

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 086**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010 PCT/EP2010/070570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10799038 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2516635**

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

30 Prioridad:

23.12.2009 EP 09015987

29.12.2009 US 290589 P

10.11.2010 EP 10190661

10.11.2010 US 412074 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.03.2018

73 Titular/es:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)

Alfred-Nobel-Strasse 10

40789 Monheim, DE

72 Inventor/es:

POREE, FABIEN;

LABER, BERND;

KNITTEL-OTTLEBEN, NATHALIE;

LANGE, GUDRUN;

SCHULZ, ARNO y

HAIN, RUEDIGER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 086 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD

Introducción

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

Antecedentes

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

- Hasta el momento actual se anotaron más de 700 secuencias de ácidos nucleicos procedentes de diversos organismos presentes en la base de datos del NCBI como que codificaban una proteína putativa que tenía un dominio de HPPD e incluían la secuencia desvelada bajo el número de acceso Q6KZ98 que se da en la base de
20 datos UniProtKB/TrEMBL así como bajo el número de acceso YP_024147 que se da en la base de datos de proteínas del NCBI. Sin embargo, para la mayor parte de éstas, incluyendo la secuencia que corresponde al número de acceso Q6KZ98/ YP_024147, no se ha probado que la proteína derivada de dicha secuencia podría tener una actividad enzimática de HPPD o bien en un ensayo *in vitro* o en un enfoque *in planta*, ni que dicha proteína HPPD pueda conferir a los herbicidas inhibidores de las HPPD una tolerancia a herbicidas, cuando se exprese en una
25 planta. Se han descrito en el estado de la técnica varias proteínas de HPPD y sus secuencias primarias, en particular las proteínas de HPPD de bacterias tales como *Pseudomonas* (Rüetschi y col., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, documento de solicitud de patente internacional WO 96/38567), de plantas tales como *Arabidopsis* (documento WO 96/38567, Genbank AF047834), zanahoria (documento WO 96/38567, Genbank 87257), *Avena sativa* (documento WO 02/046387), trigo (documento WO 02/046387), *Brachiaria platyphylla* (documento WO 02/046387), *Cenchrus echinatus* (documento WO 02/046387), *Lolium rigidum* (documento WO 02/046387), *Festuca arundinacea* (documento WO 02/046387), *Setaria faberi* (documento WO 02/046387), *Eleusine indica* (documento WO 02/046387), *sorgo* (documento WO 02/046387), *Coccicoides* (Genbank COITRP), de *Coptis japonica* (documento WO 06/132270), *Chlamydomonas reinhardtii* (documento de patente española ES 2275365), o de mamíferos tales como un ratón o un cerdo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción

La presente invención se refiere por lo tanto a la generación de plantas transgénicas que contienen un gen que codifica una proteína HPPD obtenible u obtenida a partir de un organismo que pertenece a la familia de los *Picrophilaceae*, y variantes o mutantes del mismo, más especialmente a un gen procedente de un organismo que pertenece al género *Picrophilus*, y variantes o mutantes del mismo, que codifica una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un para-hidroxifenilpiruvato en un homogentisato y cuyas plantas son menos sensibles a agentes inhibidores de las HPPD que unas plantas que no contienen ninguno de dichos transgenes que codifican las HPPD.

Más especialmente, la presente invención se refiere por lo tanto a la generación de plantas transgénicas que contienen un gen obtenible o obtenido a partir de un organismo que pertenece a la familia de los *Picrophilaceae* especialmente procedente del género *Picrophilus*, más especialmente obtenido a partir de la especie *Picrophilus torridus*, y variantes o mutantes de las mismas, que codifica una enzima HPPD que muestra las propiedades de catalizar la conversión de un para-hidroxifenilpiruvato en un homogentisato y que son menos sensibles a agentes inhibidores de las HPPD que unas plantas que no contienen ninguno de tales transgenes de HPPD.

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

Esta divulgación se refiere a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6.

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en que cualquiera de los aminoácidos desde la posición 177 hasta la posición 368 de la SEQ ID NO: 4 puede ser corregido por cualquier aminoácido presente en la naturaleza, de manera preferible puede ser cualquier sustitución conservativa.

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y que tiene uno o más de los siguientes aminoácidos en la posición definida por su número (que se relaciona con el número de la SEQ ID NO: 4) dado entre paréntesis, es decir His(175), Ser(218), Asn(232), Gln(256), His(257), Tyr(286), Gln(321), Phe(334), Glu(336), Gly(347), and Asn(350).

