₂)₄- o -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, o el anillo formado de este modo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo C₁-C₃, un grupo fenilo y un grupo bencilo; o,

R³¹ y R³² pueden formar un grupo cicloalquilo C₃-C₈ junto con el átomo de carbono al que están anclados;

ES 2 319 346 T3

R^{33} es un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo haloalquilo C_1-C_4 o un grupo alquenoilo C_3-C_6 ;

R^{34} y R^{35} son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4 ;

R^{36} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alquenoilo C_3-C_6 o un grupo alquinoilo C_3-C_6 ;

R^{37} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_4 o un átomo de halógeno;

R^{38} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo cicloalquilo C_3-C_6 , un grupo alquenoilo C_3-C_6 , un grupo alquinoilo C_3-C_6 , un grupo alcohalquilo C_2-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_1-C_4 y un grupo alcoxi C_1-C_4 , un grupo $-CH_2CO_2$ (alquilo C_1-C_4) o un grupo $-CH(CH_3)CO_2$ (alquilo C_1-C_4);

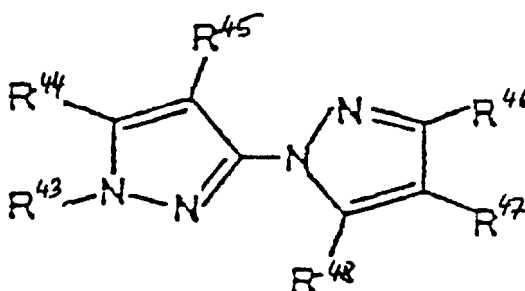
R^{39} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_2 o un grupo $C(O)O$ (alquilo C_1-C_4);

R^{40} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alcoxi C_1-C_6 o un grupo NH (alquilo C_1-C_6);

R^{41} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alcoxi C_1-C_6 , un grupo NH (alquilo C_1-C_6), un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo R^{42} , un grupo bencilo y un grupo dialquilamino C_2-C_8 ; y

R^{42} es un grupo alquilo C_1-C_6 , uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C_1-C_6 o un grupo CF_3 ;

(3) un compuesto de fórmula (II):



o nipilacrofeno,

donde R^{43} es un grupo alquilo C_1-C_4 ;

R^{44} es un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alquil(C_1-C_4)tio, un grupo alcoxi C_1-C_4 , un grupo haloalquilo C_1-C_4 , un grupo haloalquil(C_1-C_4)tio o un grupo haloalcoxi C_1-C_4 ;

R^{43} y R^{44} pueden formar juntos $-(CH_2)_3-$ o $-(CH_2)_4-$;

R^{45} es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

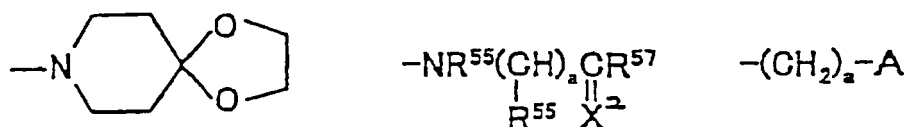
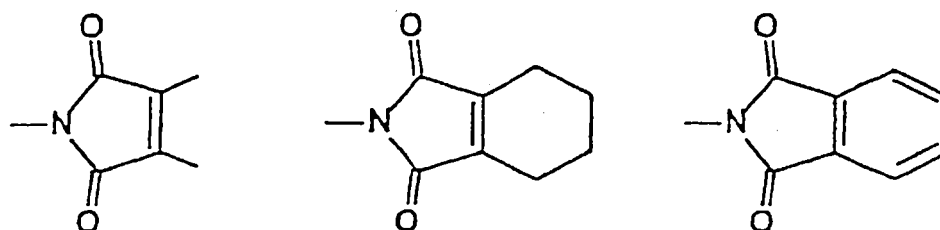
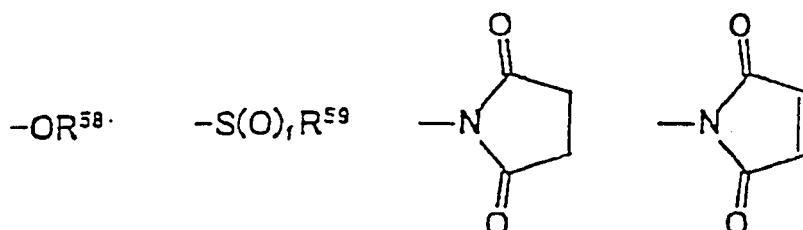
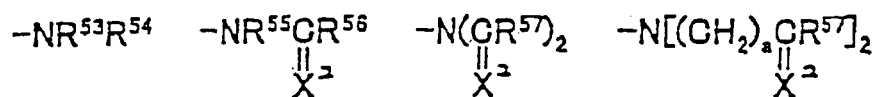
R^{46} es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4 ;

R^{47} es un átomo de hidrógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo $-COOR^{49}$, un grupo $-C(=X)NR^{50}R^{51}$ o un grupo $-C(=X^2)R^{52}$;

R^{48} es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_4 , un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alcoxi C_1-C_4 y un grupo haloalquilo C_1-C_4 , un grupo pirrolilo, un grupo alquilo C_2-C_8 , un grupo alquenoilo C_3-C_8 , un grupo alquinoilo C_3-C_8 , un grupo alcoxi C_3-C_8 , un grupo seleccionado del grupo que consiste en un

ES 2 319 346 T3

grupo alquilo C₂-C₈, un grupo alquenilo C₃-C₈, un grupo alquinilo C₃-C₈ y un grupo alcoxi C₃-C₈ en el que al menos se inserta un átomo de oxígeno, o uno cualquiera de los grupos representados por las siguientes fórmulas:



donde R⁴⁹, R⁵⁰ y R⁵² son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁵⁰ y R⁵¹ pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros alicíclico saturado junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados;

R⁵² es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido con al menos un átomo de halógeno;

R⁵³ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquinilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo cianometilo, o un grupo R⁶³CO-;

R⁵⁴ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquinilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo cianometilo, un grupo alcoxi(C₁-C₄)alquilo C₁-C₆, un grupo dialquil(C₁-C₄) aminoalquilo C₁-C₄, un grupo tetrahydrofurfurilo, un grupo alquinil(C₃-C₆)alquilo C₁-C₄, bencilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en

ES 2 319 346 T3

un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxi C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo -C(=X²)R⁶³, un grupo -(CH₂)_a-(O)_d-R⁷⁰, un grupo -(CH₂)_a-O-(CH₂)_b-R⁷⁰, un grupo -(CH₂)_a-X²-R⁷⁶;

5 R⁵³ y R⁵⁴ junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados pueden formar un anillo de 3, 5 o 6 miembros alicíclico saturado o un anillo de 5 o 6 miembros aromático en el que un átomo de carbono puede ser opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno;

10 R⁵⁵ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alqueno C₂-C₆ o un grupo alquino C₃-C₆, o R⁵⁵ y R⁵⁶ pueden formar juntos -(CH₂)_e-;

15 R⁵⁶ y R⁵⁷ son independientemente un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alqueno C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, alquino C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo -XR⁶⁰ o un grupo -NR⁶¹R⁶²;

20 R⁵⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo alquilcarbonilo C₁-C₄, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alcocarbonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo dialcocardonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo bencilo, un grupo alcóxil(C₁-C₄)alquino C₁-C₄, un grupo -(CH₂)_a-R⁷⁵, un grupo -(CH₂)_a-X²-R⁷², un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-R⁷² o un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-X²-(CH₂)_c-R⁷²;

25 R⁵⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alquil(C₁-C₄)carbonilalquilo C₁-C₃ o un grupo fenilo;

R⁶⁰ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno;

30 R⁶¹ y R⁶² son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

35 R⁶³ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alcóxil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo alquil(C₁-C₄)tioalquilo C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcóxil C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo -NR⁷³R⁷⁴ o un grupo -(CH₂)_a-(O)_d-R⁷⁵;

40 R⁶⁴ es un grupo alcocardonil C₁-C₄ o un grupo carboxilo;

R⁶⁵ es un grupo clorometilo, un grupo cianometilo, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, o un grupo alcocardonil(C₁-C₄)-alquilo C₁-C₄;

45 R⁶⁶ es un grupo hidroxilo o un grupo -NR⁶⁷R⁶⁸;

A es un grupo -NR⁶⁷R⁶⁸ o un grupo -S(O)_i-R⁶⁹;

50 R⁶⁷ y R⁶⁸ son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁶⁹ es un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo haloalquilo C₁-C₄;

55 R⁷⁰ es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un grupo alcóxil C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

60 R⁷¹ y R⁷² son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alcóxil C₁-C₄;

R⁷³ y R⁷⁴ son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo;

65 R⁷⁵ es cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

R⁷⁶ es un grupo alquilo C₁-C₄;

ES 2 319 346 T3

a, b y c son independientemente 1, 2 o 3;

d es 0 o 1;

e es 2 o 3;

f es 1 o 2; y

X² es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

27. Una célula de una planta transgénica obtenible mediante el método de uno cualquiera de los apartados 1 a 26.
28. Una planta transgénica o un tejido de una planta que comprende la célula de la planta del apartado 27.
29. La planta transgénica del apartado 28, que es resistente a al menos un compuesto definido en el apartado 25 o 26.
30. Partes cosechables o material de propagación de una planta del apartado 28 o 29 que comprende la célula de la planta del apartado 27.
31. El uso de un gen definido en uno cualquiera de los apartados 1 a 22 para producir una planta resistente a al menos uno de los compuestos definidos en el apartado 25 o 26, la célula de la planta del apartado 27 o la planta del apartado 28 o 29.
32. Un método para proteger una planta que comprende aplicar el compuesto para el control de las malas hierbas a una zona de crecimiento de la planta del apartado 28 o 29.
33. Un método para seleccionar una planta que comprende aplicar un compuesto para el control de las malas hierbas al cual es resistente la planta del apartado 28 o 29 a una zona de crecimiento de la planta del apartado 28 o 29 y otras plantas, y seleccionar cualquier planta basándose en la diferencia de crecimiento entre las plantas.
34. Un método para seleccionar una célula de una planta que comprende aplicar un compuesto para el control de las malas hierbas al cual es resistente la célula de la planta del apartado 27 en una zona de crecimiento de la célula de la planta del apartado 27 y otras células de plantas, y seleccionar cualquier célula de la planta basándose en la diferencia de crecimiento entre las células de las plantas.

Descripción detallada de la invención

En el método de la presente invención, las sustancias que están relacionadas con las actividades de control de las malas hierbas de los compuestos para el control de las malas hierbas (en adelante referidas como sustancias para el control de las malas hierbas) son aquellas que constituyen una parte de los sistemas de reacción metabólicos en organismos que son responsables de las actividades de control de las malas hierbas tras la aplicación de los compuestos a las plantas. Los ejemplos de las mismas incluyen los propios compuestos para el control de las malas hierbas, las sustancias endógenas de las plantas, y similares. Específicamente, en cuanto a tales sustancias endógenas en las plantas, por ejemplo, existen sustratos de enzimas diana sobre los cuales actúan los compuestos para el control de las malas hierbas, o precursores o metabolitos de los sustratos que ocasionan la disfunción celular tras la acumulación en las células de la planta; sustancias producidas por las sustancias anteriores en las células de la planta que ocasionan una disfunción celular; y similares. Más específicamente, se ha sabido que, cuando un compuesto que tiene actividad herbicida (en adelante referido como compuesto herbicida) que inhibe la actividad de la protoporfirinógeno IX oxidasa (EC 1.3.3.4, en adelante referido como PPO) se aplica a una planta, el protoporfirinógeno IX que es el sustrato de la PPO se acumula en las células de la planta y es metabolizado para formar la protoporfirina X, seguido de la formación de oxígeno activo en presencia tanto de protoporfirina X como de luz en las células, lo que daña las funciones celulares [Junshi MIYAMOTO ed., Atarashii Noyaku no Kagaku (Chemistry of New Agrochemicals), Capítulo 3, Sección 3.3, pág. 106 (1993), Hirokawa Shoten, Tokyo]. De este modo, el protoporfirinógeno IX, la protoporfirina IX y el oxígeno activo de estos sistemas, y similares pueden ser ejemplificados como estas sustancias.

En el método de la presente invención, los compuestos para el control de las malas hierbas incluyen compuestos que tienen actividades herbicidas, actividades reguladoras del crecimiento de las plantas, y similares.

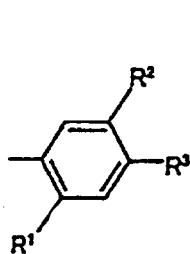
Los ejemplos de los compuestos herbicidas incluyen compuestos que inhiben la biosíntesis de porfirina, compuestos que inhiben la transferencia de electrones en la fotosíntesis, compuestos que inhiben la biosíntesis de carotenoides, compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos, compuestos que inhiben la biosíntesis de lípidos, compuestos que inhiben la biosíntesis de la pared celular, compuestos que influyen en la biosíntesis de proteínas, biosíntesis de ácido nucleico y división celular, compuestos que tienen actividad antagónica de auxinas, y similares. Más específicamente, en cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de porfirina, por ejemplo, existen compuestos que

inhiben la actividad de PPO (compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO), y similar. En cuanto a los compuestos que inhiben la transferencia de electrones en la fotosíntesis, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la transferencia de electrones del sistema fotoquímico I o II, compuestos que inhiben la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (EC 1.13.11.27; en adelante referida como 4-HPPD) que influyen en la biosíntesis de plastoquinona que transfiere electrones, y similares. En cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de carotenoides, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la fitoeno desaturasa (en adelante referida como PDS), y similares. En cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de aminoácidos, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la EPSPS, la acetolactato sintasa (EC 4.1.3.18; en adelante referida como ALS), la glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2; en adelante referida como GS), la dihidropteroato sintasa (EC 2.5.1.15; en adelante referida como DHP), y similares. En cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de lípidos, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la acetil CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2; en adelante referida como ACC), y similares. En cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de la pared celular, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la biosíntesis de celulosa, y similares. En cuanto a los compuestos que influyen en la biosíntesis de proteínas, la biosíntesis de ácidos nucleicos o la división celular, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la formación de microtúbulos, y similares.

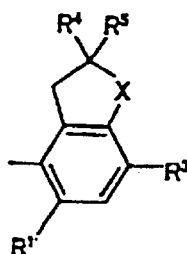
Los ejemplos de los compuestos que tienen actividades reguladoras del crecimiento de las plantas incluyen compuestos que tienen actividades antagónicas de las hormonas vegetales que potencian la elongación y diferenciación celular, y similares. Específicamente, por ejemplo, existen 2,4-D, ácido fenoxialcanocarboxílico, derivados de ácido benzoico, derivados de ácido picolínico, y similares.

En cuanto a los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de PPO descritos anteriormente, por ejemplo, existen los compuestos descritos por Duke, S.O., Rebeiz, C.A., ACS Symposium Series 559, Porphyrin Pesticides, Chemistry, Toxicology, and Pharmaceutical Applications, American Chemical Society, Washington DC (1994), y similares. Específicamente, los ejemplos de los mismos incluyen los siguientes compuestos:

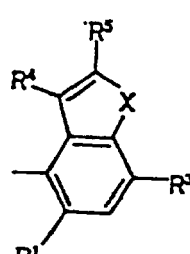
- (1) clometoxinil, bifenox, clornitrofenol (CNP), acifluorfenol (ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)-fenoxi]-2-nitrobenzoico) y su éster etílico, acifluorfenol-sodio, oxifluorfenol (2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-trifluorobenzol), oxadiazon (3-[2,4-dicloro-5-(1-metiletoxi)fenil]-5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-oxadiazol-2-(3H)-ona), 2-[4-cloro-2-fluoro-5-(prop-2-inilo)fenil]-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-isoindol-1,3-diona, clorfalim, (N-(4-clorofenil)-3,4,5,6-tetrahidroftalimida), TNPP-etilo (2-[1-(2,3,4-triclorofenil)-4-nitropirazolil-5-oxi]propionato de etilo), o N3-(1-feniletil)-2,6-dimetil-5-propionilnicotinamida;
- (2) un compuesto representado por la fórmula general: J-G (I), donde G es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales G-1 a G-9 y J es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales J-1 a J-30:



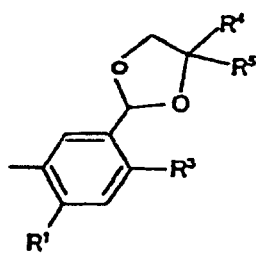
G-1



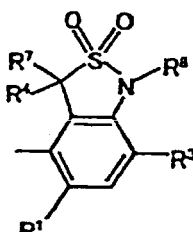
G-2



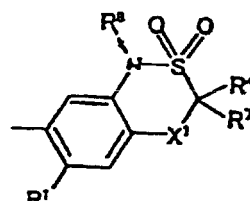
G-3



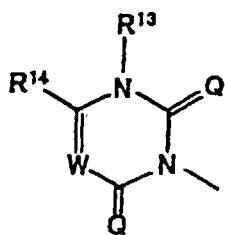
G-7



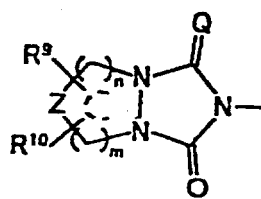
G-8



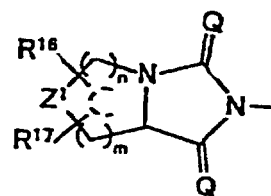
G-9



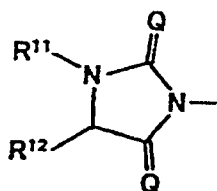
J-4



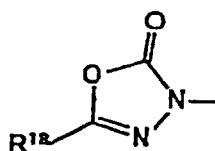
J-5



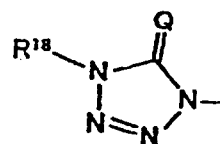
J-6



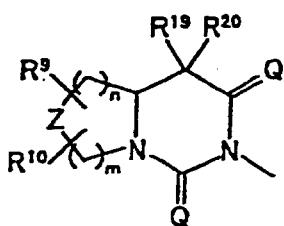
J-7



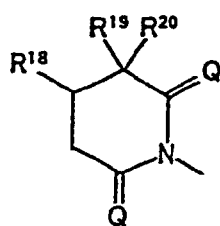
J-8



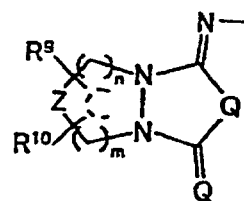
J-9



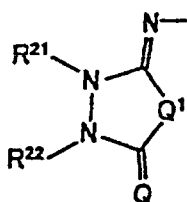
J-10



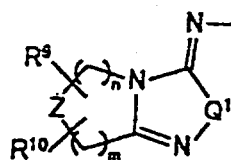
J-11



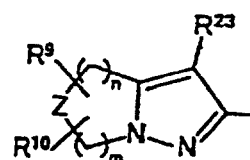
J-12



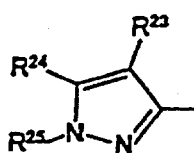
J-13



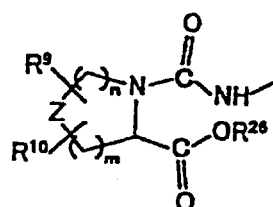
J-14



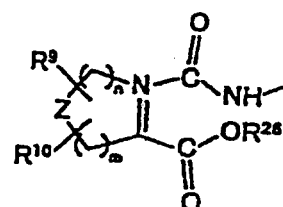
J-15



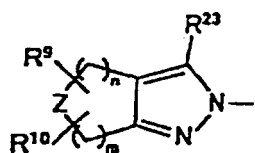
J-16



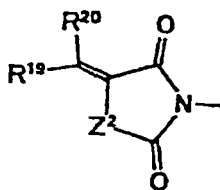
J-17



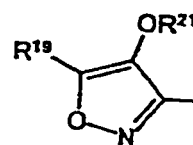
J-18



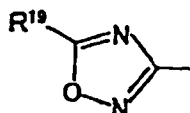
J-19



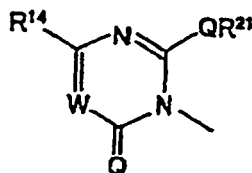
J-20



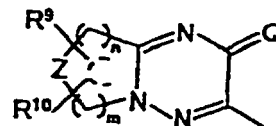
J-21



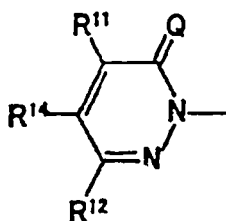
J-22



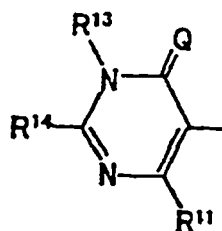
J-23



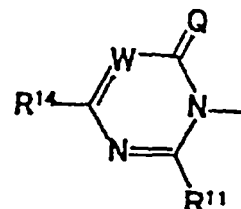
J-24



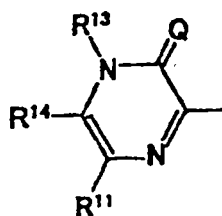
J-25



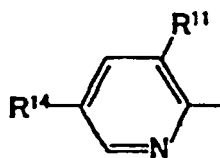
J-26



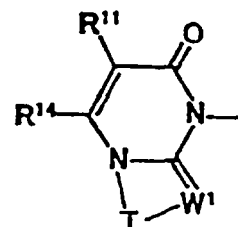
J-27



J-28



J-29



J-30

donde las líneas discontinuas de las fórmulas J-5, J-6, J-12 y J-24 representan que el anillo de la izquierda contiene solamente enlaces sencillos, o que el enlace del anillo es un doble enlace entre átomos de carbono;

X es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Y es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

R¹ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

R² es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un átomo de halógeno, un grupo OH, un grupo OR²⁷, un grupo SH, un grupo S(O)_pR²⁷, un grupo COR²⁷, un grupo CO₂R²⁷, un grupo C(O)SR²⁷, un grupo C(O)NR²⁹R³⁰, un grupo CHO, un grupo CR²⁷=NOR³⁶, un grupo CH=CR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CH₂CHR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CO₂N=CR³¹R³², un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo NHSO₂R³³, un grupo NHSO₂NHR³³, un grupo NR²⁷R³⁸, un grupo NH₂ o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo C₁-C₄ iguales o diferentes;

p es 0, 1 o 2;

R³ es un grupo alquilo C₁-C₂, un grupo haloalquilo C₁-C₂, un grupo OCH₃, un grupo SCH₃, un grupo OCHF₂, un átomo de halógeno, un grupo ciano o un grupo nitro;

ES 2 319 346 T3

R^4 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 , un grupo haloalquilo C_1-C_3 o un átomo de halógeno;

R^5 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 , un átomo de halógeno, un grupo haloalquilo C_1-C_3 , grupo ciclopropilo, un grupo vinilo, un grupo alquinilo C_2 , un grupo ciano, un grupo $C(O)R^{38}$, un grupo CO_2R^{38} , un grupo $C(O)NR^{38}R^{39}$, un grupo $CR^{34}R^{35}CN$, un grupo $CR^{34}R^{35}C(O)R^{38}$, un grupo $CR^{34}R^{35}CO_2R^{38}$, un grupo $CR^{34}R^{35}C(O)NR^{38}R^{39}$, un grupo $CHR^{34}OH$, un grupo $CHR^{34}OC(O)R^{38}$ o un grupo $OCHR^{34}OC(O)NR^{38}R^{39}$, o, cuando G es G-2 o G-6, R^4 y R^5 pueden formar un grupo $C=O$ junto con el átomo de carbono al que están anclados;

R^6 es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alcoxialquilo C_2-C_6 , un grupo alquenilo C_3-C_6 o un grupo alquinilo C_3-C_6 ;

X^1 es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NH, un grupo N(alquilo C_1-C_3), un grupo N(haloalquilo C_1-C_3) o un grupo N(alilo);

R^7 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un átomo de halógeno, un grupo $S(O)_2$ (alquilo C_1-C_6) o un grupo $C(=O)R^{40}$;

R^8 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_8 , un grupo cicloalquilo C_3-C_8 , un grupo alquenilo C_3-C_8 , un grupo alquinilo C_3-C_8 , un grupo haloalquilo C_1-C_8 , un grupo alcoxialquilo C_2-C_8 , un grupo alcoxialcoxialquilo C_3-C_8 , un grupo alcoxialquinilo C_3-C_8 , un grupo haloalquenilo C_3-C_8 , un grupo alquilsulfonilo C_1-C_8 , un grupo haloalquilsulfonilo C_1-C_8 , un grupo alcoxycarbonilalquilo C_3-C_8 , un grupo $S(O)_2NH$ (alquilo C_1-C_8), un grupo $C(O)R^{41}$ o un grupo bencilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con R^{42} ;

n y m son independientemente 0, 1, 2 o 3 y m + n es 2 o 3;

Z es un grupo CR^9R^{10} , un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo S(O), un grupo $S(O)_2$ o un grupo N(alquilo C_1-C_4);

cada R^9 es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 , un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo haloalcoxi C_1-C_6 , un grupo alquilcarboniloxi C_2-C_6 o un grupo haloalquilcarboniloxi C_2-C_6 ;

cada R^{10} es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 , un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R^{11} y R^{12} son independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alquenilo C_3-C_6 o un grupo haloalquilo C_1-C_6 ;

R^{13} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alquenilo C_3-C_6 , un grupo haloalquenilo C_1-C_6 , un grupo alquinilo C_1-C_6 , un grupo haloalquinilo C_3-C_6 , un grupo $HC(=O)$, un grupo (alquilo C_1-C_4) $C(=O)$ o un grupo NH_2 ;

R^{14} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alquil(C_1-C_6)tio, un grupo haloalquilo C_1-C_6 o un grupo N(CH_3)₂;

W es un átomo de nitrógeno o CR^{15} ;

R^{15} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un átomo de halógeno, o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C_1-C_6 , uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C_1-C_6 o un grupo CF_3 ;

cada Q es independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Q^1 es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Z^1 es un grupo $CR^{16}R^{17}$, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo S(O), un grupo $S(O)_2$ o un grupo N(alquilo C_1-C_4);

cada R^{16} es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo haloalcoxi C_1-C_6 , un grupo alquilcarboniloxi C_2-C_6 o un grupo haloalquilcarboniloxi C_2-C_6 ;

cada R^{17} es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R^{18} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo C_1-C_6 ;

ES 2 319 346 T3

R¹⁹ y R²⁰ son independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, o un grupo haloalquilo C₁-C₆;

Z² es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NR⁹ o un grupo CR⁹R¹⁰;

R²¹ y R²² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆, un grupo haloalqueno C₃-C₆, un grupo alquino C₃-C₆ o un grupo haloalquino C₃-C₆;

R²³ es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo ciano;

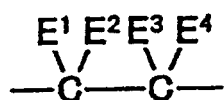
R²⁴ es un grupo alquil(C₁-C₆)sulfonilo, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo haloalcoxi C₁-C₆ o un átomo de halógeno;

R²⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆ o un grupo alquino C₃-C₆;

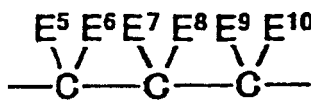
R²⁶ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆ o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con C₁-C₆ alquilo, uno o dos átomos de halógeno, uno o grupos nitro, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo CF₃;

W¹ es un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

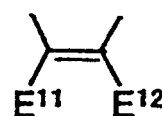
T es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales T-1, T-2 y T-3;



T-1



T-2



T-3

(donde E¹, E², E³, E⁴, E⁵, E⁶, E⁷, E⁸, E⁹, E¹⁰, E¹¹ y E¹² son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃);

R²¹ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo alqueno C₃-C₈, un grupo alquino C₃-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un grupo alcoxialquilo C₂-C₈, un grupo alquiltioalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfinilalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfonilalquilo C₂-C₈, un grupo alquil-sulfonilo C₁-C₈, un grupo fenilsulfonilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxialcoxialquilo C₄-C₈, un grupo cicloalquilalquilo C₄-C₈, un grupo cicloalcoxialquilo C₆-C₈, un grupo alquenoiloxialquilo C₄-C₈, un grupo alquinoiloxialquilo C₄-C₈, un grupo haloalcoxialquilo C₃-C₈, un grupo haloalquenoiloxialquilo C₄-C₉, un grupo haloalquinoiloxialquilo C₃-C₈, un grupo cicloalquiltioalquilo C₆-C₈, un grupo alquenoiltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquinoiltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquilo C₁-C₄ cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo benciloxi cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo haloalquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo trialquilsililalquilo C₁-C₈, un grupo cianoalquilo C₃-C₈, un grupo halocicloalquilo C₃-C₈, un grupo haloalqueno C₃-C₈, un grupo alcoxialqueno C₅-C₈, un grupo haloalcoxialqueno C₅-C₈, un grupo alquiltioalqueno C₅-C₈, un grupo alcoxialquino C₃-C₈, un grupo alcoxialquino C₅-C₈, un grupo haloalcoxialquino C₅-C₈, un grupo alquiltioalquino C₅-C₈, un grupo alquilcarbonilo C₂-C₃, un grupo bencilo cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo CHR³⁴COR²⁸, un grupo CHR³⁴COOR²⁸, un grupo CHR³⁴P(O)(OR²⁸)₂, un grupo CHR³⁴P(S)(OR²⁸)₂, un grupo CHR³⁴C(O)NR²⁹R³⁰ o un grupo CHR³⁴C(O)NH₂;