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (i) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (i).

Tabla (i):

Aminoácido en SEQ ID NO:4	Posición en SEQ ID NO:4	Sustituciones
Val	177	Thr, Cys, Ala, Gly Phe, Tyr, Ile, Val, Ala, Gln, Glu, Asp, Gly, Thr, Ser, Met, Arg,
Leu	201	Lys
Ile	202	Ala, Trp, Leu, Ser, Arg, Lys, His, Asp, Glu, Pro, Gly, Asn
Phe	204	Val, Ile, Ala, Leu, Trp, Met, Gln, His
Leu	216	Met, Val
Lys	219	Ala, Val, Leu, Met, Ile, Arg, Gln, Tyr
Val	221	Leu, Met, Ile, Ala
Lys	222	Ala, Ser, Thr, Val, Arg, Glu, Leu, Ile, Met, His
Ala	353	Glu, Gln, Ser, Val, Phe, Thr
Leu	354	Arg

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (ii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (ii).

Tabla (ii):

Aminoácido en SEQ ID NO:4	Posición en SEQ ID NO:4	Sustituciones
Thr	203	Glu, Ser, Tyr, Phe, His, Gln, Asn, Gly, Leu, Met, Val, Arg, Ile
Val	220	Ala, Thr
Pro	230	Ala, Val, Thr, Asn, Ile,
Leu	280	Met, Ile, Asn
Leu	310	Met
Asn	348	Cualquiera excepto Pro
Gly	349	Ala, Pro, Val, Thr, Met

La divulgación se refiere adicionalmente a una proteína HPPD denominada en el presente documento "la proteína HPPD de la presente invención" o "la proteína HPPD de *Picrophilus*", que es una proteína HPPD con una identidad de su secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %; por lo menos 97 %; por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, particularmente con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, de manera preferible de la SEQ ID NO: 6, y en las respectivas posiciones dadas en la segunda columna de la Tabla (iii) los aminoácidos originalmente presentes pueden ser sustituidos por cualesquiera de los aminoácidos enumerados en la columna 3 de la Tabla (iii).

Tabla (iii)

Aminoácido en SEQ ID NO:4	Posición en SEQ ID NO:4	Sustituciones
Thr	203	Glu, Ser, Arg, Tyr
Val	220	Ala
Pro	230	Ala, Val, Thr
Leu	280	Met
Leu	310	Met
Asn	348	Ile, Ala, Val, Leu, Lys
Gly	349	Ala

Esto incluye una proteína con aminoácidos sustituidos, suprimidos o añadidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, tales como una proteína de fusión con un péptido de tránsito, o una proteína con cambios de aminoácidos en la secuencia de la SEQ ID NO: 4 que retiene la función enzimática de una proteína HPPD, y que todavía confiere una tolerancia a las HPPD cuando se expresa en plantas, de manera preferible una tolerancia a las HPPD de rango comparable con la conferida por la proteína de la SEQ ID NO: 4. Esto incluye proteínas variantes o mutantes derivadas de la proteína de la SEQ ID NO: 4, tales como cualquiera de las proteínas de las SEQ ID NO: 5, 6 o 7, particularmente aquella mutante o variante que es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible aquella mutante o variante que confiere una tolerancia a herbicidas agrónomicamente relevante a una planta hospedadora que la expresa cuando un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas y/o pirazolinatos, particularmente cualquiera tomado de mesotriona, tembotriona, isoxaflutol o biciclopirona es aplicado sobre dichas plantas, más particularmente cuando es aplicado después del brote. Esto incluye también una proteína que comprende una porción activa de la secuencia de la SEQ ID NO: 4, cuya porción confiere una tolerancia a agentes inhibidores de las HPPD cuando se expresa en plantas. Esto incluye una proteína con sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 4, tal como una proteína con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 hasta 7. Esto incluye proteínas aisladas como se definen seguidamente, y también unas proteínas, tales como la proteína de la SEQ ID NO: 4, en las que ciertos aminoácidos han sido reemplazados por unos similares aminoácidos como se definen seguidamente, de manera preferible sustituciones conservativas de aminoácidos. También están incluidas en el presente contexto como proteínas de HPPD de la presente invención unas proteínas de HPPD que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, pero en las que 1-20, 1-15, 1-10 o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos han sido suprimidos o han sido sustituidos por otros aminoácidos, particularmente una proteína tal que retiene la actividad enzimática de las HPPD y que confiere tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD cuando es expresada en una planta hospedadora. Están incluidas en el presente contexto unas proteínas de HPPD codificadas por unas secuencias de ADN homologas a las secuencias de ADN de la invención como se describen seguidamente, o unas proteínas de HPPD codificadas por una secuencia de ADN que se hibrida con por lo menos una porción (de por lo menos 20-30 nucleótidos) del ADN de la SEQ ID NO: 1, o que es obtenible usando un cebador basado en SEQ ID NO: 1, o unas proteínas de HPPD con una identidad entre secuencias de por lo menos 80 % con la SEQ ID NO: 4, que son codificadas por una secuencia de ADN hallada en la secuencia del genoma de un microorganismo de la familia *Picrophilus*. Está incluida en el presente contexto como una proteína HPPD de la presente invención una proteína HPPD de *Picrophilus* que confiere una tolerancia a herbicidas a unas plantas cuando es expresada en tales plantas, en las que dicha tolerancia es a un agente inhibidor de las HPPD tal como mesotriona, tembotriona, isoxaflutol o biciclopirona, particularmente dicha proteína HPPD es una proteína HPPD de *Picrophilus torridus*, tal como una proteína que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368. Esto incluye las proteínas de HPPD mutantes o variantes tal como se describen adicionalmente más adelante.