R²⁸ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆ o un grupo tetrahydrofuranilo;

R²⁹ y R³¹ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R³⁰ y R³² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃; o,

ES 2 319 346 T3

R²⁹ y R³⁰ pueden formar juntos -(CH₂)₅-, -(CH₂)₄- o -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, o el anillo formado de este modo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en grupo alquilo C₁-C₃, un grupo fenilo y un grupo bencilo; o,

R³¹ y R³² pueden formar un grupo cicloalquilo C₃-C₈ junto con el átomo de carbono al que están anclados;

R³³ es un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo haloalquilo C₁-C₄ o un grupo alqueno C₃-C₆;

R³⁴ y R³⁵ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R³⁶ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆ o un grupo alquino C₃-C₆;

R³⁷ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un átomo de halógeno;

R³⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo alcoxialquilo C₂-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ y un grupo alcoxi C₁-C₄, un grupo -CH₂CO₂ (alquilo C₁-C₄) o un grupo -CH(CH₃)CO₂ (alquilo C₁-C₄);

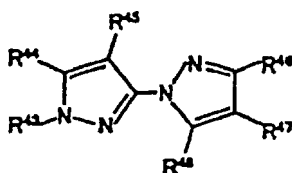
R³⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₂ o un grupo C(O)O(alquilo C₁-C₄);

R⁴⁰ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo NH(alquilo C₁-C₆);

R⁴¹ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo NH (alquilo C₁-C₆), un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo R⁴², un grupo bencilo y un grupo un grupo dialquilamino C₂-C₈; y

R⁴² es un grupo alquilo C₁-C₆, uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo CF₃;

(3) un compuesto de fórmula (II):



o nipilacrofeno,

donde R⁴³ es un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁴⁴ es un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alquil(C₁-C₄)tio, un grupo alcoxi C₁-C₄, un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo haloalquil(C₁-C₄)tio o un grupo haloalcoxi C₁-C₄;

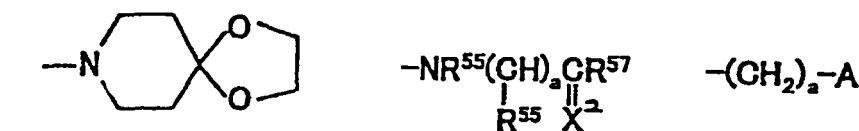
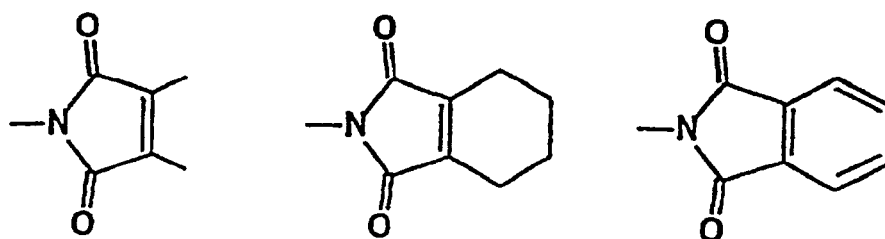
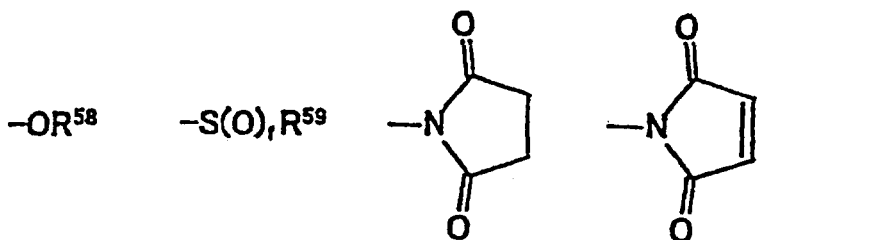
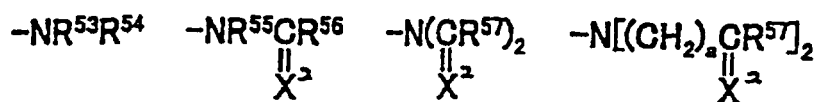
R⁴³ y R⁴⁴ pueden formar juntos -(CH₂)₅- o -(CH₂)₄-;

R⁴⁵ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

R⁴⁶ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁴⁷ es un átomo de hidrógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo -COOR⁴⁹, un grupo -C(=X)NR⁵⁰R⁵¹ o un grupo -C(=X²)R⁵²;

R⁴⁸ es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₄, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxi C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo pirrolilo, un grupo alquilo C₂-C₈, un grupo alqueno C₃-C₈, un grupo alquino C₃-C₈, un grupo alcoxi C₃-C₈, un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo C₂-C₈, un grupo alqueno C₃-C₈, un grupo alquino C₃-C₈ y un grupo alcoxi C₃-C₈ en el que al menos un átomo de oxígeno es insertado, o uno cualquiera de los grupos representados por las siguientes fórmulas:



donde R^{49} , R^{50} y R^{52} son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$;

R^{50} y R^{51} pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros alicíclico saturado junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados;

R^{52} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$ o un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$ sustituido con al menos un átomo de halógeno;

R^{53} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquénilo $\text{C}_2\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquínilo $\text{C}_3\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo $\text{C}_3\text{--C}_8$, un grupo cianometilo, o un grupo $\text{R}^{63}\text{CO--}$;

R^{54} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquénilo $\text{C}_2\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquínilo $\text{C}_3\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo $\text{C}_3\text{--C}_8$, un grupo cianometilo, un grupo alcoxi($\text{C}_1\text{--C}_4$)alquilo $\text{C}_1\text{--C}_5$, un grupo dialquilamino($\text{C}_1\text{--C}_4$)alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$, un grupo tetrahydrofurfurilo, un grupo alquínil($\text{C}_3\text{--C}_6$)-oxi alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$, bencilo cuyo anillo puede estar sustituido un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$, un grupo alcoxi $\text{C}_1\text{--C}_4$ y un grupo haloalquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$, un grupo $-\text{C}(=\text{X}^2)\text{R}^{63}$, un grupo $-(\text{CH}_2)_a\text{---}(\text{O})_d\text{---R}^{70}$, un grupo $-(\text{CH}_2)_a\text{---O---}(\text{CH}_2)_b\text{---R}^{70}$, un grupo $-(\text{CH}_2)_a\text{---X}^2\text{---R}^{76}$;

R^{53} y R^{54} junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados pueden formar un anillo de 3, 5 o 6 miembros alicíclico saturado o un anillo de 5 o 6 miembros aromático en el que un átomo de carbono puede ser opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno;

R^{55} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$, un grupo alquénilo $\text{C}_1\text{--C}_6$ o un grupo alquínilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, o R^{55} y R^{56} pueden formar juntos $-(\text{CH}_2)_e\text{--}$;

R^{56} y R^{57} son independientemente un grupo alquilo $\text{C}_1\text{--C}_4$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquénilo $\text{C}_2\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, alquínilo $\text{C}_3\text{--C}_6$ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno o un grupo

ES 2 319 346 T3

fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo -XR⁶⁰ o un grupo -NR⁶¹R⁶²;

R⁵⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo alquilcarbonilo C₁-C₄, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alcocarbonil(C₁-C₄) alquilo C₁-C₄, un grupo dialcoccarbonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo bencilo, un grupo alcóxil(C₁-C₄)alquino C₁-C₄, un grupo -(CH₂)_a-R⁷⁵, un grupo -(CH₂)_a-X²-R⁷², un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-R⁷² o un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-X²-(CH₂)_c-R⁷²;

R⁵⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alquil(C₁-C₄)carbonilalquilo C₁-C₃ o un grupo fenilo;

R⁶⁰ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno;

R⁶¹ y R⁶² son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁶³ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alcóxil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo alquil(C₁-C₄)tioalquilo C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcóxil C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo -NR⁷³R⁷⁴ o un grupo -(CH₂)_a-(O)_d-R⁷⁵;

R⁶⁴ es un grupo alcocarbonilo C₁-C₄ o un grupo carboxilo;

R⁶⁵ es un grupo clorometilo, un grupo cianometilo, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, o un grupo alcocarbonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄;

R⁶⁶ es un grupo hidroxilo o un grupo -NR⁶⁷R⁶⁸;

A es un grupo -NR⁶⁷R⁶⁸ o un grupo -S(O)_f-R⁶⁹;

R⁶⁷ y R⁶⁹ son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁶⁹ es un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo haloalquilo C₁-C₄;

R⁷⁰ es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un grupo alcóxil C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

R⁷¹ y R⁷² son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alcóxil C₁-C₄;

R⁷³ y R⁷⁴ son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo;

R⁷⁵ es cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

R⁷⁶ es un grupo alquilo C₁-C₄;

a, b y c es independientemente 1, 2 o 3;

d es 0 o 1;

e es 2 o 3;

f es 1 o 2; y

X² es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

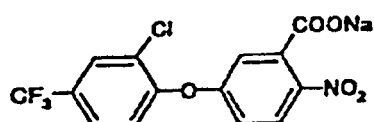
Además, en cuanto a otros pirazoles N-sustituídos, existen los 2-aril-4,5,6,7-tetrahidro-indazoles sustituidos en la posición 3 descritos por Lyga *et al.*, Pesticide Sci., 42: pág. 29 (1994), y similares.

Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la transferencia de electrones en el sistema fotoquímico I, por ejemplo, existen paraquat, diquat, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la transferencia de electrones en el sistema fotoquímico II, por ejemplo, existen compuestos de triazina (p. ej., atrazina, etc.), compuestos de urea (p. ej., diuron, etc.), compuestos de nitrilo (p. ej., bromoxinilo e ioxinilo) y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la 4-HPPD, por ejemplo, existen isoxazoles (p. ej., isoxaflutol), pirazoles, tricetonas, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la PDS, por ejemplo, existen norflurazon, flurocloridona, fluridona, flurtamona, diflufenican, y similares. Como ejemplos específicos de

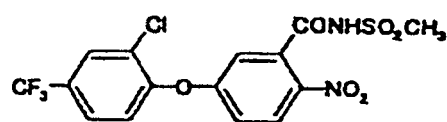
los compuestos que inhiben la EPSPS, por ejemplo, existen glifosato, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la ALS, por ejemplo, existen sulfonilureas, imidazolinonas, pirimidiniltiobenzoatos, triazopirimidinas, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la GS, por ejemplo, existen bialafos, glufosinato, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la DHP, por ejemplo, existen asulam, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben ACC, por ejemplo, existen ciclohexanedionas, ariloxifenoxipropionatos, y similares. Como ejemplos específicos de los compuestos que inhiben la celulosa, por ejemplo, existen diclobenilo, y similares.

En las siguientes estructuras químicas se muestran diversos ejemplos de los compuestos para el control de las malas hierbas útiles en la presente invención:

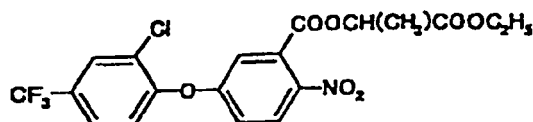
Estructura 1



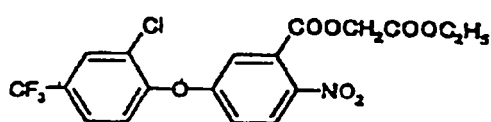
Estructura 2



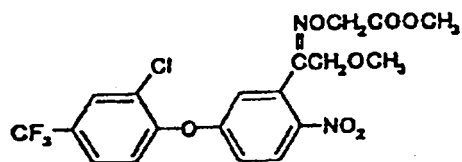
Estructura 3



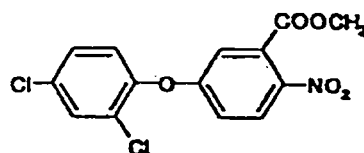
Estructura 4



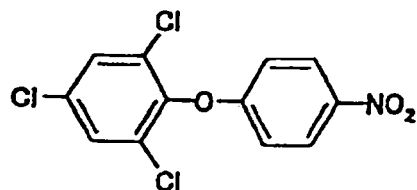
Estructura 5



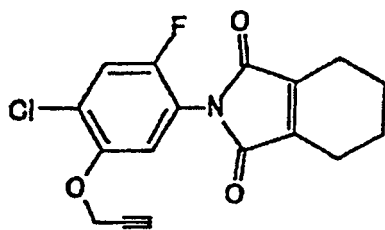
Estructura 6



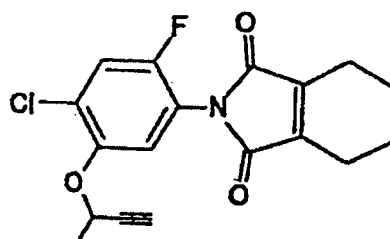
Estructura 7



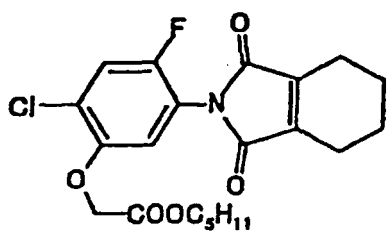
Estructura 8



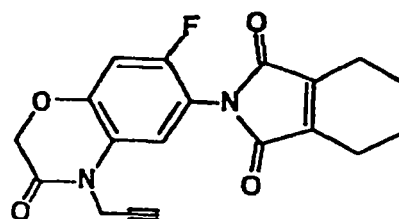
Estructura 9



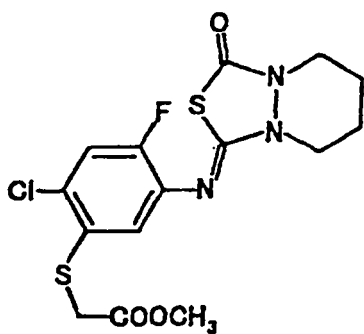
Estructura 10



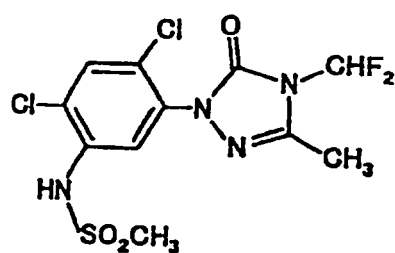
Estructura 11



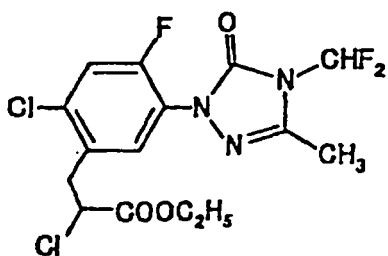
Estructura 12



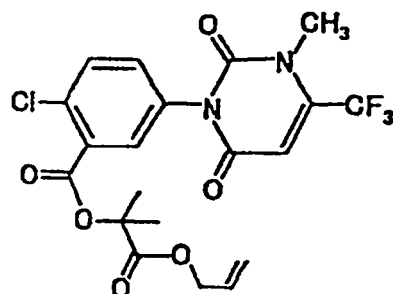
Estructura 13



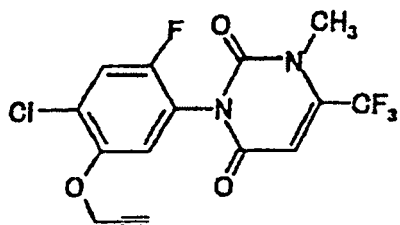
Estructura 14



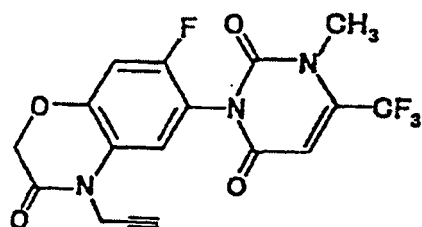
Estructura 15



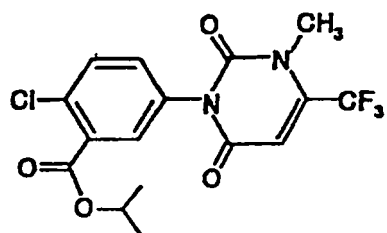
Estructura 16



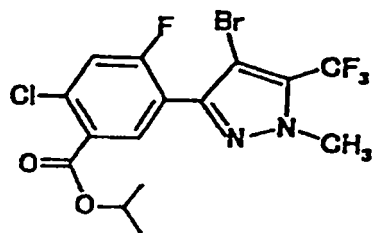
Estructura 17



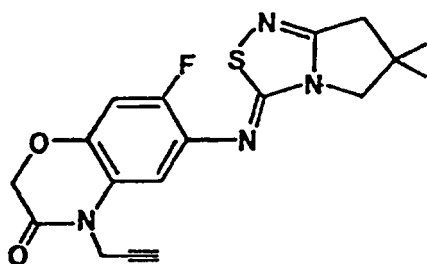
Estructura 18



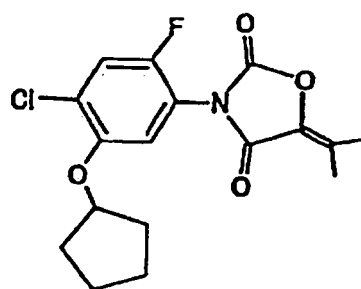
Estructura 19



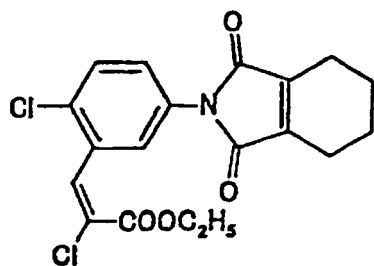
Estructura 20



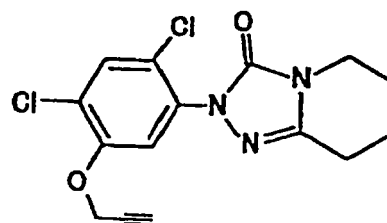
Estructura 21



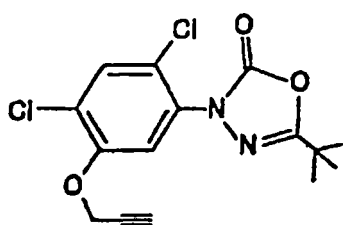
Estructura 22



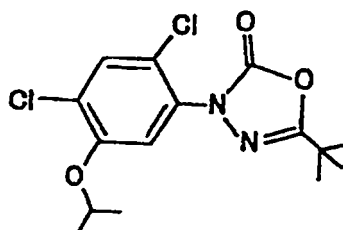
Estructura 23



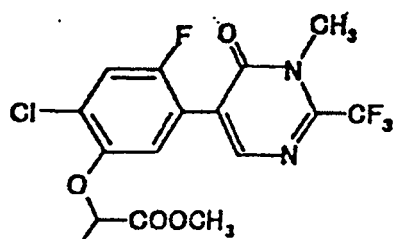
Estructura 24



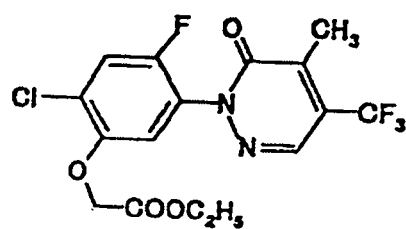
Estructura 25



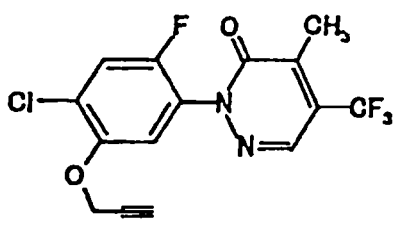
Estructura 26



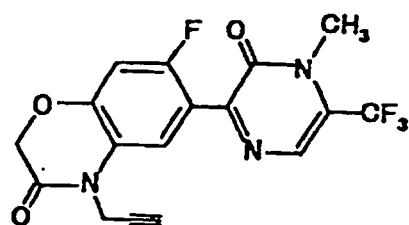
Estructura 27



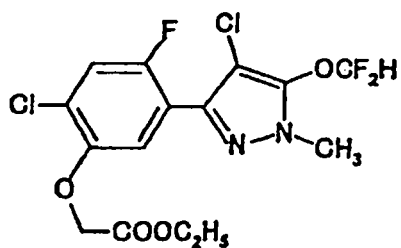
Estructura 28



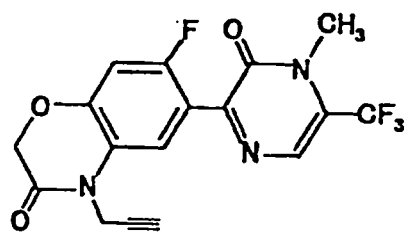
Estructura 29



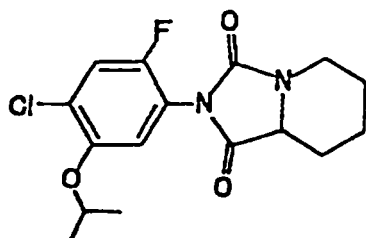
Estructura 30



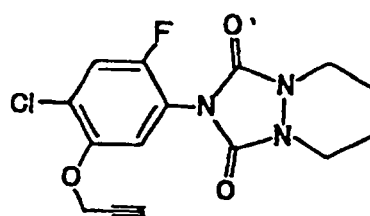
Estructura 31



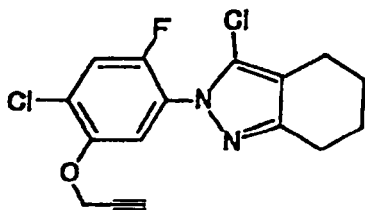
Estructura 32



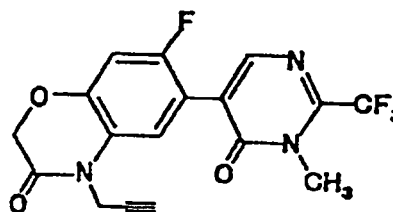
Estructura 33



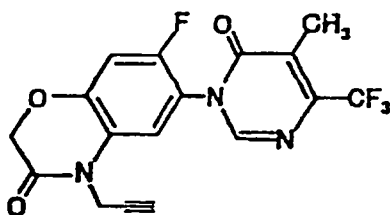
Estructura 34



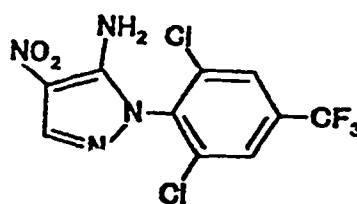
Estructura 35



Estructura 36



Estructura 37



Los genes utilizados en el método de la presente invención para elaborar plantas resistentes a los compuestos para el control de las malas hierbas son aquellos que codifican proteínas seleccionadas del grupo que consiste en:

magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,

ferroquelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX, cobalto quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,

un péptido que tiene afinidad por la protoporfirina IX, compuesto por 6 a 100 aminoácidos, estando dicho péptido esencialmente libre de regiones marco de regiones variables en una inmunoglobulina,

protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX, y

coprotoporfirinógeno III oxidasa de tipo inactivo o activo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX;

no teniendo dichas proteínas esencialmente capacidad para modificar el protoporfirinógeno IX.

En el primer aspecto del método de la presente invención, los genes que se van a utilizar son aquellos que codifican proteínas seleccionadas del grupo, donde las proteínas seleccionadas pueden estar caracterizadas por las siguientes características (a) a (c) (en adelante algunas veces referidas como proteínas objetivo):

(a) tienen una afinidad específica por las sustancias para el control de las malas hierbas;

(b) no tienen esencialmente capacidad para codificar sustancias para las cuales dicha proteína tiene una afinidad específica; y

(c) están esencialmente libres de regiones marco de regiones variables de una inmunoglobulina.

El término “afinidad específica” por sustancias para el control de las malas hierbas de la característica (a) anterior significa que una enzima (la proteína objetivo) y un sustrato (la sustancia para el control de las malas hierbas), o una enzima (la proteína objetivo) y un inhibidor o un regulador de la actividad de la enzima (la sustancia para el control de las malas hierbas) se unen entre sí, enzimáticamente; o que la proteína objetivo y la sustancia para el control de las malas hierbas se unen entre sí basándose en la afinidad y la especificidad, tales como las mostradas en un enlace químico al receptor, por ejemplo, un enlace entre un receptor y un ligando, y similares. Las proteínas objetivo pueden ser proteínas de origen natural; variantes de las mismas obtenidas mediante la introducción de sustituciones, adiciones, deleciones, modificaciones y similares de un aminoácido en proteínas de origen natural; y proteínas sintetizadas artificialmente que tienen secuencias de aminoácidos al azar seleccionadas con la orientación de su afinidad por las sustancias para el control de las malas hierbas, con tal que tengan estructuras que se unan específicamente a las sustancias para el control de las malas hierbas.

El término “que no tiene esencialmente capacidad de modificar” en la característica (b) representa que la reactividad enzimática con sustancias para las cuales dicha proteína tiene una afinidad específica es esencialmente inactiva o no existe (excepto la afinidad específica por las sustancias para el control de las malas hierbas de la característica

(a)). Los Ejemplos de esto incluyen un caso en el que la proteína objetivo no tiene ninguna capacidad de convertir una sustancia para la cual dicha proteína tiene una afinidad específica tal como una cierta sustancia para el control de las malas hierbas o una sustancia que tiene una parte esencial de la estructura de los sustratos basándose en una afinidad específica para dicha proteína, y similares a una sustancia que tiene una estructura química diferente, de la de la sustancia para la cual dicha proteína tiene una afinidad específica. La proteína “que no tiene esencialmente capacidad para modificar” puede ser identificada, por ejemplo verificando la no recuperación del crecimiento de un microorganismo cuyo gen que codifica dicha proteína es suprimido y de este modo no puede crecer en condiciones normales en el caso en el que el gen que codifica la proteína mencionada es introducido en el microorganismo en un estado tal que el gen introducido es expresado en el microorganismo.

El término “esencialmente libre de las regiones marco de las regiones variables de una inmunoglobulina” en la característica (c) significa que la proteína objetivo no forma una estereoestructura específica para las regiones variables de una inmunoglobulina. El término “regiones marco de las regiones variables de una inmunoglobulina” representa regiones que quedan después de separar las regiones hipervariables de las regiones variables de la cadena H y la cadena L que son las constitutivas de la molécula de inmunoglobulina. En estas regiones, la conservación de las secuencias de aminoácidos es relativamente elevada y estas regiones, funcionan manteniendo la estereoestructura altamente conservada de las regiones variables. Debido a la formación de la estereoestructura anterior, las regiones hipervariables localizadas separadamente en tres sitios sobre la respectiva cadena H y cadena L son recogidas en la estereoestructura para formar un sitio de unión al antígeno [Alberts, B., *et al.* ed. (1983), *Molecular Biology of the Cell*, p 979, Garland Publishing, Inc., New York].

La proteína objetivo que tiene la característica (c) anterior puede ser seleccionada basándose, por ejemplo, en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Como ejemplos específicos de la proteína, existe una proteína que no contiene ninguna secuencia de aminoácidos compuesta por aproximadamente 30 aminoácidos o más y que tiene una homología de aproximadamente 60% o más con las secuencias de aminoácidos conocidas de las regiones marco de las regiones variables de una inmunoglobulina, y similares. Por ejemplo, la presencia o ausencia de las regiones marco anteriores puede ser confirmada mediante PCR utilizando un gen que codifica la proteína como molde y los ADN que tienen secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables derivadas de la cadena H o la cadena L de la inmunoglobulina como cebadores de amplificación, por ejemplo, los cebadores VH1BACK y VH1FOR-2, o VK2BACK y VK4FOR descritos por Clackson, T. *et al.*, *Nature* 352; p 624 (1991), o los cebadores contenidos en un kit disponible en el mercado para clonar genes de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, mezcla de cebadores Heavy o mezcla de cebadores Light de Recombinant Phage Antibody System (Pharmacia Biotech) para analizar la presencia o ausencia de la amplificación de ADN que tiene una longitud dada. Los ejemplos de las proteínas de unión que tienen una afinidad específica por sustancias para el control de las malas hierbas también incluyen péptidos que tienen afinidad por las sustancias para el control de las malas hierbas.

Los ejemplos específicos de las proteínas objetivo que tienen las características (a) a (c) anteriores incluyen proteínas de unión de tipo inactivo que tienen afinidad por la protoporfirina IX [p. ej., magnesio quelatasa de tipo inactivo cuyo sustrato es la protoporfirina IX (sustancias para el control de las malas hierbas de tipo ferroquelatasa inactiva (protohemo ferroliaza; EC 4.9.9.1), cobalto quelatasa de tipo inactivo que cataliza una reacción de quelación de un ión cobalto con un compuesto que tiene un anillo de tetrapirrol como sustrato, péptidos que tienen afinidad por la protoporfirina IX, esto es, proteínas compuestas por 6 a 100 aminoácidos (por ejemplo, el péptido HASYS que tiene una afinidad por la protoporfirina IX, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 54; el péptido RASSL que tiene afinidad por la protoporfirina IX, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 55 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 56; el péptido YAGY que tiene afinidad por los compuestos de porfirina, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 57 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 58; el péptido YAGF que tiene afinidad por compuestos de porfirina, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 60; y similares)], proteínas de unión de tipo inactivo que tienen afinidad por el protoporfirinógeno IX (p. ej., PPO de tipo inactivo, coproporfirinógeno III oxidasa de tipo inactivo), y similares.

Las proteínas de unión de tipo inactivo anteriores incluyen las variantes de las mismas cuyas actividades se han perdido por sustitución, adición, delección, modificación y similares de aminoácidos de proteínas activas de origen natural en condiciones naturales o artificiales.

La disfunción celular causada por las sustancias para el control de las malas hierbas puede ser evitada mediante la unión de estas proteínas de unión a las sustancias para el control de las malas hierbas en células vegetales para mostrar la resistencia al compuesto para el control de las malas hierbas deseado.

La magnesio quelatasa de tipo inactivo es la proteína de la subunidad de unión a la protoporfirina IX de la magnesio quelatasa, o su variante que tiene una afinidad de unión específica por la protoporfirina IX, y los ejemplos específicos de la misma incluyen la proteína de la subunidad de la cual se ha suprimido la secuencia señal de tránsito a los orgánulos, y similares.

La ferroquelatasa de tipo inactivo es su variante que no tiene capacidad de modificar la protoporfirina IX y que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX, y los ejemplos específicos de la misma incluyen una variante

de ferroquelatasa en la cual se ha modificado una región que se presume que es un sitio de unión al ión Fe de la ferroquelatasa, y similares.

La cobalto quelatasa de tipo inactivo es una proteína de la subunidad de unión al sustrato de la cobalto quelatasa, o su variante que no tiene capacidad de modificación de la protoporfirina IX y que tiene afinidad específica por la protoporfirina IX.

La PPO de tipo inactivo es su variante que no tiene capacidad de oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene afinidad específica por el protoporfirinógeno IX, y los ejemplos específicos de la misma incluyen una variante de PPO en la cual ha sido suprimida una región que se supone que es un sitio de unión a FAD de PPO (una región que tiene la secuencia de aminoácidos GXGXXG donde X es cualquier aminoácido, p. ej., una región que comprende los aminoácidos 63° a 68° desde el extremo N de la PPO localizada en el cloroplasto de la oruga (*Arabidopsis thaliana*) y que tiene la secuencia de aminoácidos GGGISG), y similares. La coprotoporfirinógeno III oxidasa de tipo inactivo es su variante que no tiene capacidad de oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene afinidad específica por el protoporfirinógeno IX.

Los genes que codifican las proteínas anteriores se pueden obtener, por ejemplo, como sigue.

En cuanto a los genes que codifican la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa, por ejemplo, se conocen aquellas derivadas de la bacteria fotosintética, *Rhodobacter capsulatus* (Acceso Genebank M74001), oruga (Acceso Genebank Z68495), cebada (Acceso Genebank U96216), boca de dragón (*Antirrhinum majus*) (Acceso Genebank U26916), *Synechocystis* P.C.C. 6803 (Acceso Genebank U29131) y similares. Para aislar semejante gen conocido (se conoce su secuencia de nucleótidos), se puede llevar a cabo una PCR utilizando ADN genómico o ADNc de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores producidos basándose en las secuencias de nucleótidos correspondientes aproximadamente a las de los extremos N y C de la proteína codificada por el gen para amplificar el gen deseado. Adicionalmente, se pueden obtener los genes que codifican la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa a partir de organismos fotosintéticos distintos de los anteriores. Por ejemplo, primero, se construye una colección de ADNc obteniendo ARNm del organismo fotosintético deseado, sintetizando ADNc utilizando el ARNm como molde con una transcriptasa inversa, e integrando el ADNc en un vector de fagos tal como ZAPII, etc. o un vector plasmídico tal como pUC, etc. Para amplificar un fragmento de ADNc que contiene al menos una parte del gen que codifica la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa, se puede llevar a cabo la PCR utilizando la colección de ADNc construida antes como molde y cebadores diseñados y sintetizados basándose en las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre los genes conocidos tales como los genes descritos anteriormente. El escrutinio de la colección de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el fragmento de ADN, obtenido de este modo como sonda para seleccionar clones positivos. El gen de la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa deseado puede ser confirmado mediante la determinación de la secuencia de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado.

Para obtener el gen que codifica una variante de la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX, por ejemplo, se mutageniza el gen que codifica la proteína de la subunidad mediante introducción de una sustitución, adición, delección, modificación y similares de nucleótidos, seguido de introducción del gen resultante en la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* de acuerdo con el método descrito por Gibson, L.C. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92; pág. 1941 (1995) y similares para obtener transformantes, y cultivar los transformantes en condiciones tales que se produzca una elevada expresión del gen así producido. El gen deseado que codifica una variante de la proteína de la subunidad que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX se puede obtener seleccionando una cepa cuyas células cultivadas se han vuelto rojas y que tienen una absorción de fluorescencia que muestra acumulación de protoporfirina IX (longitud de onda de excitación 405 nm, longitud de onda de emisión 630 nm).

En cuanto a los genes que codifican la ferroquelatasa, por ejemplo, se conocen aquellos derivados de *Escherichia coli* (Acceso Genebank D90259), *Bacillus subtilis* (Acceso Genebank M97208), *Bradyrhizobium japonicum* (Acceso Genebank M92427), levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Acceso Genebank J05395), ratón (Acceso Genebank J05697), ser humano (Acceso Genebank D00726), cebada (Acceso Genebank D26105), pepino (Acceso Genebank D26106), y similares. Para aislar semejante gen conocido (se conoce su secuencia de nucleótidos), se lleva a cabo una PCR utilizando ADN genómico o ADNc de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores producidos basándose en las secuencias de nucleótidos correspondientes a aproximadamente las de los extremos N y C de la proteína codificada por el gen para amplificar el gen deseado. Adicionalmente, para obtener otros genes que codifican la ferroquelatasa, por ejemplo, primero, se construye una colección de ADNc obteniendo ARNm a partir del organismo deseado, sintetizando ADNc mediante la utilización de ARNm como molde con una transcriptasa inversa, e integrando el ADNc en un vector de fagos tal como ZAPII, etc. o un vector plasmídico tal como pUC, etc. La colección de ADNc puede ser introducida en una cepa de *Escherichia coli* VS200 mutante carente de ferroquelatasa descrita por Miyamoto, K, *et al.*, Plant Physiol., 105; pág. 769 (1994), sometiéndola después a un ensayo de complementación para seleccionar clones que contienen el gen de la ferroquelatasa derivado del organismo deseado. Adicionalmente, para amplificar un fragmento de ADN, se puede llevar a cabo una PCR utilizando la colección de ADNc construida anteriormente como molde y cebadores preparados basándose en las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre genes conocidos tales como los genes descritos anteriormente. El escrutinio de la colección de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el fragmento de ADN obtenido de ese modo como sonda para seleccionar los clones positivos. El gen de la Ferroquelatasa deseado se puede confirmar mediante determinación de la secuencia de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado.

Para obtener el gen que codifica una variante de ferroquelatasa que no tiene capacidad para modificar la protoporfirina IX y que tiene una afinidad específica por la protoporfirina IX (por ejemplo, el gen que codifica una variante de la ferroquelatasa en la cual la región que se presupone que es el sitio de unión a Fe de la ferroquelatasa está modificado), se puede llevar a cabo una PCR preparando un cebador de mutagénesis para la introducción de una mutación en la región basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos cerca de la región, y utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio asequible comercialmente (Mutan-Super Express, Takara Shuzo) para obtener el gen que codifica la variante anterior. Específicamente, se inserta un gen de ferroquelatasa de tipo salvaje en el sitio de clonación del vector plasmídico pKF19K y se lleva a cabo la PCR utilizando el ADN plasmídico resultante como molde, el cebador de mutagénesis descrito anteriormente y un cebador de selección para la restauración de la mutación ámbar localizada en el gen de resistencia a la kanamicina de pKF19K. El gen amplificado por PCR se introduce en *Escherichia coli* MV1184 (cepa sin supresor) y los transformantes se escrutan de acuerdo con la resistencia a kanamicina para aislar la *Escherichia coli* que tiene el gen de la ferroquelatasa en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos que constituye la región deseada ha sido modificada. El gen aislado puede ser confirmado como el gen que codifica la proteína deseada analizando la secuencia de nucleótidos del ADN plasmídico de la *Escherichia coli*.

Los genes que codifican los péptidos que tienen afinidad por la protoporfirina IX, esto es, las proteínas compuestas por 6 a 100 aminoácidos pueden ser obtenidos sintetizando una colección peptídica, por ejemplo, de acuerdo con el método de la química combinatoria descrito por Sugimoto, N., Nakano, S., Chem., Lett., pág. 939 (1997) y similares, seleccionando un péptido que tiene afinidad por la sustancia para el control de las malas hierbas, analizando la secuencia de aminoácidos del péptido así seleccionado con un secuenciador peptídico, diseñando un gen que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, y sintetizando la secuencia de nucleótidos con un sintetizador de ADN o similar.

Adicionalmente, se puede seleccionar un clon de fago que presenta un péptido que tiene afinidad por la sustancia para el control de las malas hierbas de una colección de fagos de acuerdo con el método de presentación en fagos. Específicamente, por ejemplo, se construye una colección de fagos que presentan una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos al azar sobre la superficie de partículas del fago M13 insertando una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos al azar aguas arriba de la región que codifica la proteína de la envoltura pIII del gen del fago M13. Por otra parte, la sustancia para el control de las malas hierbas marcada con biotina se une a una placa recubierta con avidina o estreptavidina para preparar un soporte recubierto con la sustancia para el control de las malas hierbas. Se puede aislar un fago que presenta la proteína deseada que tiene afinidad por la sustancia para el control de las malas hierbas escrutando la colección de fagos anterior sobre la placa recubierta con la sustancia para el control de las malas hierbas y se puede obtener el gen de la proteína deseada a partir del fago aislado.

El gen que codifica una proteína que contiene la repetición de la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 53, 55, 57 o 59 cuatro veces u ocho veces puede ser producido, por ejemplo, seleccionando una secuencia de nucleótidos en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos anterior se repite las veces dadas después del codón de iniciación ATG, sintetizando un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada y un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos seleccionada por medio de un sintetizador de ADN, y sometiéndolos después a hibridación. Adicionalmente, los genes que codifican la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 54, 56, 58 o 60 pueden ser producidos seleccionando una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, sintetizando un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada y otro oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos seleccionada por medio de un sintetizador de ADN, y sometiéndolos después a hibridación. Con respecto a esto, para seleccionar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos dada, por ejemplo, se prefiere seleccionar codones utilizados frecuentemente en genes derivados de plantas.

En cuanto a los genes de PPO, por ejemplo, se conocen aquellos derivados de *Escherichia coli* (Acceso Genebank X68660), *Bacillus subtilis* (Acceso Genebank M97208), *Haemophilus influenzae* (Acceso Genebank L42023), ratón (Acceso Genebank D45185), ser humano (Acceso Genebank D38537), oruga (Acceso Genebank D83139), tabaco (Acceso Genebank Y13465, Y13466) y similares. Para aislar semejante gen conocido (se conoce su secuencia de nucleótidos), se lleva a cabo la PCR utilizando ADN genómico o ADNc de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores producidos basándose en secuencias de nucleótidos correspondientes a aquellas cercanas a los extremos N y C de la proteína codificada por el gen para amplificar el gen deseado. Adicionalmente, para obtener otros genes de PPO, por ejemplo, primero, se construye una colección de ADNc a partir de un organismo que tiene el gen deseado de acuerdo con el método descrito anteriormente. La colección de ADNc puede ser introducida en la cepa mutante de *Escherichia coli* deficiente en PPO VSR800 descrita por Narita, S., *et al.*, Gene, 182; pág. 169 (1996), sometiéndola después a un ensayo de complementación para seleccionar clones que contienen el gen PPO derivado del organismo deseado. Adicionalmente, para amplificar un fragmento de ADN, se puede llevar a cabo una PCR utilizando la colección de ADNc construida anteriormente como molde y cebadores preparados basándose en las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre los genes conocidos tales como los genes descritos anteriormente. El escrutinio de la colección de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el fragmento de ADN obtenido de este modo como sonda para seleccionar los clones positivos. El gen PPO deseado puede ser confirmado mediante determinación de la secuencia de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado.

Para obtener el gen que codifica una variante de PPO que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene una afinidad específica por el protoporfirinógeno IX, por ejemplo, se mutageniza el gen PPO introduciendo una sustitución, adición, delección, modificación, etc. de nucleótidos y el gen modificado resultante se introduce en la *Escherichia coli* anterior cuyo crecimiento es inhibido de una forma dependiente de la luz mediante tratamiento con un compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO. Un gen que codifica una proteína que tiene capacidad de unión a protoporfirinógeno IX puede ser seleccionado cultivando la *Escherichia coli* obtenida de este modo en presencia de hemina, ácido aminolevulínico y un compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO para seleccionar un clon que puede crecer incluso en la luz. Se puede seleccionar un gen que codifica una proteína que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX expresando el gen modificado seleccionado de este modo en un anfitrión tal como *Escherichia coli*, etc. para preparar una proteína codificada por el gen, y midiendo su capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX de acuerdo con el método descrito por Jacobs, N.J. y Jacobs, J.M. (1982) *Enzyme*, 28, 206-219. y similares. Más específicamente, el gen modificado antes se inserta en un vector de expresión para *Escherichia coli* y se introduce en el mutante deficiente del gen PPO (locus hemG) de *Escherichia coli* tal como la cepa BT3 de *Escherichia coli* descrito por Yamamoto, F., *et al.*, *Japanese J. Genet.*, 63; pág. 237 (1988) y similares. La *Escherichia coli* se cultiva en un medio de cultivo que contiene hemina y ácido aminolevulínico además del inhibidor del crecimiento celular correspondiente al marcador de selección del vector introducido en la *Escherichia coli* para obtener transformantes. La proteína codificada por el gen modificado puede ser producida a partir del transformante. Adicionalmente, un gen que no complementa la deficiencia en el gen PPO de su célula anfitriona puede ser obtenido cultivando el transformante en un medio de cultivo esencialmente libre de hemina y ácido aminolevulínico para identificar una cepa que no crece. Este último método también puede ser utilizado para la selección del gen que codifica una proteína que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX.

Adicionalmente, para obtener el gen que codifica una variante de PPO en la cual la región que se presume que es un sitio de unión de FAD de PPO (la región que tiene la secuencia de aminoácidos GXGXXG, donde X es cualquier aminoácido) está suprimida, primero, se prepara un cebador de mutagénesis para la introducción de la mutación por delección de la región basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos cerca de la región. Después, se lleva a cabo la PCR utilizando el cebador de mutagénesis y un kit de mutagénesis dirigida al sitio disponible en el mercado (Mutan-Super Express, Takara Shuzo) como se ha descrito anteriormente para obtener el gen que codifica la proteína variante anterior en la cual se ha suprimido la región.

Los genes que codifican las proteínas peptídicas tales como los péptidos HASYS y RASSL que tienen afinidad por la protoporfirina IX, y los péptidos YAGA y YAGF que tienen afinidad por los compuestos de porfirina, y similares pueden ser obtenidos sometiendo los oligonucleótidos sintetizados mediante un sintetizador de ADN a hibridación.

Además, los genes que codifican las proteínas peptídicas desconocidas que tienen afinidades por otras sustancias para el control de las malas hierbas pueden ser producidos mediante los siguientes métodos y similares. Por ejemplo, se pueden construir diversas colecciones peptídicas de acuerdo, por ejemplo, con el método de química combinatoria descrito por Sugimoto, N., Nakano, S., *Chem., Lett.*, p 939 (1997), y similares. Los péptidos se seleccionan a partir de las colecciones peptídicas construidas de este modo con las pautas de las afinidades por las sustancias para el control de las malas hierbas, seguido del análisis de las secuencias de aminoácidos de los péptidos con un secuenciador peptídico. De este modo, se pueden sintetizar los genes que codifican los péptidos por medio de un sintetizador de ADN. Alternativamente, se pueden obtener clones de fagos que presentan péptidos que tienen afinidades por las sustancias para el control de las malas hierbas seleccionando colecciones de fagos de acuerdo con el método de presentación en fagos. Específicamente, por ejemplo, se construye una colección de fagos que presentan una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos al azar sobre la superficie de partículas del fago M13 insertando una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos al azar aguas arriba de la región que codifica la proteína de la envoltura pIII del gen del fago M13. Por otra parte, la sustancia para el control de las malas hierbas marcada con biotina se une a una placa recubierta con avidina o estreptavidina para preparar un soporte recubierto con la sustancia para el control de las malas hierbas. Se puede aislar un fago que presenta la proteína deseada que tiene afinidad por la sustancia para el control de las malas hierbas escrutando la colección de fagos anterior sobre la placa recubierta con la sustancia para el control de las malas hierbas y se puede obtener el gen de la proteína deseada a partir del fago aislado.

En cuanto a los genes que codifican por ejemplo la coproporfirinógeno III oxidasa, por ejemplo, se conocen aquellos derivados de *Escherichia coli* (Acceso Genbank X75413), *Salmonella typhimurium* (Acceso Genbank L19503), levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Acceso Genbank J03873), ratón (Acceso Genbank D1633), ser humano (Acceso Genbank D16333), soja (Acceso Genbank X71083), cebada (Acceso Genbank X82830), tabaco (Acceso Genbank X82831) y similares. Para aislar semejante gen conocido (se conoce su secuencia de nucleótidos), se lleva a cabo la PCR utilizando ADN genómico o ADNc de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores producidos basándose en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las cercanas a los extremos N y C de la proteína codificada por el gen para amplificar el gen deseado. Adicionalmente, para obtener los genes de la coproporfirinógeno III oxidasa, por ejemplo, primero, se construye una colección de ADNc de un organismo que tiene el gen deseado preparando ARNm del organismo deseado, sintetizando ADNc utilizando el ARNm como molde con una transcriptasa inversa e integrando este en un vector plasmídico tal como pRS313 descrito por Sikorski, R.S., *et al.*, *Genetics*, 122; pág. 19 (1989), y similares. La colección ADNc puede ser introducida en cepa mutante HEM13 carente de coproporfirinógeno III oxidasa de levadura descrita por Troup, B., *et al.*, *Bacteriol.*, 176; pág. 673 (1994), sometiéndola después a ensayo de complementación para seleccionar clones que contienen coproporfirinógeno III oxidasa derivada del organismo deseado. Adicionalmente, para amplificar un fragmento de ADN, se puede llevar a cabo una

PCR utilizando la colección de ADNc construida anteriormente como molde y cebadores preparados basándose en las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre los genes conocidos tales como los genes descritos antes. El escrutinio de la colección de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el fragmento de ADN obtenido de este modo como sonda para seleccionar los clones positivos. El gen de la coproporfirinógeno III oxidasa deseado se puede confirmar mediante determinación de la secuencia de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado.

Para obtener el gen que codifica una variante de la coproporfirinógeno III oxidasa que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene una afinidad específica por el protoporfirinógeno IX, por ejemplo, se mutageniza el gen de la coproporfirinógeno III oxidasa introduciendo una sustitución, adición, delección, modificación, etc. de nucleótidos y el gen resultante se introduce en la *Escherichia coli* anterior cuyo crecimiento es inhibido de una manera dependiente de la luz mediante tratamiento con un compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO. Se puede seleccionar un gen que codifica una proteína que tiene capacidad de unión a protoporfirinógeno IX cultivando la *Escherichia coli* obtenida de este modo en presencia de hemina, ácido aminolevulínico y un herbicida de tipo inhibidor de PPO para seleccionar un clon que puede crecer incluso en la luz. Se puede seleccionar un gen que codifica una proteína que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX expresando el gen modificado de este modo en un anfitrión tal como *Escherichia coli*, etc. para preparar una proteína codificada por el gen, y medir su capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX de acuerdo con el método descrito por Jacobs, N.J. y Jacobs, J.M. (1982) *Enzyme*, 28, 206-219 y similares.

Los genes utilizados en el segundo aspecto del método de la presente invención para elaborar plantas resistentes a los compuestos para el control de las malas hierbas son aquellos que codifican las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en:

- magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX;
 - ferroquelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,
 - un péptido que tiene afinidad por la protoporfirina IX, compuesto por 6 a 100 aminoácidos, estando dichos péptidos esencialmente libres de regiones marco de regiones variables de una inmunoglobulina,
 - protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX, y
 - coproporfirinógeno III oxidasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX;
 - no teniendo esencialmente dichas proteínas capacidad para modificar el protoporfirinógeno IX;
- donde las proteínas seleccionadas también pueden estar caracterizadas por las siguientes características (a) a (c):
- (a) tener una afinidad específica por la protoporfirina IX;
 - (b) no tener esencialmente capacidad para modificar el protoporfirinógeno IX; y
 - (c) estar sustancialmente libre de regiones marco de regiones variables de inmunoglobulinas.

El término “afinidad específica” por la protoporfirina IX en la característica (a) es esencialmente lo mismo que en el primer aspecto del método de la presente invención y significa que la proteína y la protoporfirina IX se unen entre sí, enzimáticamente o la proteína y la protoporfirina IX se unen entre sí basándose en la afinidad y especificidad como las mostradas en el enlace químico del receptor tal como el enlace entre un receptor y un ligando y similares. Las proteínas pueden ser proteínas de origen natural; variantes de las mismas en las cuales se introduce una sustitución, adición, delección, modificación y similares de aminoácidos en proteínas de origen natural; y proteínas sintetizadas artificialmente que tienen secuencias de aminoácidos al azar que se seleccionan con las pautas de una afinidad por la protoporfirina IX con tal que tengan estructuras que se unen específicamente a la protoporfirina IX.

El término “que no tiene esencialmente capacidad para modificar” el protoporfirinógeno IX en la característica (b) significa que la reactividad enzimática con el protoporfirinógeno IX de la proteína es esencialmente inactiva o no existe. Por ejemplo, esto significa que la proteína no tiene capacidad para convertir el protoporfirinógeno IX en una sustancia que tiene una estructura química diferente de la del protoporfirinógeno IX.

El término “esencialmente libre de regiones marco de regiones variables de inmunoglobulinas” significa lo mismo que en el primer aspecto anterior del método de la presente invención y la proteína no forma la estereoestructura específica de las regiones variables de la inmunoglobulina como se ha descrito aquí anteriormente.

Como ejemplos específicos de las proteínas que tienen las características (a) a (c) anteriores, existen proteínas de unión de tipo activo o inactivo que tienen afinidad por la protoporfirina IX [p. ej., magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo cuyo sustrato es la protoporfirina IX, ferroquelatasa de tipo activo o inactivo, cobalto quelatasa de tipo activo o inactivo que cataliza una reacción de quelación de un ión cobalto con un compuesto que tiene un anillo de tetrapirrol como sustrato, péptidos, esto es, proteínas compuestas por 4 a 100 aminoácidos, que tienen afinidad por la

protoporfirina IX (por ejemplo, proteínas que contienen al menos un péptido seleccionado entre el péptido HASYS que tiene afinidad por la protoporfirina IX, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 54; el péptido RASSL que tiene afinidad por la protoporfirina IX, esto es, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 55 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 56; el péptido YAGY que tiene afinidad por compuestos de porfirina, p. ej., una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 57 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 58; el péptido YAGF que tiene afinidad por compuestos de porfirina, esto es, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59 y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 60; y similares)], y similares.

Los genes que codifican las proteínas anteriores pueden ser obtenidos, por ejemplo, como sigue.

Las magnesio quelatasas de tipo activo están compuestas por tres proteínas subunitarias heterogéneas, esto es, la proteína de la subunidad unión a protoporfirina IX (proteína de la subunidad H), la proteína de la subunidad I y la proteína de la subunidad D, todas ellas esenciales para la actividad catalítica. Tres proteínas de subunidades independientes están codificadas por genes diferentes. Los genes de la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX pueden ser obtenidos mediante PCR o escrutinio de la colección de ADNc como se ha descrito aquí anteriormente.

En cuanto al gen que codifica la proteína de la subunidad I de una magnesio quelatasa, por ejemplo, se conocen aquellas derivadas de la bacteria fotosintética, *Rhodobacter sphaeroides* (Acceso Genebank AF017642), *Rhodobacter capsulatus* (Acceso Genebank Z11165), *Arabidopsis* (Acceso Genebank D49426), cebada (Acceso Genebank U26545), soja (Acceso Genebank D45857), tabaco (Acceso Genebank AF14053), *Synechocystis* P.C.C.6803 (Acceso Genebank U35144) y similares. Para aislar semejante gen conocido (se conoce su secuencia de nucleótidos), se puede llevar a cabo la PCR utilizando ADN genómico o ADN de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores producidos basándose en las secuencias de nucleótidos correspondientes a aquellas cercanas a los extremos N y C de la proteína codificada por el gen deseado. Adicionalmente, los genes que codifican la proteína de la subunidad I de una magnesio quelatasa pueden ser obtenidos a partir de organismos fotosintéticos distintos de los anteriores. Por ejemplo, se construye primero una colección de ADNc obteniendo ARNm de los organismos fotosintéticos deseados, sintetizando el ADNc utilizando el ARNm como molde con una transcriptasa inversa, e integrando el ADNc en un vector de fago tal como ZAPII, etc. o un vector plasmídico tal como pUC, etc. Para amplificar un fragmento de ADN que contiene al menos una parte del gen que codifica la proteína de la subunidad I de una magnesio quelatasa, se puede llevar a cabo una PCR utilizando la colección de ADNc construida anteriormente como molde y cebadores diseñados y sintetizados basándose en las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre los genes conocidos tales como los genes descritos anteriormente. El escrutinio de la colección de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el fragmento de ADN obtenido de este modo como sonda para seleccionar clones positivos. El gen deseado de la proteína de la subunidad I de una magnesio quelatasa puede ser confirmado mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado.

En cuanto al gen que codifica la proteína de la subunidad D de una magnesio quelatasa, por ejemplo, se conocen aquellos derivados de la bacteria fotosintética, *Rhodobacter sphaeroides* (Acceso Genebank AJ001690), *Rhodobacter capsulatus* (Acceso Genebank Z11165), guisante (Acceso Genebank AFO14399), tabaco (Acceso Genebank Y10022), *Synechocystis* P.C.C.6803 (Acceso Genebank X96599) y similares. El aislamiento de semejante gen conocido (su secuencia de nucleótidos es conocida) o de genes distintos de los anteriores se puede llevar a cabo de la misma manera que se ha descrito en el del gen que codifica la proteína de la subunidad I de la magnesio quelatasa.

Los genes utilizados en el tercer aspecto, del método de la presente invención para elaborar plantas resistentes a los compuestos para el control de las malas hierbas son aquellos que codifican proteínas seleccionadas del grupo que consiste en:

magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,

ferroquelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX

un péptido que tiene afinidad por la protoporfirina IX, compuesto por 6 a 100 aminoácidos, estando dichos péptidos esencialmente libres de regiones marco de regiones variables de inmunoglobulina,

Protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX, y

coproporfirinógeno III oxidasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX;

no teniendo esencialmente dichas proteínas capacidad para modificar el protoporfirinógeno IX;

donde las proteínas seleccionadas también pueden estar caracterizadas por las siguientes características (a) a (c):

(a) tener una afinidad específica por el protoporfirinógeno IX;

- (b) tener la capacidad de modificar el coproporfirinógeno III; y
- (c) estar esencialmente libre de regiones marco de regiones variables de inmunoglobulinas.