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

Un aspecto adicional de la divulgación concierne a anticuerpos, moléculas monocatenarias que fijan antígenos, u otras proteínas que se fijan específicamente a una o más de las moléculas de proteínas o péptidos de la invención y sus compuestos homólogos, fusiones o fragmentos. En una forma de realización particularmente preferida, el anticuerpo se fija específicamente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en las SEQ ID NO: 4-7 o un fragmento de la misma, o secuencias derivadas de la misma de acuerdo con un reemplazo de aminoácidos tal como se desvela en una o más de las Tablas (i), (ii) o (iii) anteriores.

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

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

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

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

- 25 En una forma de realización particular adicional, la presente invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de la presente invención que se obtiene o es obtenible a partir de la SEQ ID NO: 1 y está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.125 (que incluye las posiciones definidas).

- 30 En una forma de realización particular adicional, la presente invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de la presente invención que se obtiene de la SEQ ID NO: 1 y está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.500 (que incluye las posiciones definidas).

- 35 En una forma de realización particular adicional, la HPPD de la invención, tal como la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, o la HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 hasta 7, es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, o a un herbicida inhibidor de las HPPD, seleccionado entre isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ fenil)-propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona y pirazoxifeno.

- 40 En una forma de realización particular adicional, la presente invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de la presente invención que se obtiene de la SEQ ID NO: 1 y está optimizado para la expresión en *E. coli*, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.125 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topamezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

- 45 En una forma de realización particular adicional, la presente invención incluye un ADN que codifica una proteína HPPD de la presente invención que está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.500 (que incluye las posiciones definidas), que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a por lo menos un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible a tembotriona, mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, isoxaflutol, dicetonitrilo, pirasulfotol, topamezona, sulcotriona, pirazolato y benzofenap.

En una forma de realización particular adicional, la presente invención se refiere a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden un ADN que codifica una proteína HPPD de la invención, que está optimizado para la expresión en *E. coli*, o está optimizado para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.125 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.500 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora. Tales plantas incluyen, pero no se limitan a, plantas cultivadas en el campo, frutos y hortalizas tales como canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, col, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, frutos cítricos, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces.

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a plantas, partes de plantas, células de plantas y progenies de estas plantas que comprenden cualesquiera de los ADN que codifican una HPPD de la invención que está optimizada para la expresión en *E. coli*, u optimizada para la expresión en plantas, tal como un ADN optimizado en codones, por ejemplo un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 desde la posición de nucleótido 25 hasta la posición de nucleótido 1.125 (que incluye las posiciones definidas) o de la SEQ ID NO: 3 desde la posición de nucleótido 400 hasta la posición de nucleótido 1.500 (que incluye las posiciones definidas) que codifica una HPPD menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora, y en las que las plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, patata, especies de soja, caña de azúcar, guisantes, judías, álamo, uva, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forrajeras, lino y colza de semilla oleaginosa, y plantas productoras de nueces, incluso de manera más preferible tales plantas están seleccionadas entre el conjunto que consiste en especies de soja, arroz, remolacha azucarera, trigo, algodón, canola, colza de semilla oleaginosa o maíz. La proteína HPPD puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y es menos sensible a un agente inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD tricetonas), tales como tembotriona, sulcotriona mesotriona, biciclopirona, tefuriltriona, particularmente tembotriona, o de la clase de los dicetonitrilos (isoxaflutol) o de la clase de los pirazolinatos (que se denominan agentes inhibidores de las HPPD pirazolinatos), tales como pirasulfotol, pirazolato, topramezona, benzofenap en comparación con la HPPD no mutada endógena de una planta, particularmente la planta hospedadora en la que dicha HPPD de la invención es expresada o ha de ser expresada.

La actividad enzimática de las proteínas de HPPD puede ser medida por cualquier procedimiento que haga posible ya sea medir la disminución en la cantidad de los sustratos de HPP o de O₂, o medir la acumulación de cualquiera de los productos derivados de la reacción enzimática, es decir homogentisato o CO₂. En particular, la actividad de HPPD puede ser medida por medio del procedimiento descrito en las citas de García y col. (1997), *Biochem. J.* 325, 761-769 o García y col. (1999), *Plant Physiol.* 119, 1507-1516, que se incorporan en el presente documento como referencia.

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

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

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

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

lo menos 95 %, incluso de manera más preferible de por lo menos 98 % y de manera sumamente preferible de por lo menos 99 %.

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

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

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

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

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

Unas variantes de la secuencia de nucleótidos que se ha descrito tendrán una identidad entre secuencias que será de manera preferible de por lo menos alrededor de 70 %, 80 %, 85 % o 90 % o por lo menos 95 % con unas secuencias de nucleótidos identificadas que codifican unas enzimas HPPD tales como las identificadas en la lista de secuencias.

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

Para la finalidad de la presente invención, la "identidad entre secuencias" de dos secuencias de nucleótidos o

aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias, alineadas de una manera óptima, que tienen restos idénticos ($\times 100$) dividido por el número de posiciones que se han comparado. Un intersticio, es decir una posición en una alineación en la que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, es considerado como una posición con restos no idénticos. La

- 5 alineación de las dos secuencias es realizada por el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch 1970). La anterior alineación de secuencias asistida por ordenador, se puede realizar convenientemente usando un programa lógico (software) clásico, tal como el GAP que es parte del paquete de Wisconsin Package Versión 10.1 (de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, EE.UU.) usando la matriz de calificación por defecto con una penalización por creación de un intersticio de 50 y una penalización por prolongación de un intersticio de 3.
- 10 Unas secuencias de nucleótidos homologas con las secuencias de nucleótidos que codifican una enzima HPPD de acuerdo con la invención pueden ser identificadas por un análisis in silico (en ordenador) de datos de secuencias genómicas.

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

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

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

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

- Unas sustituciones comprenden unas alteraciones de aminoácidos en las que un aminoácido es reemplazado por un diferente resto de aminoácido presente en la naturaleza o uno no convencional. Dichas sustituciones se pueden clasificar como "conservativas" cuando un resto de aminoácido contenido en una proteína HPPD de la presente invención es reemplazado por otro aminoácido presente en la naturaleza que tiene un carácter similar, por ejemplo Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln o Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr. Unas sustituciones comprendidas por la
- 55 presente invención pueden también ser "no conservativas", cuando un resto de aminoácido que está presente en una proteína HPPD de la presente invención es sustituido por un aminoácido que tiene propiedades diferentes, tal como un aminoácido presente en la naturaleza procedente de un diferente grupo (por ejemplo por sustitución de un aminoácido cargado o hidrófobo por alanina). Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos singulares, pero pueden ser también de restos múltiples, ya sea arracimados o dispersados. Las supresiones de
- 60 aminoácidos serán usualmente del orden de aproximadamente 1-10 restos de aminoácidos, mientras que las inserciones pueden ser de cualquier longitud. Las supresiones e inserciones se pueden hacer en el extremo terminal