5

El término “una afinidad específica” por el protoporfirinógeno IX de la característica (a) es esencialmente el mismo que el del primer o segundo aspecto anteriores del método de la presente invención y significa que la proteína y el protoporfirinógeno IX se unen entre sí, enzimáticamente o la proteína y el protoporfirinógeno IX se unen entre sí basándose en la afinidad y la especificidad mostradas en el enlace receptor-compuesto químico tal como un enlace entre un receptor y un ligando y similares. Las proteínas pueden ser proteínas de origen natural; variantes de las mismas en las cuales se introduce una sustitución, adición, delección, modificación y similares de aminoácidos en las proteínas de origen natural; y proteínas sintetizadas artificialmente que tienen secuencias de aminoácidos al azar que se seleccionan con las pautas de afinidad por el protoporfirinógeno IX con tal que tengan estructuras que se unen específicamente al protoporfirinógeno IX.

15

El término “que no tiene la capacidad de modificar” el coproporfirinógeno III de la característica (b) significa que la reactividad enzimática con el coproporfirinógeno III de las proteínas está inactiva. Por ejemplo, esto significa que la proteína tiene la capacidad de convertir el coproporfirinógeno III en una sustancia que tiene una estructura química diferente de la del coproporfirinógeno III.

20

El término “esencialmente libre de regiones marco de regiones variables de inmunoglobulinas” significa lo mismo que en el primer o segundo aspecto anterior del método de la presente invención y la proteína no forma la estereoes-structura específica para las regiones variables de la inmunoglobulina como se ha descrito aquí antes.

25

Como ejemplos específicos de las proteínas que tienen las características (a) a (c) anteriores, se encuentran las proteínas de unión de tipo activo o inactivo que tienen afinidad por el proporfirinógeno IX, por ejemplo, la coproporfirinógeno III oxidasa de tipo activo cuyo sustrato es el proporfirinógeno IX, y similares.

30

Como referencia, la actividad de una magnesio quelatasa, una ferroquelatasa o una coproporfirinógeno III oxidasa se mide, por ejemplo, utilizando el siguiente método.

(1) *Una magnesio quelatasa*

Los genes que codifican tres proteínas de subunidades independientes se utilizan para detectar la actividad magnesio quelatasa de acuerdo con el método de Gibson, L.C.D., *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92; pág. 1941 (1995)) y similares.

40

(2) *Una ferroquelatasa*

Se puede detectar una actividad ferroquelatasa, por ejemplo, de acuerdo con el método de Porra, R.J. (Anal. Biochem., 68; pág. 289 (1975)) y similares.

45

(3) *Una coproporfirinógeno III oxidasa*

Se puede detectar una actividad coproporfirinógeno III oxidasa, por ejemplo, de acuerdo con el método de Yoshinaga, T., Sano, S., *et al.* (J. Biol. Chem., 255; pág. 4722 (1980)) y similares.

50

En el método (incluyendo el primer y el segundo aspecto anteriores) de la presente invención, para introducir el gen que codifica la proteína mencionada en la presente memoria, se puede introducir un gen que codifica una proteína. Adicionalmente, se pueden introducir genes plurales que codifican proteínas diferentes en una célula vegetal. Semejante introducción de genes en células vegetales se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales de ingeniería genética, por ejemplo, infección con *Agrobacterium* (JP-B 2-58917 y JP-A 60-70070), electroporación en protoplastos (JP-A 60-251887 y JP-A 5-68575), métodos de pistola génica (JP-A 5-508316 y JP-A 63-258525), y similares. Preferiblemente, el gen que se va a introducir en una célula vegetal es integrado en un vector que tiene un gen marcador de selección tal como un gen que puede proporcionar resistencia al inhibidor del crecimiento celular a la célula vegetal.

60

Para la expresión del gen en la célula vegetal, se puede introducir el gen en el cromosoma de una célula vegetal mediante recombinación homóloga [Fraley, R.T. *et al.*, pro. Natl. Acad. Sci. USA, 80; pág. 4803 (1983)] para seleccionar la célula vegetal que expresa el gen. Alternativamente, se puede introducir el gen en una célula vegetal de forma que esté ligado operablemente a un promotor y a un terminador ambos los cuales pueden funcionar en la célula vegetal.

65

El término “ligado operablemente” utilizado en la presente memoria significa que el promotor y el terminador anteriores está unidos en un estado tal que el gen introducido es expresado en la célula vegetal bajo el control del promotor y el terminador.

En cuanto al promotor que puede funcionar en una célula vegetal, por ejemplo, existen promotores constitutivos derivados de ADN T tales como el promotor del gen de la nopalina sintasa, el promotor del gen de la octopina sintasa, etc., promotores derivados de virus vegetales tales como los promotores de 19S y 35S derivados del virus del mosaico de la coliflor, etc., promotores inductivos tales como el promotor del gen de la fenilalanina amoníaco-liasa, el promotor del gen de la chalcona sintasa, el promotor del gen de la proteína relacionada con la patogénesis, etc., y similares. El promotor no está limitado a estos promotores y se pueden utilizar otros promotores vegetales.

En cuanto al terminador que puede funcionar en una célula vegetal, por ejemplo, existen terminadores derivados de ADN T tales como el terminador de la nopalina sintasa, etc., terminadores derivados de virus vegetales tales como terminadores derivados de virus del ajo GV1, GV2, etc., y similares. El terminador no está limitado a estos terminadores y se pueden utilizar otros terminadores vegetales.

En cuanto a las células vegetales en las que se introducen los genes, por ejemplo, existen tejidos vegetales, plantas completas, células cultivadas, semillas y similares. Los ejemplos de plantas en las cuales se introducen los genes incluyen dicotiledóneas tales como tabaco, algodón, colza, remolacha azucarera, oruga, canola, lino, girasol, patata, alfalfa, lechuga, banana, soja, guisante, legumbres, pinos, chopos, manzano, uva, frutos cítricos, nueces, etc.; y monocotiledóneas tales como maíz, arroz, trigo, cebada, ballico, avena, sorgo, caña de azúcar, césped, etc.

Las células vegetales transformantes que expresan el gen que codifica la proteína de unión mencionada en la presente memoria se pueden obtener cultivando células en las cuales el gen es transferido a un medio de cultivo de selección correspondiente a un marcador de selección unido al locus del gen, por ejemplo, un medio de cultivo que contiene un inhibidor del crecimiento celular, o similar, y aislando un clon capaz de crecer en el medio de cultivo. Alternativamente, las células vegetales transformantes anteriores pueden ser seleccionadas cultivando células vegetales en las que el gen es introducido en un medio de cultivo que contiene el compuesto para el control de las malas hierbas a las que se proporciona resistencia, y aislando clones capaces de crecer en el medio de cultivo. La planta resistente al compuesto para el control de las malas hierbas deseada se puede obtener a partir de células transformantes obtenidas de este modo regenerando la planta completa de acuerdo con un método de cultivo de células vegetales convencional, por ejemplo, el descrito en *Plant Gene Manipulation Manual, Method for Producing Transgenic Plants*, UCHIMIYA, Kodansha Scientific (1996). De este modo, se pueden obtener plantas transformadas tales como tejidos vegetales, plantas completas, células cultivadas, semillas y similares.

Por ejemplo, se pueden obtener arroz y oruga que expresan el gen que codifica la proteína anterior de acuerdo con el método descrito en *Experimental Protocol of Model Plants, Rice y Mouse-Ear Cress Edition*, (Supervisores: Koh SHIMAMOTO y Kiyotaka OKADA, Shujun-sha, 1996), Capítulo 4. Adicionalmente, de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente Japonesa 3-291501, se puede obtener soja que expresa el gen que codifica la proteína de unión introduciendo el gen en embrión adventicio de soja con una pistola de partículas. Del mismo modo, de acuerdo con el método descrito por Fromm, M.E., *et al.*, *Bio/Technology*, 8; pág. 838 (1990), se puede obtener maíz que expresa el gen que codifica la proteína anterior introduciendo el gen en embrión adventicio con una pistola de partículas. Se puede obtener trigo que expresa el gen que codifica la proteína anterior introduciendo el gen en un escutelo inmaduro de trigo cultivado en condiciones estériles con una pistola de partículas de acuerdo con un método convencional descrito por TAKUMI *et al.*, *Journal of Breeding Society* (1995), 44: Extra Vol. 1, pág. 57. Del mismo modo, de acuerdo con un método convencional descrito por HAGIO, *et al.*, *Journal of Breeding Society* (1995), 44: Extra Vol. 1, pág. 67, se puede obtener cebada que expresa el gen que codifica la proteína anterior introduciendo el gen en escutelo inmaduro de cebada cultivado en condiciones estériles con una pistola de partículas.

Para la confirmación de la resistencia al compuesto para el control de las malas hierbas de la planta que expresa el gen que codifica la proteína anterior, preferiblemente, la planta se reproduce aplicando el compuesto para el control de las malas hierbas al cual se proporciona resistencia para evaluar el grado de reproducción de la planta. Para una confirmación más cuantitativa, por ejemplo, en el caso de la resistencia a un compuesto que tiene actividad herbicida de tipo inhibidor de PPO, preferiblemente, se sumergen porciones de hojas de la planta en soluciones acuosas que contienen el compuesto que tiene actividad herbicida de tipo inhibidor de PPO a diferentes concentraciones, o las soluciones acuosas que contienen el compuesto que tiene actividad herbicida se pulverizan sobre porciones de hojas de la planta, dejando estar después sobre medio de agar con luz a la temperatura ambiente. Después de varios días, se extrae la clorofila de las hojas de la planta de acuerdo con el método descrito por Mackenney, G., *J. Biol. Chem.*, 140; pág. 315 (1941) para determinar el contenido de clorofila.

Puesto que las plantas resistentes al compuesto para el control de las malas hierbas (p. ej., tejidos de plantas, plantas completas, células cultivadas, semillas, etc.) obtenidas mediante el método de la presente invención (incluyendo los aspectos primero a tercero) muestran resistencia a los compuestos para el control de las malas hierbas, incluso en el caso en el que se aplica un compuesto de control de las malas hierbas a una zona de crecimiento (p. ej., una zona de cultivo, una zona de proliferación, etc.), la planta puede crecer. Por lo tanto, cuando se aplica un compuesto para el control de las malas hierbas a una zona de crecimiento de la planta resistente al compuesto para el control de las malas hierbas deseada, la planta deseada puede ser protegida de las plantas sin resistencia respecto a la planta para el control de las malas hierbas. Por ejemplo, se pueden controlar eficazmente las malas hierbas aplicando un compuesto para el control de las malas hierbas sobre una zona de crecimiento de la planta que tiene resistencia al compuesto para el control de las malas hierbas.

Adicionalmente, aplicando un compuesto para el control de las malas hierbas a una zona de crecimiento de la planta resistente al compuesto para el control de las malas hierbas obtenida mediante el método de la presente invención (incluyendo los aspectos primero a tercero) y otras plantas (p. ej., aquellas que no tienen resistencia o tienen una resistencia débil al compuesto para el control de las malas hierbas), se puede seleccionar una de las plantas basándose en la diferencia en el crecimiento entre las plantas. Por ejemplo, aplicando (añadiendo) un compuesto para el control de las malas hierbas a una zona de cultivo (medio de cultivo) de la planta resistente al compuesto para el control de las malas hierbas obtenida mediante el método de la presente invención y otras células vegetales (p. ej., aquellas que no tienen resistencia o tienen una resistencia débil al compuesto para el control de las malas hierbas), se puede seleccionar una de las células vegetales eficazmente basándose en la diferencia en el crecimiento entre las plantas.

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención con detalle pero no se debe considerar que limitan el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Aislamiento del Gen de la Proteína de la Subunidad de Unión a Protoporfirina IX de la Magnesio Quelatasa

Se preparó ADN genómico de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17023 utilizando el kit ISOPLANT para la preparación de ADN genómico (fabricado por Nippon Gene). Después, de acuerdo con la descripción de Gibson, L.C.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. URSA, 92; pág. 1941 (1995), se llevó a cabo la PCR utilizando aproximadamente 1 µg de dicho ADN genómico como molde, y 10 pmoles de un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1 y 10 pmoles de un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 2 como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen de la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX *bchH* de la magnesio quelatasa. Los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo manteniendo a 94°C durante 2 minutos, a 96°C durante 40 segundos y después a 68°C durante 7 minutos, repitiendo un ciclo de mantenimiento a 96°C durante 40 segundos y después a 68°C durante 7 minutos 28 veces, y manteniendo finalmente a 96°C durante 40 segundos, a 68°C durante 7 minutos y después a 72°C durante 10 minutos.

Ejemplo 2

Expresión del Gen de la Proteína de la Subunidad de Unión a Protoporfirina IX de la Magnesio quelatasa en Escherichia coli (en adelante abreviada como E. coli)

De acuerdo con la descripción de Gibson, L.C.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92; pág. 1941 (1995), se dirigió el fragmento de ADN que contenía el gen *bchH* preparado en el Ejemplo 1 con las enzimas de restricción NdeI y BglII. El fragmento de ADN resultante se insertó entre el sitio de restricción NdeI y el sitio de restricción BamHI del vector de expresión pET11a (fabricado por Stratagene) para obtener el plásmido pETBCH (Fig. 1). Este plásmido pETBCH se introdujo en células competentes de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (fabricado por Stratagene) de acuerdo con el manual adjunto a las células competentes para obtener la cepa BL21(DE3)/pETBCH de *E. coli*. La cepa se inoculó en 1,5 ml de medio de cultivo líquido LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%) que contenía 100 µg/ml de ampicilina en un tubo (14 x 10 mm), y el tubo se cubrió con papel de aluminio (referido en adelante como condiciones de oscuridad), se cultivó con sacudimiento a 37°C a la luz de una lámpara fluorescente (aproximadamente 8000 lux). Cuando la absorbancia a 600 nm del medio de cultivo líquido llegó a 0,6, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de cultivo líquido de manera que la concentración final fuera de 0,4 mM, y el cultivo continuó durante aproximadamente 20 horas más. En ese momento, la *Escherichia coli* viró a color rojo y se observó absorbancia fluorescente (longitud de onda de excitación 405 nm, longitud de onda de emisión 630 nm) que demostró la acumulación de protoporfirina IX en *E. coli*. Cuando se cultivó la cepa BL21 (DE3)/pETBCH de *E. coli* de la misma manera excepto que no se añadió IPTG, la *E. coli* no viró a color rojo y no se detectó la absorbancia fluorescente anterior. En contraste con esto, cuando se cultivó la cepa BL21(DE3)/pETHCH de *E. coli* de la misma manera (con IPTG) excepto que el tubo no estaba cubierto con papel de aluminio (referido en adelante como condiciones de luz), *E. coli* creció y viró a color rojo como antes.

Ejemplo 3

Expresión del Gen PPO Derivado de Soja en el E. coli Carente del Gen hemG

Se sembró soja (*Glycine max* var. Williams 82) y se cultivó a 25°C durante 20 días y se recogieron hojas verdes. Las hojas verdes recogidas se congelaron con nitrógeno líquido y las hojas congeladas se trituraron con una mano y un mortero. De las hojas trituradas, se extrajo el ARN utilizando el reactivo para la extracción de ARN ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) de acuerdo con el manual adjunto. El extracto líquido con ARN resultante se sometió a precipitación con etanol para recoger el ARN total, después el ARN total se fraccionó utilizando el kit de fraccionamiento de ADN poli (A) BIOMAG mRNA Purification Kit (fabricado por Perceptive Bio System) de acuerdo con el manual adjunto para recoger la fracción de ARN poli(A). Utilizando 1 µg de esta fracción de ARN poli(A) como

molde, se sintetizó ADNc con el reactivo sintético de ADNc contenido en el kit de amplificación de ADNc Marathon (fabricado por Clontech) de acuerdo con el manual adjunto. La PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc resultante como molde, y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3 y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 4 como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que contiene el gen de la protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo cloroplasto. Los oligonucleótidos anteriores se prepararon con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo manteniendo a 94°C durante 1 minuto y después a 65°C durante 5 minutos, repitiendo un ciclo de mantenimiento a 94°C durante 15 segundos y después a 65°C durante 5 minutos 29 veces. Después de la PCR, el fragmento de ADN amplificado se purificó filtrando la mezcla de reacción con MicroSpin S-400HR (fabricado por Pharmacia Biotech), y el fragmento de ADN se ligó al plásmido pCR2.1 (fabricado por Invitrogen) escindido por la enzima de restricción Sall para obtener el plásmido pSPPO-P. Después, se introdujo el plásmido en células competentes de la cepa INVαF' de *E. coli* (fabricada por Invitrogen) y se seleccionaron las cepas resistentes a ampicilina. Después, el plásmido contenido en las cepas resistentes a ampicilina seleccionadas se secuenciaron utilizando el kit de Secuenciación Dye Terminator Cycle Sequencing (fabricado por PE Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN 3735 (fabricado por PE applied Biosystems). Como resultado, se reveló la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 5, confirmando de ese modo que el plásmido pSPPO-P contenía el gen de la protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo cloroplasto de soja.

Se digirió el plásmido pSPPO-P con la enzima de restricción PshBI, se volvieron romos los extremos del fragmento de ADN resultante utilizando ADN polimerasa de T4 y adicionalmente se digirieron con SphI para aislar el fragmento de ADN que contenía el gen de PPO de tipo cloroplasto de la soja y el promotor lac. Después, se digirió el plásmido pACYC₁84 (fabricado por Nippon Gene) con las enzimas de restricción NruI y SphI para separar el fragmento de 410 pb y se insertó el fragmento de ADN anterior en su lugar para obtener el plásmido pACYCSP (Fig. 2). Después, se introdujo el plásmido pACYCSP en la cepa BT3 de *E. coli* carente del gen PPO (locus del gen hemG) (descrito por Yamamoto, F. *et al.*, Japanese J. Genet., 63; pág. 237 (1988) etc.) de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). La *E. coli* resultante se cultivó en medio YPT (5 g/litro de extracto de levadura, 5 g/litro de triptona, 5 g/litro de peptona, 10 g/litro de NaCl, pH 7,0) que contenía 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina para seleccionar la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* resistente a cloramfenicol y kanamicina cuya carencia de gen hemG fue complementada por el gen derivado de la soja.

Ejemplo 4

Ensayo de la Proteína de la Subunidad de Unión a Protoporfirina IX de la Magnesio quelatasa en busca de la Capacidad para proporcionar Resistencia a Compuestos para el Control de las Malas Hierbas

Se inoculó la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm de compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8 anterior, 10 µg/ml de hemina, 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina, se cultivó en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Como control, se cultivó la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* en el mismo medio que antes sin los compuestos herbicidas en las mismas condiciones. Luego, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin el compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP	en luz	0,10	0,25	1,0
BT3/pACYCSP	en oscuridad	0,73	0,95	1,0

ES 2 319 346 T3

Se construyó el plásmido pTVBCH (Fig. 3) mediante amplificación del fragmento de ADN que contenía el gen *bchH* derivado de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* utilizando un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2 de la misma manera que en el Ejemplo 1, digestión del fragmento de ADN resultante con las enzimas de restricción NcoI y BglII e introducción del fragmento de ADN digerido entre el sitio de restricción NcoI y el sitio de restricción BamHI del plásmido pTV118N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.).

Se introdujeron los plásmidos pTVBCH y pTV118N respectivamente en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). La *E. coli* resultante se cultivó en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina para obtener la cepa BT3/pACYCSP+pTVBCH de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pTVBCH, y la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pTV118N.

Estas cepas se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8 anterior, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin el compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Cepa de <i>E. coli</i> .	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTVBCH	en luz	0,80	0,77	1,0
BT3/pACYCSP+pTVBCH	en oscuridad	0,90	1,06	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,18	0,31	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,68	0,77	1,0

Adicionalmente, estas cepas se inocularon en medio YPT que contenía compuestos herbicidas de tipo inhibidor de PPO representados por las Estructuras 1, 14, 15, 18-22, 29, 32, 33, 34 y 36, anteriores, respectivamente, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, de 10 µg/ml hemina y de 50 µg/ml ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz similares a las del Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Estructura del compuesto de ensayo Núm.	Concen- tración de ensayo	Absorbancia relativa			
		BT3/pACYCSP+pTVBCH		BT3/pACYCSP+pTV118N	
		en luz	en oscuridad	en luz	en oscuridad
Estructura 1	5,0	0,88	0,88	0,31	0,87
Estructura 14	10	0,47	0,93	0,12	0,81
Estructura 15	0,5	0,94	0,94	0,38	0,82
Estructura 18	2,0	0,68	1,0	0,33	0,91
Estructura 19	5,0	0,78	0,89	0,40	0,71
Estructura 20	5,0	0,57	0,88	0,11	0,75
Estructura 21	10	0,88	0,91	0,25	0,85
Estructura 22	10	0,55	0,93	0,29	0,94
Estructura 29	0,5	0,64	0,90	0,22	0,77
Estructura 32	2,0	0,70	0,94	0,37	0,87
Estructura 33	2,0	0,81	0,92	0,41	0,91
Estructura 34	1,0	0,41	0,94	0,19	0,86
Estructura 36	0,5	0,55	0,95	0,28	0,96

Ejemplo 5

Introducción del Gen que Codifica la Proteína de la Subunidad de Unión a la Protoporfirina IX de la Magnesio quelatasa en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen *bchH* en una planta mediante el método de infección con *Agrobacterium*. Primero, se digirió el vector binario pBI121 (fabricado por Clontech) con la enzima de restricción *SacI*, y se insertó el conector *Kpn I* (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para preparar el plásmido pBIK en el que se separó el sitio de reconocimiento *SacI* de pBI121 y se añadió el sitio de reconocimiento de *Kpn I*. Por otra parte, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN genómico de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* como molde, y el cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 7 y el cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 8 para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen *bchH*. Después, se digirió el plásmido pBIK anterior con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* para separar el gen de la β -glucuronidasa, y en lugar de ello, se insertó un fragmento de ADN que se obtuvo digiriendo el fragmento de ADN anterior que contenía el gen *bchH* con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* para producir el plásmido pBIBCH (Fig. 4) en el que se unía el gen *bchH* aguas abajo del promotor de 35S. El vector binario pBI121 (fabricado por Clontech) también se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI* para separar el gen de la β -glucuronidasa, se volvieron romos los extremos del fragmento de ADN resultante utilizando ADN polimerasa de T4, seguido de auto-ciclación con ADN ligasa de T4 para construir el plásmido pNO (Fig. 5). Se utilizó el plásmido como vector control del plásmido de expresión de *bchH* pBIBCH.

Se introdujeron el plásmido pBIBCH y pNO en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, respectivamente. Las cepas de *Agrobacterium* que portaban pBIBCH y que portaban pNO se aislaron cultivando los transformantes resultantes en un medio que contenía 300 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml de kanamicina y seleccionando los transformantes deseados.

Después, de acuerdo con el método descrito en el Manual para la Manipulación Génica de Plantas (de Hirofumi UCHIMIYA, Kodan-sha Scientific, 1992), se introdujo el gen en tabaco. Se cultivó la cepa de *Agrobacterium* que portaba el plásmido pBIBCH a 28°C durante la noche en medio LB y luego se sumergieron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles en el medio de cultivo líquido. Los trozos de hoja se cultivaron a la temperatura ambiente durante 2 días en medio Murashige-Skoog (medio MS, descrito por Murashige T. y Skoog F., *Physiol. Plant.* (1962) 15, pág. 473) que contenía agar al 0,8%, 0,1 mg/litro de ácido naftalenoacético y 1,0 mg/litro de bencilaminopurina. Después, se lavaron trozos de hoja con agua esterilizada y se cultivaron durante 7 días en medio MS que contenía agar al 0,8%, 0,1 mg/litro de ácido naftalenoacético, 1,0 mg/litro de bencilaminopurina y 500 µg/ml de cefotaxima. Se transplantaron los trozos de hoja a medio MS que contenía agar al 0,8%, 0,1 mg/litro de ácido naftalenoacético, 1,0 mg/litro de bencilaminopurina, 500 µg/ml de cefotaxima y 100 µg/ml de kanamicina (referido en adelante como medio MS selectivo) y se cultivaron sobre medio continuamente durante 4 meses transplantando los trozos de hoja de tabaco sobre medio MS selectivo reciente cada mes. Durante el cultivo, aparecieron brotes diferenciados de tallo y hoja a partir de los trozos de hoja de tabaco; estos brotes se transplantaron a medio MS que contenía agar al 0,8%, 300 µg/ml de cefotaxima y 50 µg/ml de kanamicina para inducir raíces para obtener plantas regeneradas. La planta regenerada resultante se transplantó y se introdujo sobre medio MS con agar al 0,8% y 50 µg/ml de kanamicina para obtener plantas de tabaco en las cuales se introdujo el gen bchH. De un modo similar, se infectaron trozos de hojas de tabaco con una cepa de *Agrobacterium* que portaba pNO para obtener plantas regeneradas a partir de los trozos de hoja de tabaco y plantas de tabaco (referidas en adelante como tabaco recombinante de control).

Ejemplo 6

Ensayo de Tabaco que Porta un Gen Introducido que Codifica la Proteína de la Subunidad de Unión a Protoporfirina IX de la Magnesio quelatasa en busca de Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se recogieron las hojas de tabaco en las cuales se había introducido el gen bchH y las hojas de tabaco recombinante de control obtenidas en el Ejemplo 5 y cada hoja se dividió en trozos equivalentes derecho e izquierdo a lo largo del nervio principal, respectivamente. A un trozo se le aplicó una solución acuosa que contenía 0,3 ppm de compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO de Estructura 8, mientras, al otro trozo no se le aplicó el compuesto. Estos trozos de hoja se colocaron en medio MS que contenía agar al 0,8% y se dejaron estar a la temperatura ambiente durante 7 días en un lugar con luz. Después, se trituró cada trozo de hoja con una mano y un mortero en 5 ml de solución acuosa de acetona al 80% para extraer la clorofila. El líquido del extracto se diluyó con solución acuosa de acetona al 80% y se midió la absorbancia a 750 nm, 663 nm y 645 nm para calcular el contenido total de clorofila de acuerdo con el método descrito por Macknney G., *J. Biol. Chem.* (1941) 140, pág. 315. Los resultados obtenidos de 4 clones de tabaco en los que se introdujo el gen bchH (BCH1 a 4) y del tabaco recombinante de control se muestran en la Tabla 4. En la tabla, se representó el nivel de resistencia al compuesto herbicida por medio de porcentajes del contenido total de clorofila de los trozos de hoja tratados con compuesto herbicida con respecto a los de los trozos de hoja no tratados.

TABLA 4

Tabaco recombinante	Contenido total de clorofila (mg/g peso fresco)		Nivel de resistencia al compuesto de ensayo (%)
	hoja no tratada	hoja tratada	
control	2,49	0,19	7,63
BCH-1	1,35	1,70	126
BCH-2	2,06	2,14	104
BCH-3	1,93	1,57	81,3
BCH-4	1,51	1,06	70,2

ES 2 319 346 T3

El clon de tabaco en el que se había introducido el gen *bchH* y el tabaco recombinante de control también se trataron de la misma manera con la solución que contenía el compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 3, 7, 10, 11, 13, 17, 23, 24, 25, 27, 28, 30 o 35 anterior, y se midió el nivel de resistencia a cada compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 5. En la tabla, los niveles de resistencia al compuesto herbicida se representaron como porcentajes del contenido de clorofila total de los trozos de hoja tratados con el compuesto herbicida con respecto al de los trozos de hoja no tratados.