de N, en el extremo terminal de C, o pueden ser supresiones o inserciones internas. Generalmente, unas inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán menores que unas fusiones en los terminales de amino o de carboxi y del orden de 1 a 4 restos de aminoácidos. El concepto de "aminoácidos similares", tal como se usa en el presente documento, se refiere a unos aminoácidos que tienen unas similares cadenas de aminoácidos, es decir unos aminoácidos que tienen cadenas laterales polares, no polares o prácticamente neutras. El concepto de "aminoácidos no similares", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a unos aminoácidos que tienen diferentes cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo un aminoácido con una cadena lateral polar no es similar a un aminoácido con una cadena lateral no polar. Las cadenas laterales polares tienden usualmente a estar presentes sobre la superficie de una proteína cuando ellas pueden interactuar con el entorno acuoso hallado en células (aminoácidos "hidrófilos"). Por otra parte, los aminoácidos "no polares" tienden a residir dentro del centro de la proteína en donde ellos pueden interactuar con vecinos no polares similares (aminoácidos "hidrófobos"). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina (todos ellos hidrófilos, excepto la cisteína que es hidrófoba). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina y triptófano (todos ellos hidrófobos, excepto la glicina que es neutra).

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

La invención se refiere también al uso, en un procedimiento para transformar plantas, de un ácido nucleico que codifica una HPPD de acuerdo con la invención como un gen marcador o como una secuencia codificadora que hace posible conferir a la planta una tolerancia a herbicidas que son agentes inhibidores de las HPPD, y al uso de los agentes inhibidores de las HPPD en plantas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de acuerdo con la invención. En una forma de realización de la presente invención, en dicho uso los agentes inhibidores de las HPPD son tricetonas o pirazolinatos, de manera preferible tembotriona, mesotriona o sulcotriona, biciclopirona y tefuriltriona. Desde luego, se entiende que esta secuencia se puede usar también en combinación con uno/una(s) otro/otra(s) marcador(es) de genes y/o secuencia(s) que codifica(n) una o más proteínas con propiedades agrícolas útiles.

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

Mientras que un cierto número de plantas cultivadas tolerantes a herbicidas están actualmente disponibles comercialmente, un tema que ha surgido para muchos/as herbicidas comerciales y combinaciones de herbicidas y plantas cultivadas, consiste en que los herbicidas individuales tienen típicamente un espectro incompleto de actividades contra especies de malezas corrientes. Para la mayor parte de los herbicidas individuales que han estado usándose desde hace algún tiempo, unas poblaciones de especies de malezas y biotipos resistentes a herbicidas han resultado más prevalecientes (véase por ejemplo, Tranel y Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen y Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Se han descrito unas plantas transgénicas que son resistentes a más de un herbicida (véase por ejemplo, el documento WO2005/012515). Sin embargo, se están demandando continuamente unas mejoras en cualquiera de los aspectos de la producción de plantas cultivadas, opciones de represión de malezas, prolongación de la represión de malezas residuales, y un mejoramiento en el rendimiento de plantas cultivadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Todos los rasgos de tolerancia a herbicidas, que antes se mencionan, pueden ser combinados con los que desarrollan una tolerancia a las HPPD que son materia objetivo de la presente invención.

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

Entre dichas secuencias de ADN que codifican proteínas de interés que confieren nuevas propiedades de tolerancia a insectos, se hará mención más particularmente a las proteínas Bt Cry o VIP, ampliamente descritas en la bibliografía y bien conocidas por los expertos en la especialidad. Éstas incluyen la proteína Cry1 F o híbridos derivados de una proteína Cry1 F (por ejemplo, las proteínas híbridas Cry1A-Cry1 F que se describen en los documentos US 6.326.169; US 6.281.016; US 6.218.188, o fragmentos tóxicos de las mismas), las proteínas del tipo Cry1A o fragmentos tóxicos de las mismas, de manera preferible la proteína Cry1Ac o híbridos derivados de la proteína Cry1Ac (por ejemplo, la proteína híbrida Cry1Ab-Cry1Ac que se describe en el documento US 5.880.275) o la proteína Cry1Ab o Bt2 o fragmentos insecticidas de la misma tal como se describen en el documento EP451878, las proteínas Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag tal como se describen en el documento WO02/057664 o fragmentos tóxicos de la misma, la proteína Cry1A.105 que se describe en el documento WO 2007/140256 (SEQ ID NO: 7) o un fragmento tóxico de la misma, la proteína VIP3Aa19 con el número de acceso al NCBI ABG20428, la proteína VIP3Aa20 con el número de acceso al NCBI ABG20429 (SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2007/142840), las proteínas VIP3A producidas durante los sucesos en algodón COT202 o COT203 (documentos WO 2005/054479 y WO 2005/054480, respectivamente), las proteínas Cry que se describen en el documento WO01/47952, la proteína VIP3Aa o un fragmento tóxico de la misma, tal como se describen tal como se describen en la cita de Estruch y col.

(1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28;93(11):5389-94 y en el documento US 6.291.156, las proteínas insecticidas procedentes de *Xenorhabdus* (tal como se describen en el documento WO98/50427), de *Serratia* (particularmente procedentes de *S. entomophila*) o de cepas de *Photorhabdus* especies, tales como las proteínas Tc procedentes de *Photorhabdus* tal como se describen en el documento WO98/08932 (por ejemplo, en las citas de Watercamp y col., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; y de Ffrench-Constant y Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5):828-33). También se incluyen en el presente contexto cualesquiera variantes o mutantes de cualquiera de estas proteínas que difieren en algunos (1-10, de manera preferible 1-5) aminoácidos con respecto de cualquiera de las anteriores secuencias, particularmente la secuencia de su fragmento tóxico, o que están fusionadas con un péptido de tránsito, tales como un péptido de tránsito de plastidio, u otra/o proteína o péptido.

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

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

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

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

Como una secuencia reguladora que funciona como un promotor en células de plantas y en plantas, se puede hacer uso de cualquier secuencia de promotor de un gen que sea expresado de modo natural en plantas, en particular de un promotor que sea expresado especialmente en las hojas de plantas, tal como por ejemplo de promotores "constitutivos" de origen bacteriano, vírico o vegetal, o de promotores "dependientes de la luz", tales como el de un gen de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilisasa/oxigenasa de plantas (RuBisCO) o de cualquier apropiado gen conocido expresable por promotores, que se pueda usar. Entre los promotores de origen vegetal, se hará mención a los promotores de histona como se describen en el documento EP 0 507 698 A1, el promotor de actina de arroz (documento US 5.641.876), o un promotor de ubiquitina vegetal (documento US 5.510.474). Entre los promotores de un gen de virus vegetal, se hará mención a los del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 19S o 35S, Sanders y col. (1987), Nucleic Acids Res. 15(4):1543-58.), los del circovirus (documento de patente australiana AU 689 311) o los del virus de mosaico de vena de Cassava (CsVMV, US 7.053.205). Se puede usar una secuencia de promotor específica para particulares regiones o tejidos de plantas con el fin de expresar las proteínas de HPPD de la invención, tales como promotores específicos para semillas (Datta, R. y col., 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296), especialmente el promotor de napina (documento EP 255 378 A1), el promotor de faseolina, el promotor de glutenina, el promotor de heliantina (documento WO 92/17580), el promotor de albúmina (documento WO 98/45460), el promotor de oleosina (documento WO 98/45461), el promotor de SAT1 o el promotor de SAT3 (documento PCT/US98/06978).

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

De acuerdo con la divulgación, se puede hacer uso también, en combinación con el promotor, de otras secuencias reguladoras, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificadora, tales como unos activadores de la

transcripción ("intensificadores"), por ejemplo el activador de la traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV), que se describe en el documento de solicitud WO 87/07644, o del virus de la corrosión del tabaco (TEV) que se ha descrito por Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597, por ejemplo, o intrones tales como el intrón adh1 de maíz o el intrón 1 de actina de arroz.

- 5 En una divulgación particular adicional, el gen de la invención está presente en plantas en múltiples, preferentemente dos, copias estando cada una de estas controladas por un promotor expresable en plantas distinto.

En una forma de realización particular adicional, el gen quimérico de la invención puede combinarse con cualquier gen quimérico adicional que codifique para una proteína HPPD, preferentemente estos genes distintos están controlados por elementos de regulación distintos que son activos en plantas.

- 10 En una divulgación particular adicional, el gen quimérico de la invención puede combinarse con un gen de CYP450 de monooxigenasa de maíz (gen nsf1), que está bajo el control de un promotor expresable en plantas idéntico o distinto.

- 15 Como una secuencia terminadora de regulación o de poliadenilación se puede hacer uso de cualquier correspondiente secuencia de origen bacteriano, tal como por ejemplo la del terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens*, de origen vírico, tal como por ejemplo la del terminador de CaMV 35S, o de origen vegetal, tal como por ejemplo la de un terminador de histona tal como se describe en la solicitud de patente publicada EP 0 633 317 A1.