TABLA 5

Núm. de Estructura del Compuesto de Ensayo	Concentración de Ensayo (ppm)	Nivel de resistencia al compuesto de ensayo (%)	
		Tabaco recombinante <i>bchH</i>	Tabaco recombinante de control
Estructura 3	10	114	9,94
Estructura 7	30	89,3	8,62
Estructura 10	10	84,0	14,9
Estructura 11	0,30	78,1	5,51
Estructura 13	30	95,2	14,8
Estructura 17	0,30	80,4	14,3
Estructura 23	3,0	106	5,58
Estructura 24	10	129	5,18
Estructura 25	10	104	16,0
Estructura 27	10	86,8	16,8
Estructura 28	0,30	72,2	8,79
Estructura 30	3,0	102	4,24
Estructura 35	0,30	83,3	17,4

Ejemplo 7

Aislamiento del Gen que Codifica la Proteína Variante de la Proteína de la Subunidad de Unión a Protoporfirina IX de la Magnesio quelatasa de tabaco

Los ARN totales se prepararon a partir de tejido de hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) utilizando el kit RNeasy Plant (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con el manual adjunto. El fragmento de ADN que contenía el gen que codifica la proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa de tabaco cuya señal de tránsito a cloroplastos ha sido suprimida (referida en adelante como subunidad de la quelatasa de tabaco variante) se obtuvo utilizando el Kit RNA LA PCR (AMV) Ver 1.1 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) de acuerdo con el manual adjunto. Primero, se sintetizó la 1ª hebra de ADN utilizando los ARN totales de tabaco como moldes y el Oligo dT-Adaptor Primer contenido en el kit anterior como cebador con la transcriptasa inversa contenida en el kit anterior. Después, se llevó a cabo la PCR utilizando la 1ª hebra de ADNc como molde y LA Taq polimerasa contenida en el kit anterior para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la proteína de la subunidad

de la quelatasa de tabaco variante. En esta PCR, se utilizaron el cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 9 y el cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 10. Estos oligonucleótidos se sintetizaron utilizando un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con el cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo manteniendo a 94°C durante 2 minutos y repitiendo después un ciclo de mantenimiento a 94°C durante 30 segundos, a 50°C durante 30 segundos y después a 72°C durante 7 minutos 30 veces. Después de la PCR, el fragmento de ADN amplificado mediante la PCR se clonó en el plásmido pCR2.1 utilizando el Kit TA Cloning (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el manual adjunto. El plásmido resultante se digirió con la enzima de restricción KpnI y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El plásmido a partir del cual se detectó el fragmento de ADN de 8,0 kb tenía el nombre pTCHLH. El plásmido tenía una estructura en la que el gen que codifica la subunidad de la quelatasa de tabaco variante había sido insertado en la dirección expresable bajo el control del promotor lac. El plásmido pTCHLH se digirió con la enzima de restricción KpnI seguido de auto-ligación para obtener el plásmido pTCHLH1 (Fig. 6) en el que el fragmento de ADN compuesto por aproximadamente 60 nucleótidos había sido suprimido del plásmido pTCHLH.

Ejemplo 8

Ensayo de la Proteína de la Subunidad de la Magnesio quelatasa de tabaco variante en busca de la Capacidad para Proporcionar Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se introdujeron el plásmido pTCHLH1 y pCR2.1 preparado en el Ejemplo 7 en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3, respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Se obtuvieron la cepa BT3/pACYCSP+pTCHLH1 de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pTCHLH1, y la cepa BT3/pACYCSP+pCR2.1 de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pCR2.1 cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 50 µg/ml de kanamicina, respectivamente.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 50 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración del compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTCHLH1	en luz	0,69	0,89	1,0
BT3/pACYCSP+pTCHLH1	en oscuridad	0,92	0,93	1,0
BT3/pACYCSP+pCR2.1	en luz	0,03	0,08	1,0
BT3/pACYCSP+pCR2.1	en oscuridad	1,0	1,0	1,0

Ejemplo 9

Introducción del Gen que Codifica la Proteína de la Subunidad de la Magnesio quelatasa de Tabaco Variante en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codifica una proteína de la subunidad de la magnesio quelatasa de tabaco variante en tabaco mediante el método de infección con *Agrobacterium*. Primero, se preparó un fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la proteína de la subunidad de la magnesio quelatasa de tabaco variante digiriendo el plásmido pTCHLH1 preparado en el Ejemplo 7 con las enzimas de restricción KpnI y SalI. Por otra parte, se digirió el vector binario pBI121 (fabricado por Clonotech) con la enzima de restricción SmaI y se insertó el conector KpnI (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) en esta porción para preparar el plásmido pBI121K en el cual se había separado el sitio de reconocimiento SmaI de pBI121 y se había añadido el sitio de reconocimiento de KpnI. Se digirió el plásmido pBI121K con la enzima de restricción SacI volviendo después romos los extremos del ADN añadiendo nucleótidos al espacio del ADN de doble hebra con ADN polimerasa I. Después, se desfosforiló el ADN con fosfatasa alcalina derivada de intestino de ternera y se cicló insertando el conector de SalI fosforilado (4680P, fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pBI121KS. Se digirió el vector binario pBI121KS con las enzimas de restricción KpnI y SalI para separar el gen de la β -glucuronidasa y se insertó el gen que codificaba la proteína de la subunidad de la magnesio quelatasa de tabaco variante en esta porción para preparar el plásmido pBITCHLH (Fig. 7).

Se introdujo el plásmido pBITCHLH en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 μ g/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de rifampicina y 25 μ g/ml de kanamicina, seguido de la selección de los transformantes deseados para aislar una cepa de *Agrobacterium* que portara pBITCHLH.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con la cepa de *Agrobacterium* y, de la misma manera que en el Ejemplo 5, se obtuvo tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba la proteína de la subunidad de la magnesio quelatasa de tabaco variante.

Ejemplo 10

Confirmación de la Resistencia a los Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta el Gen que Codifica la Proteína de la Subunidad de la Magnesio Quelatasa de Tabaco Variante Introducido

Los niveles de resistencia a los compuestos herbicidas se confirman cuantitativamente sometiendo a ensayo el tabaco en el que se ha introducido el gen que codifica la proteína de la subunidad de la magnesio quelatasa de tabaco variante preparado en el Ejemplo 9 de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 11

Aislamiento del Gen que Codifica la Proteína Variante de PPO de Soja que No Tiene Capacidad de Oxidar el Protoporfirinógeno IX y que Tiene Afinidad Específica por el Protoporfirinógeno IX

Se llevó a cabo la PCR utilizando el plásmido pSPPO-P preparado en el Ejemplo 3 como molde y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 11 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 12 como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que codificaba la PPO de soja cuya señal de tránsito a cloroplastos y secuencia de unión a FAD habían sido suprimidas (referido en adelante como PPO de soja variante). Los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo repitiendo un ciclo de mantenimiento a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 2 minutos y a 72°C durante 3 minutos 30 veces. Los fragmentos de ADN amplificados se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y SalI, y se introdujeron entre el sitio de restricción NcoI y el sitio de restricción SalI del plásmido pTV118N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pTVGMP (Fig. 8).

El plásmido pTVGMP se introdujo en la cepa BT3 mutante carente del gen PPO de *E. coli* de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Cuando la *E. coli* resultante se cultivó en medio YPT que contenía 100 μ g/ml de ampicilina y 10 μ g/ml de kanamicina, no se obtuvo ningún clon con el crecimiento complementado.

Ejemplo 12

Ensayo del Efecto de Comunicación de Resistencia a Compuestos Herbicidas de la PPO de Soja Variante

Se introdujeron los plásmidos pTVGMP y pTV118N preparados en el Ejemplo 11 en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). La cepa BT3/pACYCSP+pTVGMP de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pTVGMP, y la cepa BT3/pACYCSP+ pTV118N de *E. coli* que portaba los plásmidos pACYCSP y pTV118N se obtuvieron cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm de compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio de cultivo sin compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTVGMP	en luz	0,33	0,85	1,0
BT3/pACYCSP+pTVGMP	en oscuridad	0,91	0,94	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,05	0,09	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,89	0,91	1,0

Ejemplo 13

Introducción del Gen que Codifica PPO de Soja Variante en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba PPO de soja variante en una planta mediante el método de infección con *Agrobacterium*. La PCR se llevó a cabo utilizando el plásmido pSPPO-P preparado en el Ejemplo 3 como molde, un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 13 y un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 14 para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba PPO de soja variante. Después, se digirió el plásmido pBI121K preparado en el Ejemplo 9 con las enzimas de restricción KpnI y SacI para separar el gen de la β-glucuronidasa, y se insertó el fragmento de ADN que se obtuvo digiriendo el fragmento de ADN que contenía el gen anterior que codificaba PPO de soja variante con las enzimas de restricción KpnI y Sac I en esta porción para preparar el plásmido pBIGMP (Fig. 9) en el cual el gen se unía aguas abajo del promotor de 35S.

El plásmido pBIGMP se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml de kanamicina, seguido de la selección de los transformantes deseados para aislar la cepa de *Agrobacterium* que portaba pBIGMP.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con la cepa de *Agrobacterium* y, de la misma manera que en el Ejemplo 5, se obtuvo tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba PPO de soja variante.

Ejemplo 14

Confirmación de la Resistencia a los Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta un Gen Introducido que Codifica PPO de Soja Variante

El nivel de resistencia a un compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8 se confirmó cuantitativamente sometiendo a ensayo el tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba PPO de soja variante preparado en el Ejemplo 13 de la misma manera que en el Ejemplo 6. Los resultados obtenidos de 4 clones (GMP 1-4) de tabaco en los que se había introducido el gen que codificaba PPO de soja variante y tabaco recombinante de control se muestran en la Tabla 8. En la tabla, el nivel de resistencia al compuesto herbicida se representa mediante el porcentaje del contenido de clorofila total de trozos de hoja tratados con el compuesto herbicida con respecto al de los trozos de hoja no tratados.

TABLA 8

Tabaco recombinante	Contenido total de clorofila (mg/g peso fresco)		Nivel de resistencia al compuesto de ensayo (%)
	hoja no tratada	hoja tratada	
control	3,49	0,35	10,0
GMP-1	1,89	2,55	135
GMP-2	0,89	0,96	108
GMP-3	1,50	1,49	99,3
GMP-4	2,91	2,34	80,4

Ejemplo 15

Aislamiento del Gen PPO de Chlamydomonas

Se obtuvo la cepa CC407 de *Chlamydomonas reinhardtii* de Chlamydomonas Genetics Center (dirección: DCMB Group, Department of Botany, Box 91000, Duke University, Durham, NC 27708-1000, USA), se cultivó en 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz activa para fotosíntesis durante 5 días en medio de cultivo líquido TAP (E. H. Harris, The Chlamydomonas Sourcebook, Academic Press, San Diego, 1989, p 576-577) que contenía NH_4Cl 7 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,34 mM, fosfato de potasio 25 mM, Tris 0,5 mM (pH 7,5), 1 ml/litro de elemento mineral Hatner y 1 ml/litro de ácido acético glacial para obtener 200 ml ($1,0 \times 10^6$ células/ml) de medio de cultivo líquido que contenía células en una fase de crecimiento estacionaria temprana.

Se prepararon ARN totales a partir de estas células utilizando ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) de acuerdo con el manual adjunto. Asimismo, se fraccionó ARN poli(A) utilizando el Kit de Purificación de ARNm BioMag (fabricado por Perceptive Bio System) de acuerdo con el manual adjunto. Se sintetizó ADNc a partir del ARN poli(A) utilizando el Kit de Amplificación de ADNc Marathon (fabricado por Clontech) de acuerdo con el manual adjunto y se utilizó el ADNc como molde para la PCR.

En cuanto a los cebadores de la PCR, se prepararon un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 15 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 16. Los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; cartucho OPC).

ES 2 319 346 T3

Se llevó a cabo la PCR preparando un líquido de reacción utilizando el kit para PCR de ADNc Advantage (fabricado por Clontech) de acuerdo con el manual adjunto, y después, tras mantener a 94°C durante 1 minuto y luego a 65°C durante 5 minutos, repitiendo un ciclo de mantenimiento a 94°C durante 15 segundos y a 65°C durante 5 minutos 29 veces. Después de la PCR, se purificaron los fragmentos de ADN amplificados filtrando el líquido de reacción con
5 MicroSpin S-400HR (fabricado por Pharmacia Biotech), y se clonó el fragmento de ADN en el plásmido pCR2.1 utilizando el Kit de Clonación TA (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el manual adjunto para construir el plásmido pCPPO.

Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN contenido en el plásmido pCPPO resultante
10 utilizando el kit de secuenciación Dye Terminator (fabricado por PE applied Biosystems) y el secuenciador de ADN 373S (fabricado por PE applied Biosystems). Como resultado, se reveló la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 17, confirmando de ese modo que el plásmido pCPPO contenía el ADNc de PPO completo de *Chlamydomonas reinhardtii*.

15 Ejemplo 16

Aislamiento del Gen que Codifica la Proteína variante de PPO de Chlamydomonas reinhardtii que no tiene capacidad de Oxidar el Protoporfirinógeno IX y con Afinidad Específica por el Protoporfirinógeno IX
20

Se llevó a cabo la PCR utilizando el plásmido cCPPO preparado en el Ejemplo 15 como molde, y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 19 y un oligonucleótido compuesto por el nucleótido del SEQ ID NO: 20 como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que codifica PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* cuya señal de tránsito a cloroplastos y secuencia de unión a FAD habían sido suprimidas (referido en adelante como PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante). Los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador de
25 ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo repitiendo un ciclo para mantener a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 2 minutos y después a 72°C durante 3 minutos 30 veces. El fragmento de PCR amplificado se digirió con las enzimas de restricción BamHI y SacI, y se insertó entre el sitio de restricción BamHI y el sitio de restricción SacI del plásmido pTV119N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pTVCRP (Fig. 10).

Se introdujo el plásmido pTVCRP en la cepa BT3 mutante carente del gen PPO de *E. coli* de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Cuando se cultivó la *E. coli* resultante en medio
35 YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de kanamicina, no se obtuvo ningún clon con crecimiento complementado.

40 Ejemplo 17

Ensayo de PPO de Chlamydomonas reinhardtii Modificada Variante en busca de la Capacidad para Proporcionar Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se introdujeron los plásmidos pTVCRP y pTV118N preparados en el Ejemplo 16 en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Los plásmidos que portaban la cepa BT3/pACYCSP+pTVCRP de *E. coli*, pACYCSP y pTVCRP, y los plásmidos que portaban la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli*, pACYCSP y pTV118N se obtuvieron
50 cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió
55 la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio que no contenía compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

60

65

TABLA 9

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTVCRP	en luz	0,23	0,42	1,0
BT3/pACYCSP+pTVCRP	en oscuridad	0,81	0,82	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,12	0,24	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,80	0,91	1,0

Ejemplo 18

Introducción del Gen que Codifica PPO de Chlamydomonas reinhardtii Variante en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante en una planta mediante el método de infección con *Agrobacterium*. El fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante se preparó digiriendo el plásmido pTVCRP preparado en el Ejemplo 16 con las enzimas de restricción BamHI y SacI. Se digirió el vector binario pBI121 (fabricado por Clontech) con las enzimas de restricción BamHI y SacI para separar el gen de la β -glucuronidasa y el gen anterior que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante se insertó en esta porción para preparar el plásmido pBICRP (fig. 11).

Se introdujo el plásmido pBICRP en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, seguido de la selección de los transformantes deseados para aislar la cepa de *Agrobacterium* que portaba pBICRP.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con la cepa de *Agrobacterium* y, de la misma manera que en el Ejemplo 5, se obtuvo tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante.

Ejemplo 19

Confirmación de la Resistencia a Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta el Gen Introducido que Codifica la PPO de Chlamydomonas reinhardtii Variante

Se confirmó cuantitativamente el nivel de resistencia al compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8 sometiendo a ensayo el tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante preparado en el Ejemplo 18 de la misma manera que en el Ejemplo 6. Los resultados obtenidos de 4 clones (CRP 1-4) de tabaco en los que se había introducido el gen que codificaba la PPO de *Chlamydomonas reinhardtii* variante y el tabaco recombinante de control se muestran en la Tabla 10. En la tabla, los niveles de resistencia al compuesto herbicida se representan por medio de los porcentajes del contenido total de clorofila de los trozos de hoja tratados con el compuesto herbicida con respecto a los trozos de hoja no tratados.

TABLA 10

Tabaco recombinante	Contenido total de clorofila (mg/g peso fresco)		Nivel de resistencia al compuesto de ensayo (%)
	hoja no tratada	hoja tratada	
control	2,28	0,42	18,4
CRP-1	1,27	1,54	121
CRP-2	1,50	1,67	111
CRP-3	1,10	1,11	101
CRP-4	1,58	1,57	99,4

Ejemplo 20

Ensayo de la Proteína Variante de Ferroquelatasa de Cebada que Tiene Afinidad por la Protoporfirina IX Específicamente en Busca de la Capacidad de Comunicar Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se preparó un plásmido que portaba el gen de la ferroquelatasa de cebada mediante el método descrito por Miyamoto, K. *et al.*, Plant Physiol. 105; pág. 769 (1994). El plásmido resultante se digirió con las enzimas de restricción NspI y EcoRI para obtener el fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la ferroquelatasa de cebada cuya secuencia señal había sido suprimida (referida en adelante como ferroquelatasa de cebada variante). Este fragmento de ADN se insertó entre el sitio de restricción SphI y el sitio de restricción EcoRI del plásmido pTV119N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pTVHVF1 (Fig. 12).

Los plásmidos pTVHVF1 y pTV118N se introdujeron en las cepas BT3/pACYCSP de *E. coli* preparadas en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Se obtuvieron el plásmido que portaba la cepa BT3/pACYCSP+pTVHVF1 de *E. coli*, pACYCSP y pTVHVF1, y el plásmido que portaba la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli*, pACYCSP y pTV118N cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTVHVF1	en luz	0,39	0,94	1,0
BT3/pACYCSP+pTVHVF1	en oscuridad	0,94	0,96	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,12	0,24	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,80	0,91	1,0

Ejemplo 21

Introducción del Gen que Codifica la Ferroquelatasa de Cebada Variante en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba la ferroquelatasa de cebada en tabaco por medio del método de infección con *Agrobacterium*. Se digirió el plásmido pTVHVF1 descrito en el Ejemplo 20 con la enzima de restricción Nco I volviendo después romos los extremos del ADN con ADN polimerasa I añadiendo nucleótidos al espacio del ADN de doble hebra. Luego, se desfosforiló el ADN con fosfatasa alcalina derivada de intestino de ternera y se cicló insertando el conector BamHI fosforilado (4610P, fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido. Después, se digirió pTVHVF2 con la enzima de restricción EcoRI volviendo después romos los extremos del ADN con ADN polimerasa I añadiendo nucleótidos al espacio de ADN de doble hebra. Adicionalmente, se desfosforiló el ADN con fosfatasa alcalina derivada de intestino de ternera y se cicló insertando el conector SalI fosforilado (4680P, fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pTVHVF3. El plásmido pBI121KS preparado en el Ejemplo 9 se digirió con las enzimas de restricción BamHI y SalI para separar el gen de la β -glucuronidasa. El fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la ferroquelatasa de cebada variante se preparó digiriendo el pTVHVF3 anterior con las enzimas de restricción BamHI y SalI. El fragmento de ADN resultante se insertó en el plásmido pBI121KS remplazando el gen de la β -glucuronidasa para preparar el plásmido pBIHVF (Fig. 13) en el que el gen de la cebada variante se unía aguas abajo del promotor de 35S.

Se introdujo el plásmido pBIHVF en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 μ g/ml de estreptomycin, 100 μ g/ml de rifampicina y 25 μ g/ml de kanamicina, seguido de selección de los transformantes deseados para aislar la cepa de *Agrobacterium* que portaba pBIHVF.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con dicha cepa de *Agrobacterium* y, de la misma manera que en el Ejemplo 5, se obtuvo tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba la ferroquelatasa de cebada variante.

Ejemplo 22

Confirmación de la Resistencia a Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta un Gen Introducido que Codifica la Ferroquelatasa de Cebada Variante

Se confirmó el nivel de resistencia al compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8 cuantitativamente sometiendo a ensayo el tabaco en el que se había introducido el gen que codificaba la ferroquelatasa de cebada variante preparada en el Ejemplo 21 de la misma manera que en el Ejemplo 6. Los resultados obtenidos de 4 clones (HVF 1-4) de tabaco con el gen que codifica la ferroquelatasa de cebada variante introducido y tabaco recombinante de control se muestran en la tabla 12. En la tabla, se representan los niveles de resistencia al compuesto herbicida por medio de porcentajes del contenido total de clorofila de los trozos de hoja tratados con compuesto herbicida con respecto a los trozos de las hojas no tratados.

TABLA 12

Tabaco recombinante	Contenido total de clorofila (mg/g peso fresco)		Nivel de Resistencia al compuesto de ensayo (%)
	hoja no tratada	hoja tratada	
control	1,93	0,160	8,29
HVF-1	0,876	0,930	106
HVF-2	1,14	1,16	102
HVF-3	1,06	1,04	98,1
HVF-4	1,48	1,42	95,9

Ejemplo 23

Ensayo de la Proteína Variante de Ferroquelatasa de Pepino que Tiene Afinidad Específica por la Protoporfirina IX en busca de la Capacidad para Comunicar Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se llevó a cabo la PCR utilizando un clon de ADNc de ferroquelatasa de pepino aislado mediante el método descrito por Miyamoto, K. *et al.*, Plant Physiol., 105; pág. 769 (1994) como molde, un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 21 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 22 como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que codificaba la ferroquelatasa de pepino cuya secuencia señal había sido suprimida (en adelante referida como ferroquelatasa de pepino variante). Los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo repitiendo un ciclo de mantenimiento a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 2 minutos y después a 72°C durante 3 minutos 30 veces. Los fragmentos de ADN amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y SacI, e insertados entre el sitio de restricción BamHI y el sitio de restricción SacI del plásmido pTV119N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pTVCSF (Fig. 14).

Se introdujeron los plásmidos pTVCSF y pTV118N en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). La cepa BT3/pACYCSP+ pTVCSF de *E. coli* que porta el plásmido pACYCSP y pTVCSF, y la cepa BT3/pACYCSP+ pTV118N de *E. coli* que porta el plásmido pACYCSP y pTV118N fueron obtenidas cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* fueron inoculadas en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 de µg/ml kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, cultivadas en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin el compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pTVCSF	en luz	0,73	0,78	1,0
BT3/pACYCSP+pTVCSF	en oscuridad	0,89	0,92	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,06	0,08	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,81	0,91	1,0

Ejemplo 24

Introducción del Gen que Codifica la Ferroquelatasa de Pepino Variante en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba la ferroquelatasa de pepino modificada en tabaco por medio del método de infección con *Agrobacterium*. Se digirió el plásmido pBI121 (fabricado por Clontech) con las enzimas de restricción BamHI y SacI para separar el gen de la β -glucuronidasa. Se preparó un fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la ferroquelatasa de pepino variante digiriendo el plásmido pTVCSF descrito en el Ejemplo 23 con las enzimas de restricción BamHI y SacI. El fragmento de ADN resultante se introdujo en el plásmido pBI121 reemplazando el gen de la β -glucuronidasa para preparar el plásmido pBICSF (Fig. 15) en el que el gen de la ferroquelatasa de pepino variante se unía aguas abajo del promotor de 35S.

El plásmido pBICSF se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 μ g/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de rifampicina y 25 μ g/ml de kanamicina, seguido de selección de los transformantes deseados para aislar la cepa de *Agrobacterium* que portaba la cepa pBICSF.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con dicha cepa de *Agrobacterium* para obtener tabaco con el gen que codifica la ferroquelatasa de pepino variante introducido de la misma manera que en el Ejemplo 5.

Ejemplo 25

Confirmación de la Resistencia a Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta el Gen que Codifica la Ferroquelatasa de Pepino Variante Introducido

Se confirma el nivel de resistencia a los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de PPO cuantitativamente sometiendo a ensayo el tabaco con el gen que codifica la ferroquelatasa de pepino variante introducido preparado en el Ejemplo 24 de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 26

Aislamiento del Gen de la Coproporfirinógeno III Oxidasa (hemF) de E. coli

Se preparó ADN genómico a partir de la cepa LE392 de *E. coli* utilizando el Kit ISOPLANT para la preparación de ADN del genoma (fabricado por Nippon Gene). Se sintetizaron un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 23 y un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 24 de acuerdo con las secuencias de nucleótidos de sus regiones 5' y 3' del gen hemF de *E. coli* registradas en GenBank (Acceso X75413). Los oligonucleótidos fueron preparados con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo utilizando aproximadamente 1 μ g de ADN genómico de la cepa LE392 de *E. coli* como molde y los oligonucleótidos anteriores (10 pmoles de cada

ES 2 319 346 T3

uno) como cebadores para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen *hemF* de *E. coli*. Se llevó a cabo la PCR repitiendo un ciclo para mantener a 96°C durante 1 minuto, a 55°C durante 2 minutos y después a 72°C durante 3 minutos 30 veces.

Ejemplo 27

Ensayo de la Proteína hemF de E. coli en busca de su Capacidad para Comunicar Resistencia a Compuestos Herbicidas

Se digirió el fragmento de ADN que contenía el gen *hemF* amplificado mediante el método descrito en el Ejemplo 26 con las enzimas de restricción *FbaI* y *PstI*, y se insertó entre el sitio de restricción *BamHI* y el sitio de restricción *PstI* del plásmido asequible comercialmente pUC118N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pHEMF (Fig. 16).

Se introdujeron los plásmidos pHEMF y pTV118N en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). Se obtuvieron la cepa BT3/pACYCSP+ pHEMF de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pHEMF, y la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pTV118N cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 10 o 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin el compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

TABLA 14

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa		
		Concentración de compuesto de ensayo		
		10 ppm	1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pHEMF	en luz	0,48	1,0	1,0
BT3/pACYCSP+pHEMF	en oscuridad	0,94	0,95	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,06	0,16	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,96	0,98	1,0

Ejemplo 28

Introducción del gen hemF de E. coli en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen *hemF* de *E. coli* en una planta mediante el método de infección con *Agrobacterium*. Primero, para obtener el gen *hemF* de *E. coli*, se sintetizaron un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 25 y un cebador oligonucleotídico compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 26 con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). La PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores oligonucleotídicos de la misma manera que en el Ejemplo 26 para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen *hemF* de *E. coli*.

El plásmido pBI121 (fabricado por Clontech) fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI* para separar el gen de la β-glucuronidasa. El fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba el gen *hemF* de *E. coli* se preparó mediante digestión del fragmento de ADN amplificado por PCR anterior con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI*. El fragmento de ADN resultante se introdujo en el plásmido pBI121 reemplazando el gen de la β-

glucuronidasa para preparar el plásmido pBIHEMF (Fig. 17) en el que el gen hemF de *E. coli* se unía aguas abajo del promotor de 35S.

Se introdujo el plásmido pBIHEMF en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml de kanamicina, seguido de selección de los transformantes deseados para aislar la cepa de *Agrobacterium* que portaba pBIHEMF.

Se infectaron trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con la cepa de *Agrobacterium* para obtener tabaco con el gen hemF de *E. coli* introducido de la misma manera que en el Ejemplo 5.

Ejemplo 29

Confirmación de la Resistencia a Compuestos Herbicidas del Tabaco con el Gen hemF de E. coli Introducido

El nivel de resistencia a los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de PPO se confirma cuantitativamente sometiendo a ensayo el tabaco con el gen hemF de *E. coli* introducido (preparado en el Ejemplo 28) de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 30

Ensayo de Unión del Compuesto de Porphirina-Proteína de Unión a la Protoporfirina IX

Se prepararon una colección de fagos que presentaban una proteína que contenía una secuencia de aminoácidos compuesta por 5 aminoácidos al azar y un clon de fago que presentaba una proteína que contenía una secuencia de aminoácidos HASYS o RASSL (donde H es histidina, A es alanina, S es serina, Y es tirosina, R es arginina y L es leucina) que se puede unir específicamente al compuesto de porfirina 5,10,15,20-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il)-21H,23H-porfina (H_2TMpyP) de acuerdo con el método descrito por KITANO *et al.*, Nihon Kagakukai (Sociedad Química Japonesa) 74º Encuentro Anual de Primavera Resúmenes Pre-Publicados de Presentación II, pág. 1353, 4G511 (1998).

Primero, se construyó la colección de fagos que presentaban una proteína que contenía una secuencia de aminoácidos compuesta por 5 aminoácidos al azar.

Se sintetizaron los oligonucleótidos mezclados compuestos por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 27 y los oligonucleótidos mezclados compuestos por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 28. Los oligonucleótidos mezclados se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). Los oligonucleótidos mezclados anteriores (50 pmoles cada uno) se fosforilaron en el extremo 5' tratando con ADN quinasa de T4 respectivamente. Se mezclaron y, después de calentar a 70°C durante 10 minutos, se sometieron a hibridación enfriando lentamente a la temperatura ambiente a una velocidad de 0,5°C/minuto. Se digirió el plásmido pCANTAB5E (fabricado por Pharmacia Biotech) con las enzimas de restricción SfiI y NotI para separar el ScFv del gen del anticuerpo recombinante. El par anterior de oligonucleótidos fosforilados e hibridados se insertó en la porción del ScFv del gen del anticuerpo recombinante anterior para preparar un plásmido que contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba una proteína compuesta por una secuencia de 5 aminoácidos al azar aguas arriba de una proteína que comprendía una secuencia de aminoácidos de la proteína de la envoltura del fago M13. El plásmido se introdujo en la cepa TG-1 de *E. coli* de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D.J., Mol. Biol. 166; pág. 557 (1983) y se cultivó en 2 x medio YT (10 g/litro de extracto de levadura, 15 g/litro de triptona y 5 g/litro de NaCl, pH 7,2) que contenía 100 µg/ml de ampicilina para obtener una cepa TG-1 de *E. coli* recombinante. La cepa TG-1 de *E. coli* recombinante se inoculó en medio 2 x YT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se cultivó con sacudimiento a 37°C. Después, al cabo de 1 hora de inicio del cultivo, se inocularon 6×10^{10} ufp de fago coadyuvante M13K07 (fabricado por Pharmacia Biotech) en el medio, y el cultivo continuó durante 18 horas más con sacudimiento. Luego, se centrifugó el medio de cultivo líquido a 1.000 x g durante 20 minutos para recoger la colección de fagos que presentaban una proteína que contenía la secuencia de aminoácidos compuesta por 5 aminoácidos al azar.