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

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

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

A menos que se señale otra cosa distinta en los ejemplos, todos los procedimientos para producir y manipular un ADN recombinante se llevan a cabo por los procedimientos clásicos descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989), y en los volúmenes 1 y 2

de Ausubel y col. (1994) Current Protocols en Molecular Biology [Protocolos actuales en biología molecular], Current Protocols, USA. Materiales y procedimientos clásicos para el trabajo en biología molecular se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.R.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications (UK). Procedimientos para la tecnología de PCR (acrónimo de Polymerase Chain Reaction = reacción en cadena de la polimerasa) se pueden hallar en "PCR protocols: a guide to methods and applications" [Protocolos de PCR: una guía para procedimientos y aplicaciones], compilado por M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Academic Press, Inc., 1990).

Los términos "tolerancia", "tolerante" o "menos sensible" se usan intercambiamente y significan los niveles relativos de tolerancia inherente de la HPPD escrutada de acuerdo con un fenotipo indicador visible de la cepa o de la planta transformada con un ácido nucleico que comprende el gen que codifica la respectiva proteína HPPD en la presencia de diferentes concentraciones de los diversos agentes inhibidores de las HPPD. Unas respuestas a dosis y unos desplazamientos relativos en las respuestas a dosis asociadas con estos fenotipos indicadores (formación de color pardo, inhibición del crecimiento, blanqueo, efecto herbicida, etc) se expresan convenientemente en términos, por ejemplo, de valores de la GR50 (concentración para una reducción de 50 % del crecimiento) o de la MIC (concentración inhibidora mínima) en que unos aumentos en los valores corresponden a unos aumentos en la tolerancia inherente de la HPPD expresada, de la manera normal basada en un daño causado a plantas, síntomas de blanqueo meristemático, etc., en una gama de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos pueden ser expresados en términos de, por ejemplo, valores de GR50 derivados de las curvas de dosis/respuesta que tienen "una dosis" representada gráficamente en el eje de las x y "un porcentaje de destrucción", "un efecto herbicida", "números de plantas verdes que brotan", etc., representados en el eje de las y, en que unos valores de GR50 aumentados corresponden a unos niveles aumentados de tolerancia inherente de la HPPD expresada. Los herbicidas pueden ser aplicados de manera apropiada antes del brote o después del brote. De manera similar, el nivel de tolerancia del ácido nucleico o del gen que codifica una proteína HPPD de acuerdo con la invención o la proteína HPPD de la invención es escrutado mediante una transgénesis, una regeneración, una crianza y un ensayo por rociada de una planta de ensayo tal como una de tabaco, o una planta cultivada tal como una de soja o algodón, y de acuerdo con estos resultados, dichas plantas son por lo menos 2-4 veces más tolerantes a agentes inhibidores de la HPPD, tales como tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo y/o bicipropirona, que unas plantas que no contienen ningún gen exógeno que codifique una proteína HPPD, o que unas plantas que contienen un gen que codifica un ADN de HPPD de *Arabidopsis thaliana*, bajo el control del mismo promotor que el del ADN de HPPD de la invención.

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

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

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

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

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

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

En una forma de realización particular de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito se emplea en 5' (corriente arriba) de la secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD exógena de acuerdo con la invención, estando dispuesta esta secuencia de péptido de tránsito entre la región de promotor y la secuencia que codifica la HPPD exógena, de manera tal que se permite la expresión de una proteína de fusión del péptido de tránsito y de la HPPD, tal como la proteína de las SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7. El péptido de tránsito hace posible dirigir a las HPPD dentro de los plastidios, más especialmente de los cloroplastos, siendo disociada la proteína de fusión entre el péptido de tránsito y la proteína HPPD de la invención cuando esta última entra en el plastidio. El péptido de tránsito puede ser un único péptido, tal como un péptido de tránsito de EPSPS (que se describe en el documento de patente US 5.188.642) o un péptido de tránsito de la subunidad pequeña de ribulosa biscoxilasa/oxigenasa de plantas (RuBisCO ssu) que, cuando sea apropiado, incluye unos pocos aminoácidos de la parte terminal de N de la RuBisCO ssu madura (documento EP 189 707 A1), o bien puede ser una fusión de varios péptidos de tránsito tales como un péptido de tránsito que comprende un primer péptido de tránsito de una planta que está fusionado con una parte de la secuencia terminal de N de una proteína madura que tiene una localización en plastidio, siendo esta parte a su vez fusionada con un segundo péptido de tránsito de una planta, tal como se describe en el documento de patente EP 508 909 A1, y, más especialmente, el péptido de tránsito optimizado que comprende un péptido de tránsito de la RuBisCO ssu de girasol fusionado con 22 aminoácidos del extremo terminal de N de la RuBisCO ssu de maíz, a su vez fusionado con el péptido de tránsito de la RuBisCO ssu de maíz, tal como se describe, con su secuencia codificadora, en el documento de patente EP 508 909 A1.