Para preparar el clon del fago que presentaba una proteína que contenía la secuencia de aminoácidos HASYS (SEQ ID NO: 53), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 29 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 30. Y, para preparar el clon del fago que presentaba una proteína que contenía la secuencia de aminoácidos RASSL (SEQ ID No: 55), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 31 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 32. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). El clon del fago que presentaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos HASYS o RASSL se obtuvo por medio de la misma operación que antes para obtener la colección de fagos que presentaban una proteína que contenía la secuencia de aminoácidos compuesta por 5 aminoácidos al azar.

Se aplicó una suspensión de fagos que contenía el clon del fago que presentaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos HASYS, el clon del fago que presentaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos RASSL o la colección de fagos que presentaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos que consistía en 5 aminoácidos al azar (título 10^5 ufp) respectivamente en un filtro de nitrocelulosa (fabricado por Schleicher y Schuell), y después se bloqueó el filtro de nitrocelulosa sacudiéndolo en tampón PBT (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8,10 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) que contenía seralbúmina bovina al 1%. El filtro de nitrocelulosa se lavó con tampón PBT y se sacudió durante 18 horas en 2 x tampón SSC (NaCl 0,3 M, sal sódica de ácido cítrico 0,03M) que contenía protoporfirina IX $10 \mu\text{M}$.

Adicionalmente, dicho filtro de nitrocelulosa se lavó con 2 x tampón SSC, se secó, y se detectó la fluorescencia derivada de la protoporfirina IX en luz ultravioleta (365 nm).

Las aplicaciones de la colección de fagos no mostraron fluorescencia, mientras las aplicaciones de los clones que presentaban la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos HASYS y la que contenía la secuencia de aminoácidos RASSL mostraban una clara fluorescencia.

Ejemplo 31

20 *Ensayo de la Proteína de Unión a Protoporfirina IX en busca de la Capacidad para Comunicar Resistencia a los Compuestos Herbicidas*

Primero, se preparó un plásmido que podía expresar el gen que codificaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos HASYS (SEQ ID NO: 53), o la secuencia de aminoácidos RASSL (SEQ ID NO: 55). Para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 54 (en adelante referida como proteína MGHASYS), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 33 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 34. Los oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). Los oligonucleótidos anteriores (50 pmoles cada uno) se fosforilaron en el extremo 5' mediante tratamiento con ADN quinasa de T4, respectivamente. Se mezclaron, y después, tras calentar durante 10 minutos a 70°C , se sometieron a hibridación enfriando lentamente a la temperatura ambiente a una velocidad de $0,5^\circ\text{C}/\text{minuto}$. El plásmido pTV118N se digirió con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI para separar el fragmento del gen que consistía en 16 pares de bases. El plásmido pHASYS capaz de expresar el gen que codifica la proteína MGHASYS se preparó insertando los pares de oligonucleótidos fosforilados e hibridados en la posición de los 16 pares de bases anteriores.

Después, para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 56 (en adelante referida como MGRASSL), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 35 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 36. Los oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). Se preparó el plásmido pRASSL capaz de expresar el gen que codificaba la proteína MGRASSL mediante el mismo procedimiento que para el plásmido pHASYS.

Se preparó un plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína que contenía la secuencia de aminoácidos YAGY o YAGF (donde Y es tirosina, A es alanina, G es glicina, F es fenilalanina) (Sugimoto, N., Nakano, S., Chem. Lett. pág. 939, 1997) capaz de unirse al compuesto de porfirina H_2TMPyP . Para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína que consistía en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 58 (en adelante referida como proteína MGYAGY), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 37 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 38. Para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 60 (en adelante referida como proteína MGYAGF), también se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 39 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 40. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). El plásmido pYAGY capaz de expresar el gen que codifica la proteína MGYAGY y el plásmido pYAGF capaz de expresar la proteína MGYAGF se prepararon mediante el mismo procedimiento que para el plásmido pHASYS.

Los plásmidos pHASYS, pRASSL, pYAGY, pYAGF y pTV118N anteriores se introdujeron en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli* preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166; p 557 (1983). La cepa BT3/pACYCSP+pHASYS de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pHASYS, la cepa BT3/pACYCSP+pRASSL de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pRASSL; la cepa BT3/pACYCSP+pYAGY de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pYAGY, la cepa BT3/pACYCSP+pYAGF de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pYAGF y la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pTV118N se obtuvieron cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina, $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ de cloramfenicol y $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina.

ES 2 319 346 T3

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio sin el compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

TABLA 15

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa	
		Concentración de compuesto de ensayo	
		1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pHASYS	en luz	0,65	1,0
BT3/pACYCSP+pHASYS	en oscuridad	0,96	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL	en luz	0,59	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL	en oscuridad	1,0	1,0
BT3/pACYCSP+pYAGY	en luz	0,48	1,0
BT3/pACYCSP+pYAGY	en oscuridad	0,99	1,0
BT3/pACYCSP+pYAGF	en luz	0,62	1,0
BT3/pACYCSP+pYAGF	en oscuridad	0,96	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118 N	en luz	0,07	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118 N	en oscuridad	0,93	1,0

Adicionalmente, se preparó un plásmido capaz de expresar un gen que codificaba una proteína que contenía una secuencia de aminoácidos en la que una unidad de las secuencias de aminoácidos se unía repetidamente. Para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 61 (en adelante referida como proteína MG(HASYS)₄, (HASYS)_n referida como secuencia en la cual el péptido HASYS se unía repetidamente entre sí n veces), se sintetizó un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho de purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). Primero, el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 42 y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 43 se fosforilaron respectivamente en el extremo 5' mediante tratamiento con ADN quinasa de T4. Después de eso, el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 41 y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 42 o el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 43 y el oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 44 se mezclaron (300 pmoles cada uno), y después de calentar durante 5 minutos a 70°C, se hibridaron enfriando lentamente a la temperatura ambiente a una velocidad de 0,5°C/minuto. Los pares de oligonucleótidos hibridados se mezclaron y se ligaron con ADN ligasa de T4, luego el fragmento de ADN resultante se fosforiló con ADN quinasa de T4 en el extremo 5'. Por otra parte, se digirió el vector pTV118N con las

ES 2 319 346 T3

enzimas de restricción NcoI y EcoRI para separar un fragmento de ADN de 16 pares de bases y se insertó el fragmento de ADN fosforilado anterior en esta porción para obtener el plásmido pHASYS4 que expresaba el gen que codificaba la proteína MG(HASYS)₄.

5 Adicionalmente, para preparar el plásmido capaz de expresar el gen que codifica la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 62 (en adelante referida como proteína MG(HASYS)₈), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 45 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 46. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC). Primero, se fosforilaron los oligonucleótidos anteriores en el extremo 5' mediante tratamiento con ADN quinasa de T4. Después de eso, se mezclaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 41 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 42 (300 pmoles cada uno), se mezclaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 43 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 44 (300 pmoles cada uno), y adicionalmente, se mezclaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 45 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos fosforilada del SEQ ID NO: 46 (600 pmoles cada uno). Estas tres mezclas se calentaron durante 5 minutos a 70°C, y se hibridaron lentamente a la temperatura ambiente a una velocidad de 0,5°C/minuto, respectivamente. Los tres pares de nucleótidos hibridados anteriores se mezclaron, y se ligaron con ADN ligasa de T4, y después el fragmento resultante se fosforiló con ADN quinasa de T4 en el extremo 5'. Se preparó el plásmido pHASYS8 capaz de expresar la proteína MG(HASYS)₈ de la misma manera que para el plásmido pHASYS4 anterior.

Después, para preparar un plásmido capaz de expresar el gen que codifica la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 63 (en adelante referida como proteína MG(RASSL)₄, (RASSL)_n referida como secuencia en la que el péptido RASSL se unía repetidamente entre sí n veces), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50. Asimismo, para preparar un plásmido capaz de expresar el gen que codificaba la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64 (en adelante referida como proteína MG(RASSL)₈), se sintetizaron un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 51 y un oligonucleótido compuesto por la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 52. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con un sintetizador de ADN (PE Applied Biosystems; Sintetizador de ADN/ARN Modelo 394) y se purificaron con un cartucho para la purificación de oligonucleótidos (PE Applied Biosystems; Cartucho OPC).

Se preparó un plásmido pRASSL4 capaz de expresar la proteína MG(RASSL)₄ de la misma manera que para el plásmido pHASYS4 anterior. También se preparó el plásmido pRASSL8 capaz de expresar la proteína MG(RASSL)₈ de la misma manera que para el plásmido pHASYS8 anterior.

Los plásmidos pHASYS4, pHASYS8, pRASSL4, pRASSL8 y pTV118N anteriores se introdujeron en la cepa BT3/pACYCSP de *E. coli*. preparada en el Ejemplo 3 respectivamente de acuerdo con el método descrito por Hahnahan, D. J., Mol. Biol., 166; pág. 557 (1983). La cepa BT3/pACYCSP+pHASYS4 de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pHASYS4, la cepa BT3/pACYCSP+pHASYS8 de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pHASYS8, la cepa BT3/pACYCSP+pRASSL4 de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pRASSL4, la cepa HT3/pACYCSP+pRASSL8 de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pRASSL8 y la cepa BT3/pACYCSP+pTV118N de *E. coli* que portaba el plásmido pACYCSP y pTV118N se obtuvieron cultivando las cepas anteriores en medio YPT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol y 10 µg/ml de kanamicina.

Estas cepas de *E. coli* se inocularon en medio YPT que contenía 1 ppm del compuesto herbicida de tipo inhibidor de PPO representado por la Estructura 8, 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de cloramfenicol, 10 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de hemina y 50 µg/ml de ácido aminolevulínico, se cultivaron en condiciones de oscuridad o en condiciones de luz de la misma manera que en el Ejemplo 2. Después, a las 18 horas del inicio del cultivo, se midió la absorbancia del medio de cultivo líquido a 600 nm. Tomando la absorbancia del medio de cultivo sin compuesto herbicida como 1, se calculó el valor relativo de la absorbancia del medio de cultivo que contenía el compuesto herbicida. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

TABLA 16

Cepa de <i>E. coli</i>	Condiciones de cultivo	Absorbancia relativa	
		Concentración de compuesto de ensayo	
		1 ppm	0 ppm
BT3/pACYCSP+pHASYS4	en luz	0,91	1,0
BT3/pACYCSP+pHASYS4	en oscuridad	1,0	1,0
BT3/pACYCSP+pHASYS8	en luz	0,57	1,0
BT3/pACYCSP+pHASYS8	en oscuridad	1,0	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL4	en luz	1,1	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL4	en oscuridad	0,98	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL8	en luz	0,79	1,0
BT3/pACYCSP+pRASSL8	en oscuridad	1,0	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en luz	0,15	1,0
BT3/pACYCSP+pTV118N	en oscuridad	0,81	1,0

Ejemplo 32

Introducción del Gen que Codifica el Péptido de Unión a Protoporfirina IX en Tabaco

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba el péptido de unión a protoporfirina IX en tabaco mediante el método del *Agrobacterium*. Se digirió el plásmido pHASYS8 preparado en el Ejemplo 31 con la enzima de restricción NcoI volviendo después romos los extremos del ADN con la ADN polimerasa I con adición de nucleótidos al espacio de ADN de doble hebra. Luego, se desfosforiló el ADN con fosfatasa alcalina derivada de intestino de ternera y se cicló insertando el conector BamHI fosforilado (4610P, fabricado por Takara Syuzo Co., Ltd.) para construir el plásmido pHASYS8B. Se digirió el plásmido pBI121 (fabricado por Clontech) con las enzimas de restricción BamHI y SacI para separar el gen de la β -glucuronidasa. Por otra parte, se digirió el plásmido pHASYS8B con las enzimas de restricción BamHI y SacI para preparar el fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la proteína MG(HASYS)₈, se insertó el fragmento de ADN resultante en el plásmido pBI121 reemplazando el gen de la β -glucuronidasa para preparar el plásmido pBIHMY8 (Fig. 18) en el que el gen que codificaba la proteína de unión a protoporfirina IX MG(HASYS)₈ se unía aguas abajo del promotor de 35S.

Se construyó un plásmido para introducir el gen que codificaba el péptido de unión a protoporfirina IX MG (RASSL)₈ en una planta mediante el método de infección con *Agrobacterium*. Se preparó el plásmido pBIRASSL8 (Fig. 19) en el cual el gen que codificaba la proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₈ se unía aguas abajo del promotor de 35S a partir de pRASSL8 de acuerdo con el mismo procedimiento que para pBIHASYS8.

Se introdujeron el plásmido pBIHASYS8 y pBIRASSL8 anteriores en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 respectivamente. Los transformantes resultantes se cultivaron en un medio que contenía 300 μ g/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de rifampicina y 25 μ g/ml de kanamicina, seguido de la selección de los transformantes deseados para aislar cepas de *Agrobacterium* que portaban pBIHASYS8 y pBIRASSL8, respectivamente.

Se infectan trozos de hoja de tabaco cultivado en condiciones estériles con dichas cepas de *Agrobacterium* para obtener tabaco con el gen que codifica la proteína de unión a protoporfirina IX MG(HASYS)₈ introducido, y tabaco

ES 2 319 346 T3

con el gen que codifica la proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₈ introducido de la misma manera que en el Ejemplo 5.

5 Ejemplo 33

Confirmación de la Resistencia a Compuestos Herbicidas de Tabaco que Porta el Gen que Codifica el Péptido de Unión a Protoporfirina IX Introducido

10 Se confirma cuantitativamente el nivel de resistencia a compuestos herbicidas sometiendo a ensayo el tabaco con el gen que codifica el péptido de unión a protoporfirina IX introducido preparado en el Ejemplo 32 de la misma manera que en el Ejemplo 14.

15 Como se ha descrito antes, de acuerdo con la presente invención, se pueden producir plantas resistentes a compuestos para el control de las malas hierbas.

Texto libre de la lista de secuencias

20 SEQ ID NO: 1

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH

25 SEQ ID NO: 2

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH

30 SEQ ID NO: 3

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de soja

35 SEQ ID NO: 4

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de soja

40 SEQ ID NO: 7

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH

45 SEQ ID NO: 8

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH

50 SEQ ID NO: 9

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ch1H de tabaco

55 SEQ ID NO: 10

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ch1H de tabaco

60 SEQ ID NO: 11

65 Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja

ES 2 319 346 T3

SEQ ID NO: 12

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja

SEQ ID NO: 13

Oligonucleótido diseñado para amplificar Fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja

SEQ ID NO: 14

Oligonucleótido diseñado para amplificar Fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja

SEQ ID NO: 15

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de *Chlamydomonas*

SEQ ID NO: 16

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de *Chlamydomonas*

SEQ ID NO: 19

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de *Chlamydomonas*

SEQ ID NO: 20

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de *Chlamydomonas*

SEQ ID NO: 21

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen de la ferroquelatasa de pepino

SEQ ID NO: 22

Oligonucleótido diseñado para amplificar un fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen de la ferroquelatasa de pepino

SEQ ID NO: 23

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de *Escherichia coli*

SEQ ID NO: 24

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de *Escherichia coli*

SEQ ID NO: 25

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de *Escherichia coli*

SEQ ID NO: 26

Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de *Escherichia coli*

ES 2 319 346 T3

SEQ ID NO: 27

Oligonucleótidos diseñados para sintetizar genes que codifican péptidos al azar que comprenden 5 aminoácidos

5

SEQ ID NO: 28

Oligonucleótidos diseñados para sintetizar genes que codifican péptidos al azar que comprenden 5 aminoácidos

10

SEQ ID NO: 29

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido HASYS

15

SEQ ID NO: 30

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido HASYS

20

SEQ ID NO: 31

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido RASSL

25

SEQ ID NO: 32

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido RASSL

30

SEQ ID NO: 33

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGHASYS

35

SEQ ID NO: 34

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGHASYS

40

SEQ ID NO: 35

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGRASSL

45

SEQ ID NO: 36

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGRASSL

50

SEQ ID NO: 37

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGY

55

SEQ ID NO: 38

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGY

60

SEQ ID NO: 39

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGF

65

SEQ ID NO: 40

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGF

ES 2 319 346 T3

SEQ ID NO: 41

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4

5

SEQ ID NO: 42

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4

10

SEQ ID NO: 43

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4

15

SEQ ID NO: 44

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4

20

SEQ ID NO: 45

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)8

25

SEQ ID NO: 46

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)8

30

SEQ ID NO: 47

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4

35

SEQ ID NO: 48

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4

40

SEQ ID NO: 49

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4

45

SEQ ID NO: 50

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4

50

SEQ ID NO: 51

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)8

55

SEQ ID NO: 52

Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)8

60

SEQ ID NO: 53

Proteína de unión a protoporfirina IX HASYS

65

SEQ ID NO: 54

Proteína de unión a protoporfirina IX MGHASYS

ES 2 319 346 T3

SEQ ID NO: 55

Proteína de unión a protoporfirina IX RASSL

5

SEQ ID NO: 56

Proteína de unión a protoporfirina IX MGRASSL

10

SEQ ID NO: 57

Proteína de unión a H₂TMpyP YAGY

15

SEQ ID NO: 58

Proteína de unión a H₂TMpyP MGYAGY

20

SEQ ID NO: 59

Proteína de unión a H₂TMpyP YAGF

25

SEQ ID NO: 60

Proteína de unión a H₂TMpyP MGYAGF

30

SEQ ID NO: 61

Proteína de unión a protoporfirina IX MG(HASYS)₄

35

SEQ ID NO: 62

Proteína de unión a protoporfirina IX MG(HASYS)₈

40

SEQ ID NO: 63

Proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₄

45

SEQ ID NO: 64

Proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₈

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para elaborar plantas resistentes a compuestos para el control de las malas hierbas que comprende las etapas de

- (a) introducir en una célula vegetal un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en:
magnesio quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX;
ferroquelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX; cobalto quelatasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por la protoporfirina IX,
un péptido que tiene afinidad por la protoporfirina IX, compuesto por 6 a 100 aminoácidos, estando dicho péptido esencialmente libre de regiones marco de regiones variables de una inmunoglobulina;
protoporfirinógeno IX oxidasa de tipo inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX; y
coproporfirinógeno III oxidasa de tipo activo o inactivo que tiene afinidad por el protoporfirinógeno IX,
no teniendo esencialmente dichas proteínas capacidad de modificar el protoporfirinógeno IX; y
(b) expresar el gen.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto para el control de las malas hierbas está inhibiendo la biosíntesis de porfirina de una planta.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto para el control de las malas hierbas es un compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es la magnesio quelatasa o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por la protoporfirina IX.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es una proteína de la subunidad de unión a protoporfirina IX de la magnesio quelatasa, o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por la protoporfirina IX.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la magnesio quelatasa deriva de un microorganismo fotosintético o una planta.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la magnesio quelatasa deriva de tabaco.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es una variante de la protoporfirinógeno IX oxidasa que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene una afinidad específica por el protoporfirinógeno IX.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es una variante de la protoporfirinógeno IX oxidasa que no tiene capacidad para oxidar el protoporfirinógeno IX y que tiene afinidad específica por un compuesto herbicida de tipo inhibidor de la protoporfirinógeno IX oxidasa.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de una planta.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 8 a 10, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de soja.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de algas.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8, 9 o 12, donde la protoporfirinógeno IX oxidasa deriva de Chlamydomonas.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es ferroquelatasa o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por la protoporfirina IX.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 14, donde la ferroquelatasa deriva de una planta.

16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 14 o 15, donde la ferroquelatasa deriva de cebada o de pepino.

17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, o SEQ ID NO: 60.

18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o 17, donde el péptido comprende la repetición de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 53, 55, 57 o 59 cuatro veces u ocho veces.

19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína es la coproporfirinógeno III oxidasa o una variante de dicha proteína que tiene afinidad específica por el protoporfirinógeno IX.

20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 19, donde la coproporfirinógeno III oxidasa deriva de un microorganismo.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 19 o 20, donde la coproporfirinógeno III oxidasa deriva de *Escherichia coli*.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde el gen es introducido en la célula vegetal de forma que está ligado operablemente a un promotor y un terminador ambos los cuales son funcionales en la célula vegetal.

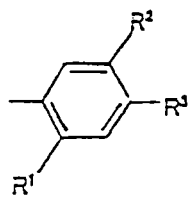
23. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto para el control de las malas hierbas está inhibiendo la transferencia de electrones en la fotosíntesis, la biosíntesis de carotenoides, la biosíntesis de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos o la biosíntesis de la pared celular, influyendo en la biosíntesis de proteínas, la biosíntesis de ácido nucleico o la división celular o teniendo una actividad antagonista de auxinas.

24. El método de la reivindicación 23, donde el compuesto para el control de las malas hierbas que inhibe la transferencia de electrones en la fotosíntesis es un compuesto que inhibe la transferencia de electrones del sistema fotoquímico I o II o inhibe la 4-hidroxifenilpiruvato-dioxigenasa (4-HPPD); el que inhibe la biosíntesis de carotenoides es un compuesto que inhibe la fitoeno-desaturasa (PDS); el que inhibe la biosíntesis de aminoácidos es un compuesto que inhibe la EPSPS, la acetolactato sintasa (ALS), la glutamina sintetasa (GS) o la dihidropteroato sintasa (DHP); el que inhibe la biosíntesis de lípidos es un compuesto que inhibe la acetil CoA carboxilasa (ACC); el que inhibe la biosíntesis de la pared celular es un compuesto que inhibe la biosíntesis de celulosa; el que influyen en la biosíntesis de proteínas, la biosíntesis de ácido nucleico o la división celular es un compuesto que inhibe la formación de microtúbulos; o el que tiene la actividad antagonista de auxinas es un compuesto que potencia la elongación y diferenciación celular.

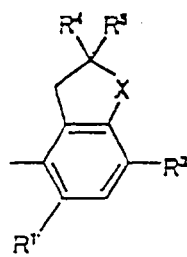
25. El método de la reivindicación 24, donde el compuesto que inhibe la transferencia de electrones en el sistema fotoquímico I es paraquat o diquat; el que inhibe la transferencia de electrones en el sistema fotoquímico II es un compuesto de triazina, un compuesto de urea o un compuesto de nitrilo; el que inhibe la 4-HPPD es un isoxazol, pirazol o tricetona; el que inhibe la PDS es norflurazon, flurocloridon, fluridona, flurtamona o diflufenican; el que inhibe la EPSPS es glifosato; el que inhibe la ALS es una sulfonilurea, imidazolinona, pirimidiniltiobenzoato o triazopirimidina; el que inhibe GS es bialafos o glufosinato; el que inhibe la DHP es asulam; el que inhibe ACC es una ciclohexanodiona o ariloxifenoxipropionato; o el que inhibe la celulosa es diclobenilo.

26. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde el compuesto para el control de las malas hierbas es un compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa seleccionado entre los compuestos (1) a (3) de más abajo:

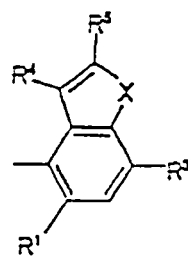
- (1) clormetoxinil, bifenox, clomitrofenol, acifluorfenol y su éster etílico, acifluorfenol-sodio, oxifluorfenol, oxadiazon, 2-[4-cloro-2-fluoro-5-(prop-2-inilo)fenil]-2, 3, 4, 5, 6, 7-hexahidro-1H-isoindol-1,3-diona, clorfalim, TNPP-etilo, o N3-(1-feniletil)-2,6-dimetil-5-propionilnicotinamida;
- (2) un compuesto representado por la fórmula general: J-G (I), donde G es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales G-1 a G-9 y J es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales J-1 a J-30:



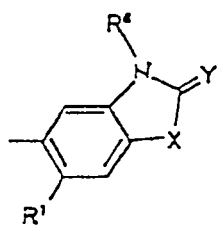
G-1



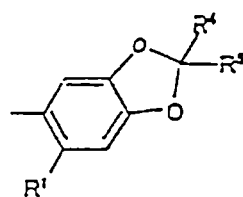
G-2



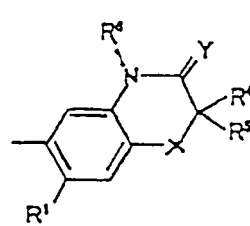
G-3



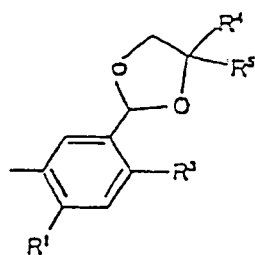
G-4



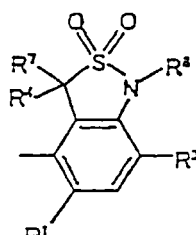
G-5



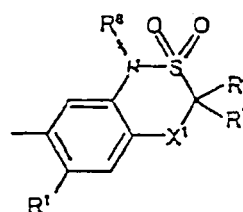
G-6



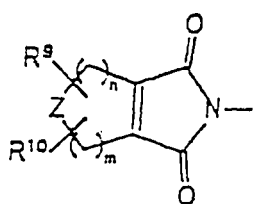
G-7



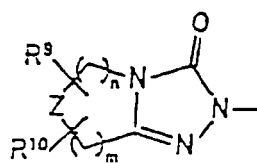
G-8



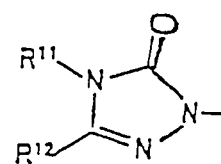
G-9



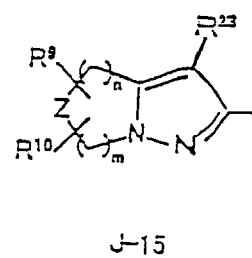
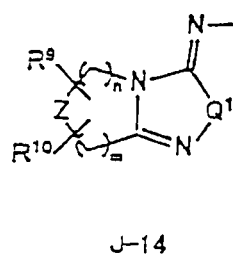
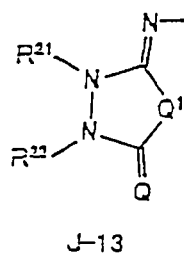
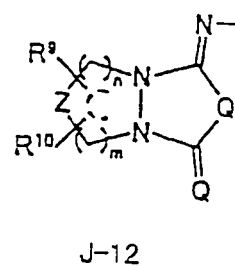
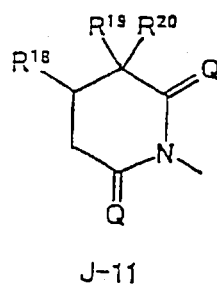
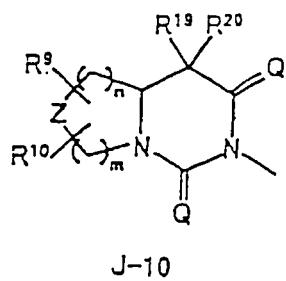
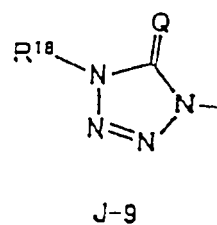
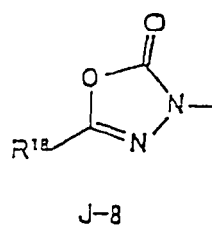
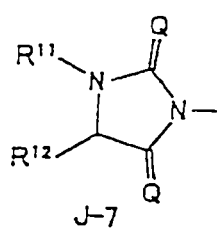
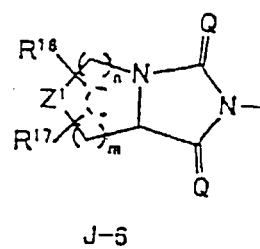
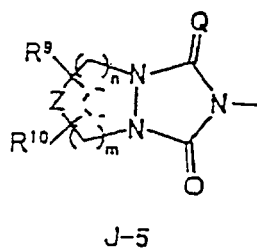
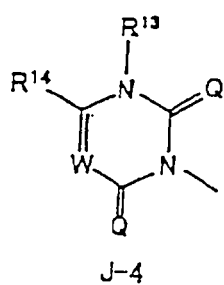
J-1

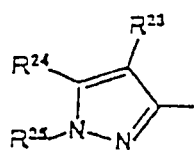


J-2

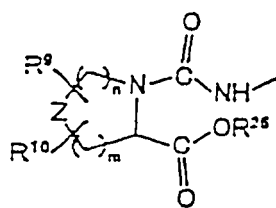


J-3

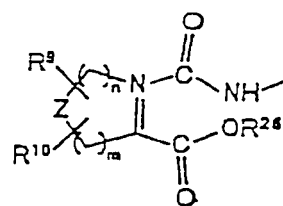




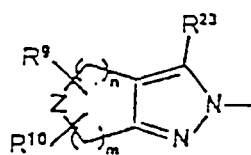
J-16



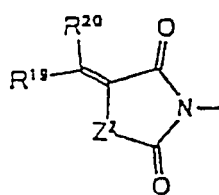
J-17



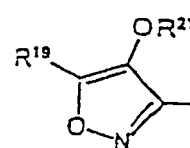
J-18



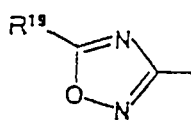
J-19



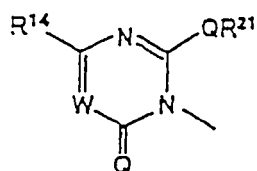
J-20



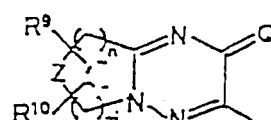
J-21



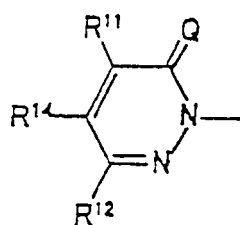
J-22



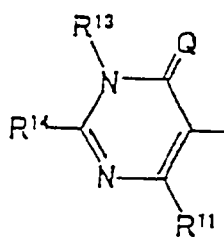
J-23



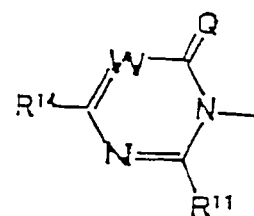
J-24



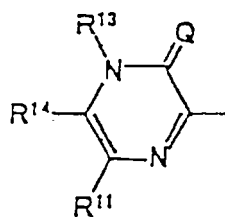
J-25



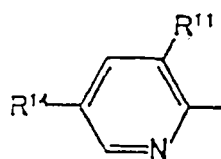
J-26



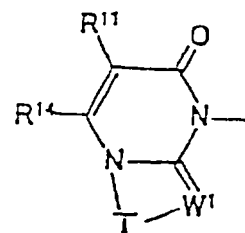
J-27



J-28



J-29



J-30

donde las líneas discontinuas en las fórmulas J-5, J-6, J-12 y J-24 significan que el anillo de la izquierda contiene solamente enlaces sencillos, o un enlace en el anillo de la derecha es un doble enlace entre los átomos de carbono;

X es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Y es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

R¹ es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

R² es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un átomo de halógeno, un grupo OH, un grupo OR²⁷, un grupo SH, un grupo S(O)_pR²⁷, un grupo COR²⁷, un grupo CO₂R²⁷, un grupo C(O)SR²⁷, un grupo C(O)NR²⁵R³⁰, un grupo CHO, un grupo CR²⁷=NOR³⁶, un grupo CH=CR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CH₂CHR³⁷CO₂R²⁷, un grupo CO₂N=CR³¹R³², un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo NHSO₂R³³, un grupo NHSO₂NHR³³, un grupo NR²⁷R³⁹, un grupo NH₂ o un grupo fenilo opcionalmente con uno o más grupos alquilo C₁-C₄ iguales o diferentes;

p es 0, 1 o 2;

R³ es un grupo alquilo C₁-C₂, un grupo haloalquilo C₁-C₂, un grupo OCH₃, un grupo SCH₃, un grupo OCHF₂, un átomo de halógeno, a grupo ciano o un grupo nitro;

R⁴ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un grupo haloalquilo C₁-C₃ o un átomo de halógeno;

R⁵ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un átomo de halógeno, a grupo haloalquilo C₁-C₃, grupo ciclopropilo, un grupo vinilo, un grupo alquínilo C₂, un grupo ciano, un grupo C(O)R³⁸, CO₂R³⁸, un grupo C(O)NR³⁸R³⁹, un grupo CR³⁴R³⁵CN, un grupo CR³⁴R³⁵C(O)R³⁸, un grupo CR³⁴R³⁵CO₂R³⁸, un grupo CR³⁴R³⁵C(O)NR³⁸R³⁹, un grupo CHR³⁴OH, un grupo CHR³⁴OC(O)R³⁸ o un grupo OCHR³⁴OC(O)NR³⁹R³⁹, o, cuando G es G-2 o G-6, R⁴ y R⁵ pueden formar un grupo C=O junto con el átomo de carbono al que están anclados;

R⁶ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alcoxialquilo C₂-C₆, un grupo alquénilo C₃-C₆ o un grupo alquínilo C₃-C₆;

X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NH, un grupo N(alquilo C₁-C₃), un grupo N(haloalquilo C₁-C₃) o un grupo N(alilo);

R⁷ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo S(O)₂(alquilo C₁-C₆) o un grupo C(=O)R⁴⁰;

R⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo alquénilo C₃-C₈, un grupo alquínilo C₃-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un grupo alcoxialquilo C₂-C₈, un grupo alcoxialcoxialquilo C₃-C₈, un grupo alcoxialquínilo C₃-C₈, un grupo haloalquénilo C₃-C₈, un grupo alquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo haloalquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo alcocicarbonilalquilo C₃-C₈, un grupo S(O)₂NH(alquilo C₁-C₈), un grupo C(O)R⁴¹ o un grupo bencilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con R⁴²;

n y m son independientemente 0, 1, 2 o 3 y m + n es 2 o 3;

Z es un grupo CR⁹R¹⁰, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo S(O), un grupo S(O)₂ o un grupo N(alquilo C₁-C₄);

cada R⁹ es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo haloalcoxi C₁-C₆, un grupo alquilcarboniloxi C₂-C₆ o un grupo haloalquilcarboniloxi C₂-C₆;

ES 2 319 346 T3

cada R^{10} es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 , y un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R^{11} y R^{12} son independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_3-C_6 o un grupo haloalquilo C_1-C_6 ;

R^{13} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_3-C_6 , un grupo haloalqueno C_3-C_6 , un grupo alquino C_3-C_6 , un grupo haloalquino C_3-C_6 , un grupo $HC(=O)$, un grupo (alquilo C_1-C_4) $C(=O)$ o un grupo NH_2 ;

R^{14} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alquil(C_1-C_6)tio, un grupo haloalquilo C_1-C_6 o un grupo $N(CH_3)_2$;

W es un átomo de nitrógeno o CR^{15} ;

R^{15} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , un átomo de halógeno, o grupo fenilo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C_1-C_6 , uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C_1-C_6 o un grupo CF_3 ;

cada Q es independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Q^1 es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

Z^1 es un grupo $CR^{16}R^{17}$, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo $S(O)$, un grupo $S(O)_2$ o un grupo N (alquilo C_1-C_4);

cada R^{16} es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo haloalcoxi C_1-C_6 , un grupo alquilcarbonilo C_2-C_6 o un grupo haloalquilcarbonilo C_2-C_6 ;

cada R^{17} es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R^{18} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo C_1-C_5 ;

R^{19} y R^{20} son independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_6 , o un grupo haloalquilo C_1-C_5 ;

Z^2 es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NR^9 o un grupo CR^9R^{10} ;

R^{21} y R^{22} son independientemente un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_3-C_6 , un grupo haloalqueno C_3-C_6 , un grupo alquino C_3-C_6 o un grupo haloalquino C_3-C_6 ;

R^{13} es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo ciano;

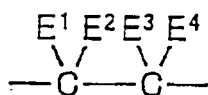
R^{24} es un grupo alquil(C_1-C_6)sulfonilo, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_3-C_6 , un grupo alquino C_3-C_6 , un grupo alcoxi C_1-C_6 , un grupo haloalcoxi C_1-C_6 o un átomo de halógeno;

R^{25} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_3-C_6 o un grupo alquino C_3-C_6 ;

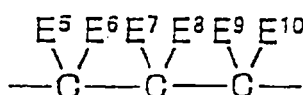
R^{26} es un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo haloalquilo C_1-C_6 o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C_1-C_6 , uno o dos átomos de halógeno, uno o dos grupos nitro, un grupo alcoxi C_1-C_6 o un grupo CF_3 ;

W^1 es un átomo de nitrógeno o un grupo CH ;

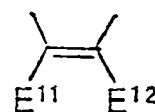
T es un grupo representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas generales T-1, T-2 y T-3;



T-1



T-2



T-3

(donde $E^1, E^2, E^3, E^4, E^5, E^6, E^7, E^8, E^9, E^{10}, E^{11}$ y E^{12} son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_3);

ES 2 319 346 T3

R²⁷ es un grupo alquilo C₁-C₈, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo alqueno C₃-C₈, un grupo alquino C₃-C₈, un grupo haloalquilo C₁-C₈, un grupo alcoxilalquilo C₂-C₈, un grupo alquiltioalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfinilalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfonilalquilo C₂-C₈, un grupo alquilsulfonilo C₁-C₈, un grupo fenilsulfonilo cuyo anillo de fenilo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxilalcoxilalquilo C₄-C₉, un grupo ciclo-alquilalquilo C₄-C₈, un grupo cicloalcoxilalquilo C₆-C₈, un grupo alquenoiloxialquilo C₄-C₉, un grupo alquinoiloxialquilo C₄-C₈, un grupo haloalcoxilalquilo C₃-C₈, un grupo haloalquenoiloxialquilo C₃-C₈, un grupo haloalquinoiloxialquilo C₃-C₈, un grupo cicloalquiltioalquilo C₆-C₈, un grupo alquenoiltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquinoiltioalquilo C₄-C₈, un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido con un grupo fenoxi cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo benciloxi cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y, un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo trialkilsililalquilo C₄-C₈, un grupo cianoalquilo C₃-C₈, un grupo halocicloalquilo C₃-C₈, un grupo haloalqueno C₃-C₈, un grupo alcoxilalqueno C₅-C₈, un grupo haloalcoxilalqueno C₅-C₈, un grupo alquiltioalqueno C₅-C₈, un grupo alcoxilalquino C₃-C₈, un grupo alcoxilalquino C₅-C₈, un grupo haloalcoxilalquino C₅-C₈, un grupo alquil(C₅-C₈)tioalquino, un grupo alquilcarbonilo C₂-C₈, un grupo bencilo cuyo anillo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃, un grupo CHR³⁴COR²³, un grupo CHR³⁴COOR²⁸, un grupo CHR³⁴P(O)(OR²⁸)₂, un grupo CHR³⁴P(S)(OR²⁸)_z, un grupo CHR³⁴C(O)NR²⁹R³⁰ o un grupo CHR³⁴C(O)NH₂;

R²⁸ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquino C₃-C₆ o un grupo tetrahydrofuranilo;

R²⁹ y R³¹ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R³⁰ y R³² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ y un grupo haloalquilo C₁-C₃; o,

R²⁹ y R³⁰ pueden formar juntos -(CH₂)₅-, -(CH₂)₄- o -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, o el anillo formado de este modo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo C₁-C₃, un grupo fenilo y un grupo bencilo; o,

R³¹ y R³² pueden formar un grupo cicloalquilo C₃-C₈ junto con el átomo de carbono al que están anclados;

R³³ es un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo haloalquilo C₁-C₄ o un grupo alqueno C₃-C₆;

R³⁴ y R³⁵ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R³⁶ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₅, un grupo alqueno C₃-C₆ o un grupo alquino C₃-C₆;

R³⁷ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un átomo de halógeno;

R³⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo alqueno C₃-C₆, un grupo alquino C₃-C₆, un grupo alcoxilalquilo C₂-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, a grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ y un grupo alcoxi C₁-C₄, un grupo -CH₂CO₂(alquilo C₁-C₄) o un grupo -CH(CH₃)CO₂(alquilo C₁-C₄);

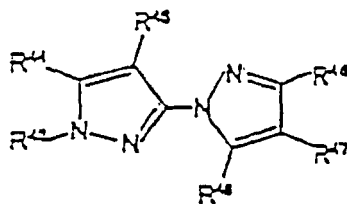
R³⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₂ o un grupo C(O)O(alquilo C₁-C₄);

R⁴⁰ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo NH (alquilo C₁-C₆);

R⁴¹ es un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo NH(alquilo C₁-C₆), un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo R₄₂, un grupo bencilo y un grupo dialquilamino C₂-C₈; y

R¹² es un grupo alquilo C₁-C₆, uno o dos átomos de halógeno, un grupo alcoxi C₁-C₆ o un grupo CF₃;

(3) un compuesto de fórmula (II):



o nipilacrofeno,

donde R^{43} es un grupo alquilo C_1-C_4 ;

R^4 es un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alquil(C_1-C_4)tio, un grupo alcoxi C_1-C_4 , un grupo haloalquilo C_1-C_4 , un grupo haloalquil(C_1-C_4)tio o un grupo haloalcoxi C_1-C_4 ;

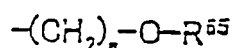
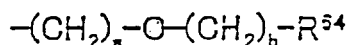
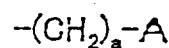
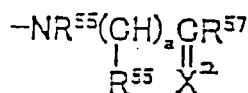
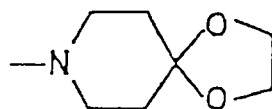
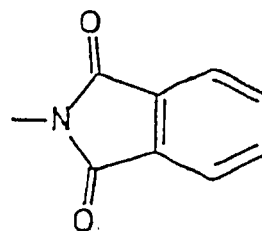
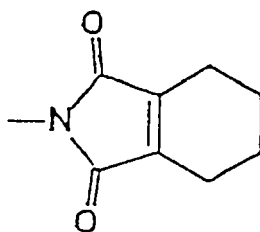
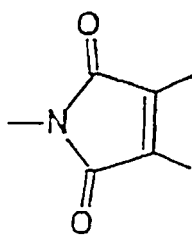
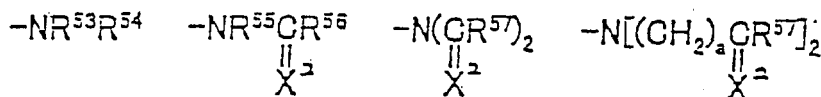
R^{43} y R^{44} pueden formar juntos $-(CH_2)_3-$ o $(CH_2)_4-$;

R^{45} es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

R^{46} es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4 ;

R^{47} es un átomo de hidrógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo $-COOR^{49}$, un grupo $-C(=X)NR^{50}R^{51}$ o un grupo $-C(=X^2)R^{52}$;

R^{48} es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_4 , un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alcoxi C_1-C_4 y un grupo haloalquilo C_1-C_4 , un grupo pirrolilo, un grupo alquilo C_2-C_8 , un grupo alquenilo C_3-C_8 , un grupo alquinilo C_3-C_8 , un grupo alcoxi C_3-C_8 , un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo C_2-C_8 , un grupo alquenilo C_3-C_8 , un grupo alquinilo C_3-C_8 y un grupo alcoxi C_3-C_8 en el que al menos un átomo de oxígeno es insertado, o uno cualquiera de los grupos representados por las siguientes fórmulas:



donde R^{49} , R^{50} y R^{52} son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4 ;

ES 2 319 346 T3

R⁵⁰ y R⁵¹ pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros alicíclico saturado junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados;

R⁵² es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido con al menos un átomo de halógeno;

R⁵³ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquinilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, a grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo cianometilo, o un grupo R⁶³CO-;

R⁵⁴ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquinilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, a grupo fenilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₈, un grupo cianometilo, C₁-C₄ alcoxil-un grupo alquilo C₁-C₆, di-C₁-C₄ alkylamino-un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo tetrahidrofurfurilo, C₃-C₆ alkiniloxi-un grupo alquilo C₁-C₄, a bencilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxil C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo -C(=X²)R⁶³, un grupo (CH₂)_a-(O)_d-R⁷⁰, un grupo -(CH₂)_a-O-(CH₂)_b-R⁷⁰, un grupo -(CH₂)_a-X²-R⁷⁶;

R⁵³ y R⁵⁴ junto con un átomo de nitrógeno al que están anclados pueden formar un anillo de 3, 5 o 6 miembros alicíclico saturado o un anillo de 5 o 6 miembros aromático en el que un átomo de carbono puede ser opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno;

R⁵⁵ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alquenilo C₂-C₆ o un grupo alquinilo C₃-C₆, o R⁵⁵ y R⁵⁶ pueden formar juntos -(CH₂)_e;

R⁵⁶ y R⁵⁷ son independientemente un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alquinilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno o un grupo fenilo opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo -XR⁶⁰ o un grupo -NR⁶¹R⁶²;

R⁵⁸ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alquinilo C₂-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆, un grupo alquilcarbonilo C₁-C₄, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alcoxycarbonil(C₁-C₄) alquilo C₁-C₄, un grupo dialcoxycarbonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo bencilo, un grupo alcoxil(C₁-C₄)alquinilo C₁-C₄, un grupo -(CH₂)_a-R⁷⁵, un grupo -(CH₂)_a-X²-R⁷², un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-R⁷² o un grupo -(CH₂)_a-X²-(CH₂)_b-X²-(CH₂)_c-R⁷²;

R⁵⁹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alquenilo C₂-C₆, un grupo alquinilo C₃-C₆, un grupo cianoalquilo C₁-C₃, un grupo alquil(C₁-C₄)carbonilalquilo C₁-C₃ o un grupo fenilo;

R⁶⁰ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno;

R⁶¹ y R⁶² son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁵³ es un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un átomo de halógeno, un grupo alcoxil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄, un grupo alquil(C₁-C₄)tioalquilo C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆, un grupo fenilo cuyo anillo puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alcoxil C₁-C₄ y un grupo haloalquilo C₁-C₄, un grupo -NR⁷³R⁷⁴ o un grupo -(CH₂)_a-(O)_d-R⁷⁵;

R⁶⁴ es un grupo alcoxycarbonilo C₁-C₄ o un grupo carboxilo;

R⁶⁵ es un grupo clorometilo, un grupo cianometilo, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, o un grupo alcoxycarbonil(C₁-C₄)alquilo C₁-C₄;

R⁶⁵ es un grupo hidroxilo o un grupo -NR⁶⁷R⁶⁸;

A es un grupo NR⁶⁷R⁶⁸ o un grupo -S(O)_r-R⁶⁹;

R⁶⁷ y R⁶³ son, iguales o diferentes, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R⁶⁹ es un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo haloalquilo C₁-C₄;

ES 2 319 346 T3

R⁷⁰ es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido con al menos un grupo alcoxi C₁-C₄, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

R⁷¹ y R⁷² son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alcoxi C₁-C₄;

R⁷³ y R⁷⁴ son, iguales o diferentes, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo fenilo;

R⁷⁵ es un grupo cicloalquilo C₃-C₆ en el que al menos un átomo de oxígeno puede ser insertado, un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con uno o dos grupos metilo, un grupo furilo, un grupo tienilo o un grupo -C(=O)R⁷¹;

R⁷⁶ es un grupo alquilo C₁-C₄;

a, b y c es independientemente 1, 2 o 3;

d es 0 o 1;

e es 2 o 3;

f es 1 o 2; y

X² es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

27. Una célula de una planta transgénica obtenible mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

28. Una planta transgénica o un tejido vegetal que comprende la célula vegetal de la reivindicación 27.

29. La planta transgénica de la reivindicación 28, que es resistente a al menos un compuesto definido en la reivindicación 25 o 26.

30. Partes cosechables o material de propagación de una planta de la reivindicación 28 o 29 que comprenden la célula vegetal de la reivindicación 27.

31. El uso de un gen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 para producir una planta resistente a al menos uno de los compuestos definidos en la reivindicación 25 o 26, la célula vegetal de la reivindicación 27 o la planta de la reivindicación 28 o 29.

32. Un método para proteger una planta que comprende aplicar el compuesto para el control de las malas hierbas a una zona de crecimiento de la planta de la reivindicación 28 o 29.

33. Un método para seleccionar una planta que comprende aplicar un compuesto para el control de las malas hierbas al cual es resistente la planta de la reivindicación 28 o 29 a una zona de crecimiento de la planta de la reivindicación 28 o 29 y otras plantas, y seleccionar cualquier planta basándose en la diferencia de crecimiento entre las plantas.

34. Un método para seleccionar una célula vegetal que comprende aplicar un compuesto para el control de las malas hierbas al cual es resistente la célula vegetal de la reivindicación 27 a una zona de crecimiento de la célula vegetal de la reivindicación 27 y otras células vegetales, y seleccionar cualquier planta basándose en la diferencia de crecimiento entre las células vegetales.

Fig. 1

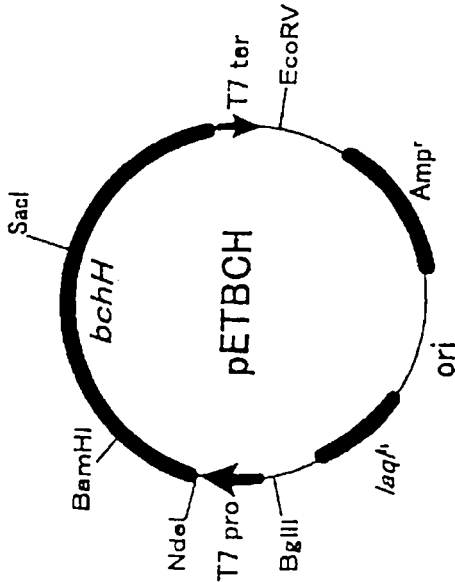


Fig. 3

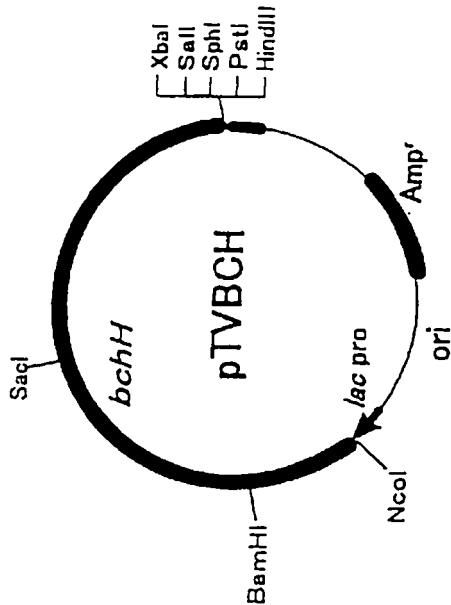
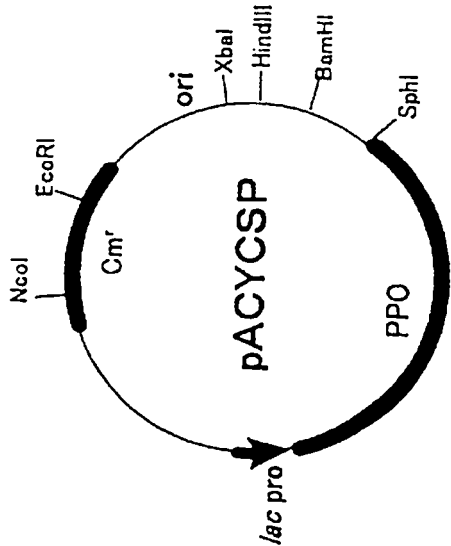


Fig. 2



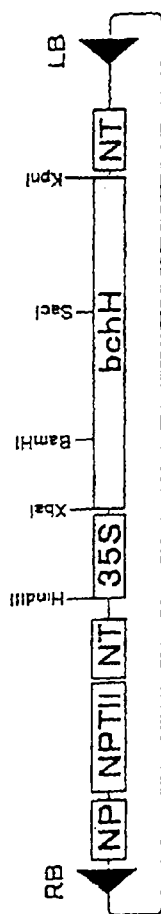


Fig. 4

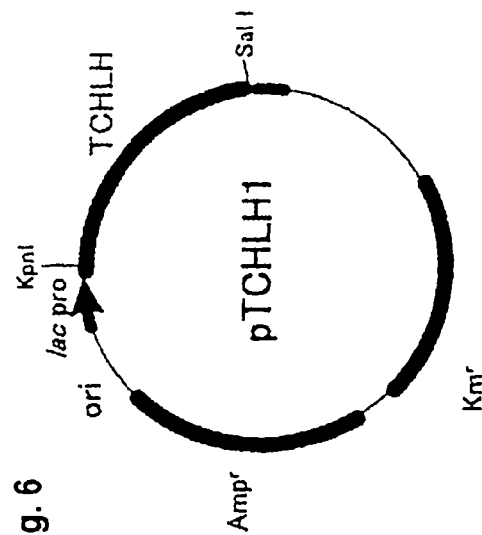


Fig. 6

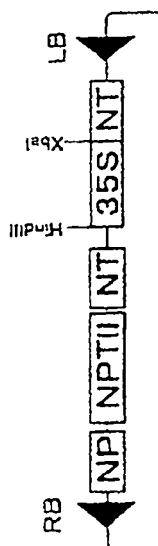


Fig. 5

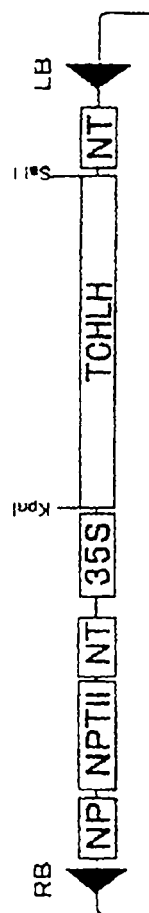


Fig. 7

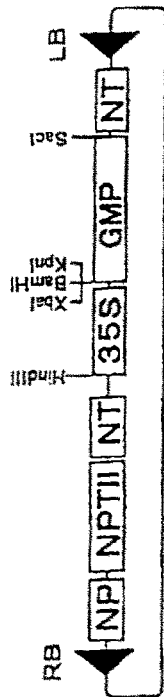


Fig. 9

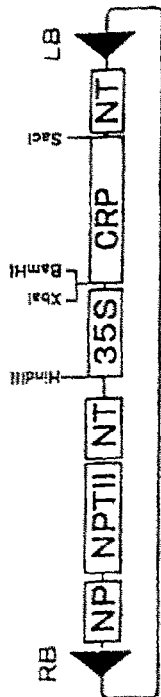


Fig. 11

Fig. 8

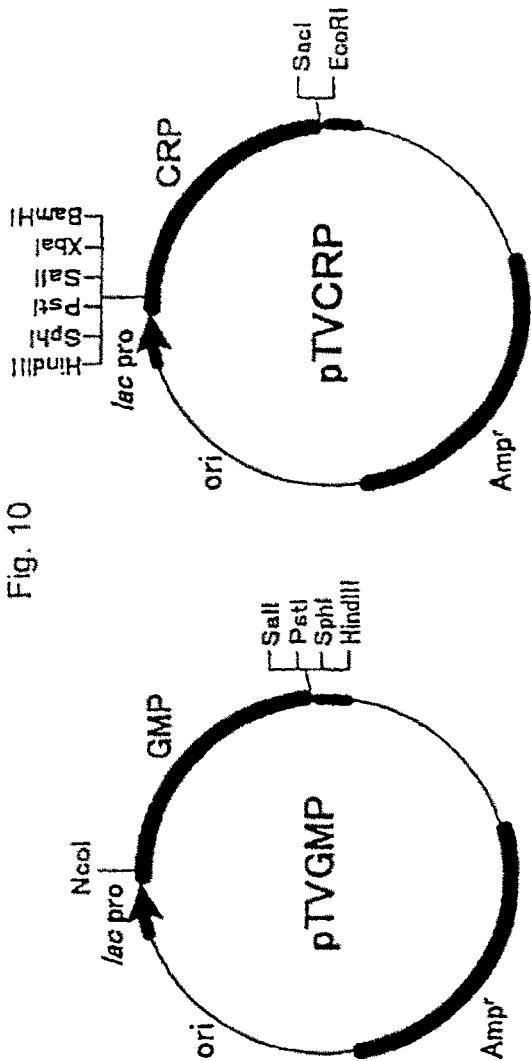


Fig. 10

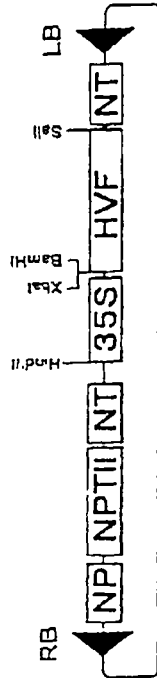


Fig. 13

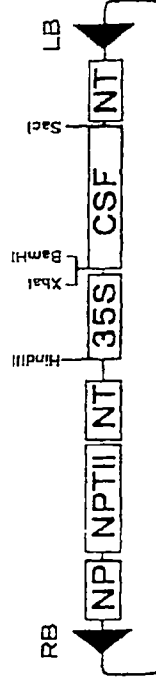


Fig. 15

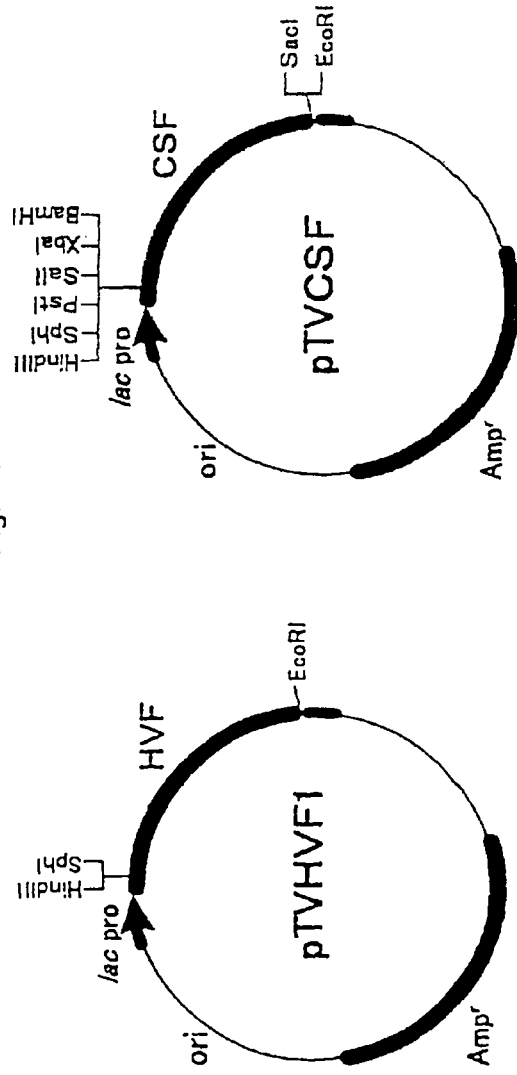


Fig. 14

Fig. 12

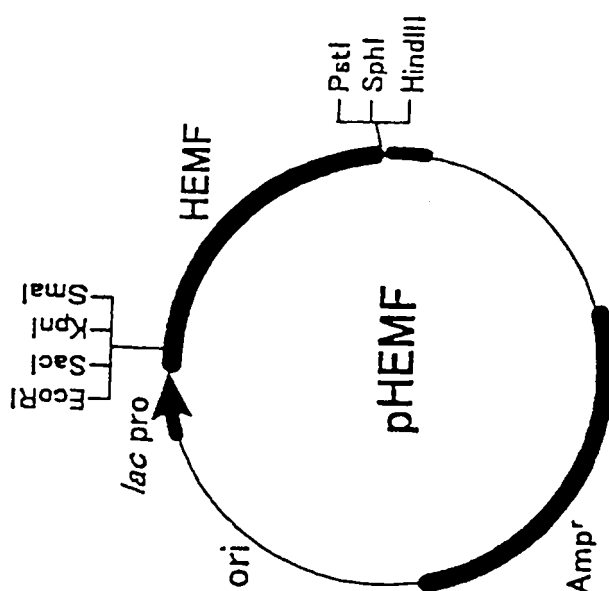


Fig. 16

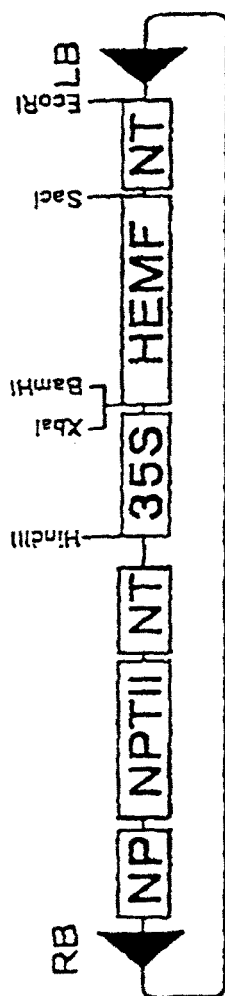


Fig. 17

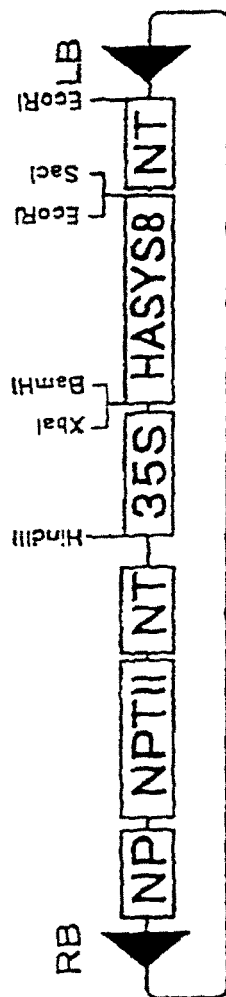


Fig. 18

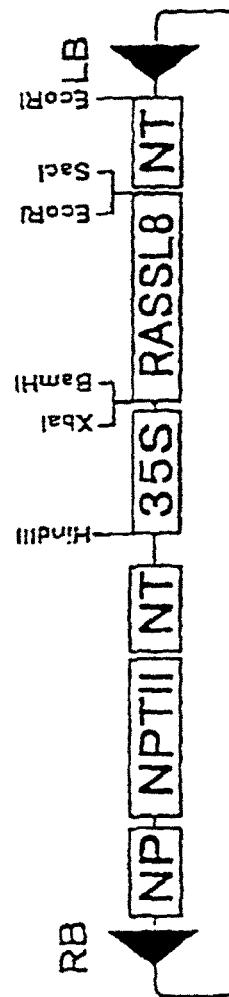


Fig. 19

ES 2 319 346 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Hiroki NAKAJIMA <i>et al.</i> ; Sumitomo Chemical Company Limited	
5	<120> Método para comunicar resistencia a compuestos para el control de las malas hierbas a plantas	
	<130>	
10	<150> JP 10/120553	
	<151> 1998-04-30	
	<150> JP 10/281127	
15	<151> 1998-10-02	
	<150> JP 10/330981	
	<151> 1998-11-20	
20	<150> JP 11/054730	
	<151> 1999-03-02	
25	<160> 64	
	<210> 1	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH	
	<400> 1	
40	gacatctaga ggagacgacc atatgcacgg tgaagtctc	39
	<210> 2	
	<211> 31	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH	
	<400> 2	
55	acggaagctt agatcttcac tcggcggcaa t	31
	<210> 3	
	<211> 39	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de soja	

ES 2 319 346 T3

<400> 3

tcgagctcca tggttccgt cttcaacgag atcctattc

39

5

<210> 4

<211> 39

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de soja

15

<400> 4

ttgtcgacaa ctgctactat ttgtacactc tatttg

36

20

<210> 5

<211> 1632

<212> ADN

25 <213> Glycine max var. Williams82

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)... (1632)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 346 T3

<400> 5

	atg gtt tcc gtc ttc aac gag atc cta ttc ccg ccg aac caa acc ctt	48
5	Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu	
	1 5 10 15	
10	ctt cgc ccc tcc ctc cat tcc cca acc tct ttc ttc acc tct ccc act	96
	Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr	
	20 25 30	
15	cga aaa ttc cct cgc tct cgc cct aac cct att cta cgc tgc tcc att	144
	Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile	
20	35 40 45	
	gcg gag gaa tcc acc gcg tct ccg ccc aaa acc aga gac tcc gcc ccc	192
25	Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro	
	50 55 60	
30	gtg gac tgc gtc gtc gtc ggc gga ggc gtc agc ggc ctc tgc atc gcc	240
	Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala	
	65 70 75 80	
35	cag gcc ctc gcc acc aaa cac gcc aat gcc aac gtc gtc gtc acg gag	288
	Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu	
40	85 90 95	
	gcc cga gac cgc gtc ggc ggc aac atc acc acg atg gag agg gac gga	336
45	Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly	
	100 105 110	
50	tac ctc tgg gaa gaa ggc ccc aac agc ttc cag cct tct gat cca atg	384
	Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met	

ES 2 319 346 T3

	115	120	125	
	ctc acc atg gtg gtg gac agt ggt tta aag gat gag ctt gtt ttg ggg	432		
5	Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly			
	130	135	140	
10	gat cct gat gca cct cgg ttt gtg ttg tgg aac agg aag ttg agg ccg	480		
	Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro			
15	145	150	155	160
	gtg ccc ggg aag ctg act gat ttg cct ttc ttt gac ttg atg agc att	528		
	Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile			
20	165	170	175	
	ggt ggc aaa atc agg gct ggc ttt ggt gcg ctt gga att cgg cct cct	576		
25	Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro			
	180	185	190	
30	cct cca ggt cat gag gaa tcg gtt gaa gag ttt gtt cgt cgg aac ctt	624		
	Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu			
35	195	200	205	
	ggt gat gag gtt ttt gaa cgg ttg ata gag cct ttt tgt tca ggg gtc	672		
	Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val			
40	210	215	220	
	tat gca ggc gat cct tca aaa tta agt atg aaa gca gca ttc ggg aaa	720		
45	Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys			
	225	230	235	240
50	gtt tgg aag ctg gaa aaa aat ggt ggt agc att att ggt gga act ttc	768		
	Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe			
55	245	250	255	

ES 2 319 346 T3

	aaa gca ata caa gag aga aat gga gct tca aaa cca cct cga gat ccg	816
5	Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro	
	260 265 270	
10	cgt ctg cca aaa cca aaa ggt cag act gtt gga tct ttc cgg aag gga	864
	Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly	
	275 280 285	
15	ctt acc atg ttg cct gat gca att tct gcc aga cta ggc aac aaa gta	912
	Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val	
	290 295 300	
20	aag tta tct tgg aag ctt tca agt att agt aaa ctg gat agt gga gag	960
	Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu	
25	305 310 315 320	
30	tac agt ttg aca tat gaa aca cca gaa gga gtg gtt tct ttg cag tgc	1008
	Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys	
	325 330 335	
35	aaa act gtt gtc ctg acc att cct tcc tat gtt gct agt aca ttg ctg	1056
	Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu	
	340 345 350	
40	cgt cct ctg tct gct gct gct gca gat gca ctt tca aag ttt tat tac	1104
	Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr	
45	355 360 365	
50	cct cca gtt gct gca gtt tcc ata tcc tat cca aaa gaa gct att aga	1152
	Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg	
	370 375 380	
55	tca gaa tgc ttg ata gat ggt gag ttg aag ggg ttt ggt caa ttg cat	1200

ES 2 319 346 T3

Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His

385 390 395 400

cca cgt agc caa gga gtg gaa aca tta gga act ata tac agc tca tca 1248

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

405 410 415

cta ttc ccc aac cga gca cca cct gga agg gtt cta ctc ttg aat tac 1296

Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr

420 425 430

att gga gga gca act aat act gga att tta tcg aag acg gac agt gaa 1344

Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu

435 440 445

ctt gtg gaa aca gtt gat cga gat ttg agg aaa atc ctt ata aac cca 1392

Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro

450 455 460

aat gcc cag gat cca ttt gta gtg ggg gtg aga ctg tgg cct caa gct 1440

Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala

465 470 475 480

att cca cag ttc tta gtt ggc cat ctt gat ctt cta gat gtt gct aaa 1488

Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys

485 490 495

gct tct atc aga aat act ggg ttt gaa ggg ctc ttc ctt ggg ggt aat 1536

Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn

500 505 510

tat gtg tct ggt gtt gcc ttg gga cga tgc gtt gag gga gcc tat gag 1584

Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu

515 520 525

gta gca gct gaa gta aac gat ttt ctc aca aat aga gtg tac aaa tag 1632

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

530 535 540 543

<210> 6

<211> 543

<212> PRT

ES 2 319 346 T3

<213> Glycine max var. Williams82

<400> 6

5	Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu
	1 5 10 15
10	Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr
	20 25 30
15	Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile
	35 40 45
20	Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro
	50 55 60
25	Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala
	65 70 75 80
30	Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu
	85 90 95
35	Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly
	100 105 110
40	
45	
50	
55	
60	
65	

ES 2 319 346 T3

Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met

115

120

125

Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly

130

135

140

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro

145

150

155

160

Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile

165

170

175

Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro

180

185

190

Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu

195

200

205

Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val

210

215

220

Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys

225

230

235

240

Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe

245

250

255

Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro

260

265

270

Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly

275

280

285

Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val

290

295

300

Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu

ES 2 319 346 T3

	305	310	315	320
	Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys			
5		325	330	335
	Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu			
10		340	345	350
	Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr			
15		355	360	365
	Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg			
20		370	375	380
	Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His			
	385	390	395	400
25	Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser			
		405	410	415
30	Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr			
		420	425	430
	Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu			
35		435	440	445
	Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro			
40		450	455	460
	Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala			
45	465	470	475	480
	Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys			
		485	490	495
50	Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn			
		500	505	510
55	Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu			
		515	520	525
60	Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys			
	530	535	540	543

65 <210> 7
 <211> 39
 <212> ADN

ES 2 319 346 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<213> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH	
	<400> 7	
10	gacatctagt ctagacgacc atatgcacgg tgaagtctc	39
	<210> 8	
	<211> 31	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen bchH	
	<400> 8	
25	acggaagctt ggtacctcac tcggcggcaa t	31
	<210> 9	
	<211> 35	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ch1H de tabaco	
	<400> 9	
40	ccaatgtaat gctatgttac ctatgttatt cactc	35
	<210> 10	
45	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ch1H de tabaco	
55	<400> 10	
	gagatcattc ttttgcgtg cgacttatcg atcg	34
60	<210> 11	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 319 346 T3

	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja	
5	<400> 11	
	ggcggaggcg tcaccatggt ctgcatcgcc caggcc	36
10	<210> 12	
	<211> 36	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja	
20	<400> 12	
	gcctgcaggt cgacaactgc tactatttgt acactc	36
25	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja	
	<400> 13	
40	cacaggaaag gtaccatggt ctgcatcgcc cag	33
	<210> 14	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de soja	
	<400> 14	
55	cctgcagctc gagagctcct actatttgta cac	33
	<210> 15	
60	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de Chlamydomonas	

ES 2 319 346 T3

<400> 15

aatgatgttg acccagactc ctgggacc

28

5

<210> 16

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen PPO de Chlamydomonas

15

<400> 16

tactacacat cccagcaagc gccaatg

27

20

<210> 17

<211> 1838

<212> ADN

25 <213> *Chlamydomonas reinhardtii* CC₄07

<220>

<221> CDS

30

<222> (2)... (1693)

<400> 17

a atg atg ttg acc cag act cct ggg acc gcc acg gct tct agc cgg 46

35

Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg

1 5 10 15

40

cgg tcg cag atc cgc tcg gct gcg cac gtc tcc gcc aag gtc gcg cct 94

Arg Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro

45

20 25 30

cgg ccc acg cca ttc tcg gtc gcg agc ccc gcg acc gct gcg agc ccc 142

Arg Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro

50

35 40 45

gcg acc gcg gcg gcc cgc cgc aca ctc cac cgc act gct gcg gcg gcc 190

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala

55

50 55 60

act ggt gct ccc acg gcg tcc gga gcc ggc gtc gcc aag acg ctc gac 238

60

Thr Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp

65 70 75

65

aat gtg tat gac gtg atc gtg gtc ggt gga ggt ctc tcg ggc ctg gtg 286

ES 2 319 346 T3

Asn Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val

80 85 90 95

acc ggc cag gcc ctg gcg gct cag cac aaa att cag aac ttc ctt gtt 334

Thr Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val

100 105 110

acg gag gct cgc gag cgc gtc ggc ggc aac att acg tcc atg tcg ggc 382

Thr Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly

115 120 125

gat ggc tac gtg tgg gag gag ggc ccg aac agc ttc cag ccc aac gat 430

Asp Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp

130 135 140

agc atg ctg cag att gcg gtg gac tct ggc tgc gag aag gac ctt gtg 478

Ser Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val

145 150 155

ttc ggt gac ccc acg gct ccc cgc ttc gtg tgg tgg gag ggc aag ctg 526

Phe Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu

160 165 170 175

cgc ccc gtg ccc tcg ggc ctg gac gcc ttc acc ttc gac ctc atg tcc 574

Arg Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser

180 185 190

atc ccc ggc aag atc cgc gcc ggg ctg ggc gcc atc ggc ctc atc aac 622

Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn

195 200 205

gga gcc atg ccc tcc ttc gag gag agt gtg gag cag ttc atc cgc cgc 670

Gly Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg

ES 2 319 346 T3

	210	215	220	
	aac ctg ggc gat gag gtg ttc ttc cgc ctg atc gag ccc ttc tgc tcc			718
5	Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser			
	225	230	235	
10	ggc gtg tac gcg ggc gac ccc tcc aag ctg tcc atg aag gcg gcc ttc			766
	Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe			
	240	245	250	255
15	aac agg atc tgg att ctg gag aag aac ggc ggc agc ctg gtg gga ggt			814
	Asn Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly			
20		260	265	270
	gcc atc aag ctg ttc cag gaa cgc cag tcc aac ccg gcc ccg ccg ccg			862
25	Ala Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg			
	275	280	285	
30	gac ccg cgc ctg ccg ccc aag ccc aag ggc cag acg gtg ggc tgc ttc			910
	Asp Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe			
	290	295	300	
35	cgc aag ggc ctg aag atg ctg ccg gac gcc att gag cgc aac atc ccc			958
	Arg Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro			
40	305	310	315	
	gac aag atc cgc gtg aac tgg aag ctg gtg tct ctg ggc cgc gag gcg			1006
	Asp Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala			
45	320	325	330	335
	gac ggg cgg tac ggg ctg gtg tac gac acg ccc gag ggc cgt gtc aag			1054
50	Asp Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys			
	340	345	350	

ES 2 319 346 T3

gtg ttt gcc cgc gcc gtg gct ctg acc gcg ccc agc tac gtg gtg gcg 1102
Val Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala
5 355 360 365
gac ctg gtc aag gag cag gcg ccc gcc gcc gcc gag gcc ctg ggc tcc 1150
10 Asp Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser
370 375 380
ttc gac tac ccg ccg gtg ggc gcc gtg acg ctg tcg tac ccg ctg agc 1198
15 Phe Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser
385 390 395
gcc gtg cgg gag gag cgc aag gcc tcg gac ggg tcc gtg ccg ggc ttc 1246
20 Ala Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe
25 400 405 410 415
ggt cag ctg cac ccg cgc acg cag ggc atc acc act ctg ggc acc atc 1294
30 Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile
420 425 430
tac agc tcc agc ctg ttc ccc ggc cgc gcg ccc gag ggc cac atg ctg 1342
35 Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu
435 440 445
ctg ctc aac tac atc ggc ggc acc acc aac cgc ggc atc gtc aac cag 1390
40 Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln
45 450 455 460
acc acc gag cag ctg gtg gag cag gtg gac aag gac ctg cgc aac atg 1438
50 Thr Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met
465 470 475
gtc atc aag ccc gac gcg ccc aag ccc cgt gtg gtg ggc gtg cgc gtg 1486
55

60

65

ES 2 319 346 T3

Val Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val
 480 485 490 495
 5 tgg ccg cgc gcc atc ccg cag ttc aac ctg ggc cac ctg gag cag ctg 1534
 Trp Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu
 10 500 505 510
 gac aag gcg cgc aag gcg ctg gac gcg gcg ggg ctg cag ggc gtg cac 1582
 15 Asp Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His
 515 520 525
 20 ctg ggg ggc aac tac gtc agc ggt gtg gcc ctg ggc aag gtg gtg gag 1630
 Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu
 530 535 540
 25 cac ggc tac gag tcc gca gcc aac ctg gcc aag agc gtg tcc aag gcc 1678
 His Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala
 30 545 550 555
 gca gtc aag gcc taa gcggctgcag cagtagcagc agcagcatcg ggctgtagct 1733
 35 Ala Val Lys Ala
 560 563
 40 ggtaaattgcc gcagtggcac cggcagcagc aattggcaag cacttggggc aagcggagtg 1793
 gaggcgaggg gggggctacc attggcgctt gctgggatgt gtagt 1838

<210> 18

<211> 563

<212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii* CC₄07

ES 2 319 346 T3

<400> 18

	Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg
5	1 5 10 15
	Arg Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro
10	20 25 30
	Arg Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro
15	35 40 45
	Ala Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala
20	50 55 60
	Thr Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp
25	65 70 75
	Asn Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val
30	80 85 90 95
	Thr Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val
35	100 105 110
	Thr Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly
40	115 120 125
	Asp Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp
45	130 135 140
	Ser Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val
50	145 150 155
	Phe Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu
55	160 165 170 175
	Arg Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser

ES 2 319 346 T3

	180	185	190
	Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn		
5	195	200	205
	Gly Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg		
10	210	215	220
	Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser		
15	225	230	235
	Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe		
20	240	245	250
	Asn Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly		
	260	265	270
25	Ala Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg		
	275	280	285
30	Asp Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe		
	290	295	300
35	Arg Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro		
	305	310	315
40	Asp Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala		
	320	325	330
	Asp Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys		
45	340	345	350
	Val Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala		
50	355	360	365
	Asp Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser		
55	370	375	380
60			
65			

ES 2 319 346 T3

Phe Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser
 385 390 395
 5 Ala Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe
 400 405 410 415
 10 Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile
 420 425 430
 15 Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu
 435 440 445
 20 Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln
 450 455 460
 25 Thr Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met
 465 470 475
 30 Val Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val
 480 485 490 495
 Trp Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu
 500 505 510
 35 Asp Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His
 515 520 525
 40 Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu
 530 535 540
 45 His Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala
 545 550 555
 50 Ala Val Lys Ala
 560 563
 55 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de
 65 Chlamydomonas

ES 2 319 346 T3

	<400> 19	
	ggtcggtgga ggggatccga tgctggtgac cg	32
5	<210> 20	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen PPO de Chlamydomonas	
	<400> 20	
20	gctactgctg cgagctetta ggccttgact gc	32
	<210> 21	
	<211> 33	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ferroquelatasa de pepino	
	<400> 21	
35	gctttagaat cggatcctat ggcagtggat gac	33
	<210> 22	
40	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia parcial del gen ferroquelatasa de pepino	
50	<400> 22	
	ggtgaacttc tatttgagct ctcaggtaaa tataag	36
55	<210> 23	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de <i>Escherichia coli</i>	
65	<400> 23	
	gctgaaggcg tgatcagtta ttcc	25

ES 2 319 346 T3

	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de <i>Escherichia coli</i>	
10	<400> 24	
	catcagcctg cagtgcgaaa agtg	24
15	<210> 25	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de <i>Escherichia coli</i>	
25	<400> 25	
	cgaaaaaggg atccgttatg aaaccc	26
30	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para amplificar el gen hemF de <i>Escherichia coli</i>	
40	<400> 26	
	gctgttttc gagtcccgt cac	23
45	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótidos diseñados para sintetizar genes que codifican péptidos al azar que comprenden 5 aminoácidos	
	<400> 27	
	tggccnnknn knknknknk gc	22
60	<210> 28	
	<211> 29	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 319 346 T3

	<220>	
	<223> Oligonucleótidos diseñados para sintetizar genes que codifican péptidos al azar que comprenden 5 aminoácidos	
5	<400> 28	
	ggccgcmnnm nnnnnnnnnn nggccagct	29
10	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido HASYS	
20	<400> 29	
	tggcccatgc tagttagtcg gc	22
25	<210> 30	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido HASYS	
35	<400> 30	
	tggcgccgac taactagcat gggccagct	29
40	<210> 31	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido RASSL	
50	<400> 31	
	tggcccgggc gtcgtcgttg gc	22
55	<210> 32	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido RASSL	
65	<400> 32	
	ggccgccaac gacgacgcc gggccagct	29

ES 2 319 346 T3

	<210> 33	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGHASYS	
10	<400> 33	
	catgggtcac gcttcttact cctaag	26
15	<210> 34	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGHASYS	
25	<400> 34	
	aattcttagg agtaagaagc gtgacc	26
30	<210> 35	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGRASSL	
40	<400> 35	
	catgggtcgt gcttcttccc tgtaag	26
45	<210> 36	
	<211> 26	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGRASSL	
55	<400> 36	
	aattcttaca gggaagaagc acgacc	26
60	<210> 37	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 319 346 T3

	<220>	
	<223> Oligonucleótidos diseñados para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGY	
5	<400> 37	
	catgggttac gctggctact aag	23
10	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGY	
20	<400> 38	
	aattcttagt agccagcgta acc	23
25	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGF	
35	<400> 39	
	catgggttac gctggcttct aag	23
40	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MGYAGF	
50	<400> 40	
	aattcttaga agccagcgta acc	23
55	<210> 41	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4	
65	<400> 41	
	catgggtcac gcttcttact cccatgcac ttac	34

ES 2 319 346 T3

	<210> 42	
	<211> 34	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)4	
10	<400> 42	
	gtgggagtaa gatgcatggg agtaagaagc gtgacc	36
15	<210> 43	
	<211> 37	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG (HASYS)4	
25	<400> 43	
	tcccacgett ctactecca tgcattttac tectaag	37
30	<210> 44	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS) 4	
40	<400> 44	
	aattcttagg agtaagatgc atgggagtaa gaagc	35
45	<210> 45	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG (HASYS)8	
55	<400> 45	
	tcccacgett ctactecca tgcattttac	30
60	<210> 46	
	<211> 30	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 319 346 T3

	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(HASYS)8	
5	<400> 46	
	gtgggagtaa gatgcatggg agtaagaagc	30
10	<210> 47	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4	
20	<400> 47	
	catgggtcgt gcttctccc tgcgcgcac ttcc	34
25	<210> 48	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4	
35	<400> 48	
	acgcagggaa gatgcgcgca ggaagaagc acgacc	36
40	<210> 49	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4	
50	<400> 49	
	ctgcgtgctt cttccctgcg cgcattctcc ctgtaag	37
55	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)4	
65	<400> 50	
	aattcttaca gggaagatgc gcgcagggaa gaagc	35

ES 2 319 346 T3

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)8
 10
 <400> 51

 ctgcgtgctt cttccctgcg cgcattctec 30
 15
 <210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido diseñado para sintetizar el gen que codifica el péptido MG(RASSL)8
 25
 <400> 52

 acgcagggaa gatgcgcgca gggaagaagc 30
 30
 <210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Proteína de unión a protoporfirina IX HASYS
 40
 <400> 53

 His Ala Ser Tyr Ser
 45
 1 5

 <210> 54
 50 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Proteína de unión a protoporfirina IX MGHASYS
 60 <400> 54

 Met Gly His Ala Ser Tyr Ser
 65
 1 5

 <210> 55

ES 2 319 346 T3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Proteína de unión a protoporfirina IX RASSL

10 <400> 55

Arg Ala Ser Ser Leu

15 **1 5**

<210> 56

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Proteína de unión a protoporfirina IX MGRASSL

<400> 56

30 **Met Gly Arg Ala Ser Ser Leu**

1 5

35 <210> 57

<211> 4

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de unión a H₂TMpyP YAGY.

45 <400> 57

Tyr Ala Gly Tyr 4

50 <210> 58

<211> 6

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Proteína de unión a H₂TMpyP MGYAGY

<400> 58

Met Gly Tyr Ala Gly Tyr

65 **1 5**

ES 2 319 346 T3

<210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Proteína de unión a H₂TMpyP YAGF
 10
 <400> 59
 Tyr Ala Gly Phe
 15 **1**

 <210> 60
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Proteína de unión a H₂TMpyP MGYAGF

 <400> 60
 30 **Met Gly Tyr Ala Gly Phe**
 1 5
 35
 <210> 61
 <211> 22
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Proteína de unión a protoporfirina IX MG (HASYS)₄
 45
 <400> 61

 Met Gly His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr
 50 **1 5 10 15**
 Ser His Ala Ser Tyr Ser
 55 **20**

 <210> 62
 <211> 42
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Proteína de unión a protoporfirina IX MG(HASYS)₈

ES 2 319 346 T3

<400> 62

Met Gly His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr

5 1 5 10 15

Ser His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr Ser

10 20 25 30

His Ala Ser Tyr Ser His Ala Ser Tyr Ser

35 40

15 <210> 63

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₄

25 <400> 63

Met Gly Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser

30 1 5 10 15

Leu Arg Ala Ser Ser Leu

20

35 <210> 64

<211> 42

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de unión a protoporfirina IX MG(RASSL)₈.

45 <400> 64

Met Gly Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser

50 1 5 10 15

Leu Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser Leu

55 20 25 30

Arg Ala Ser Ser Leu Arg Ala Ser Ser Leu

35 40

60

65