La presente divulgación se refiere también a la proteína de fusión de un péptido de tránsito y una HPPD y a un ácido nucleico o un gen quimérico expresable en plantas que codifica dicha proteína de fusión, en que los dos elementos de esta proteína de fusión son tal como se han descrito anteriormente.

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

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

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

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

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

En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a una célula de planta hospedadora, a una semilla de planta hospedadora o a una planta hospedadora, caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD de la invención tal como se ha definido en el presente contexto, en que la HPPD de la invención es menos sensible que la HPPD endógena de la planta hospedadora a un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de los/las isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas o pirazolinatos, más especialmente isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, biciclopirona, tefuriltriona, topramezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂ fenil)propano-1,3-diona, incluso más particularmente tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo, biciclopirona, topramezona, pirazolato, benzofenap, sulcotriona, tefuriltriona, y pirasulfotol, de manera sumamente particular tembotriona, mesotriona y biciclopirona.

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a una célula de planta o a una planta, caracterizada porque ella contiene por lo menos una secuencia del ácido nucleico que codifica una HPPD de la invención tal como se ha descrito con anterioridad, y además un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas tal como se ha descrito más arriba, conectado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima PDH (pferenato deshidrogenasa) (documento US 2005/0257283).

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

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

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

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

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

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

Un procedimiento de transformación de acuerdo con la presente invención comprende bombardear células, protoplastos o tejidos con partículas sólidas o líquidas a las cuales se ha añadido un ADN, o que contienen un ADN. Otro procedimiento de transformación comprende usar, como el medio para transferir a la planta, un gen quimérico que es introducido en un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Se pueden usar otros procedimientos tales como una microinyección o electroporación, o dirigir de otro modo la transferencia del gen usando PEG. La persona experta puede seleccionar cualquier procedimiento apropiado para transformar el organismo hospedador que se ha de elegir, en particular la célula de planta o la planta, tal como por ejemplo, la tecnología para la transformación de soja ha sido descrita extensamente en los ejemplos 1 hasta 3 desvelados en el documento EP 1186666 A1. Para el arroz, se podrían realizar una transformación mediada por *Agrobacterium* (Hiei y col., 1994 Plant J 6:271-282, y Hiei y col., 1997 Plant Mol Biol. 35:205-21), una electroporación

(documentos US 5.641.664 y US 5.679.558), o un bombardeo (Christou y col., 1991, Biotechnology 9:957). Una apropiada tecnología para la transformación de plantas monocotiledóneas, y particularmente de arroz, se describe en el documento WO 92/09696. Para el algodón, se han descrito una transformación mediada por *Agrobacterium* (Gould J.H. y Magallanes-Cedeno M., 1998 Plant Molecular Biology reporter, 16:1-10 y Zapata C., 1999, Theoretical Applied Genetics, 98(2):1432-2242 incorporadas en el presente documento como referencia), transformación mediada por polibreno y/o por tratamiento (Sawahel W.A., 2001, - Plant Molecular Biology reporter, 19:377a-377f).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sinapis, Solanum, Sonchus, Sphenoclea, Stellaria, Taraxacum, Thlaspi, Trifolium, Urtica, Veronica, Viola, Xanthium.

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

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

- modificaciones recombinantes de plantas cultivadas, para las finalidades de modificar el almidón sintetizado en las plantas (por ejemplo, los documentos WO 92/11376, WO 92/14827 y WO 91/19806),
- plantas cultivadas transgénicas, que son resistentes a ciertos herbicidas del tipo de glufosinato (compárense, por ejemplo los documentos EP-A-0242236, EP-A-0242246) o del tipo de glifosato (documento WO 92/00377) o del tipo de las sulfonil-ureas (documentos EP-A-0257993 y US-A-5013659),
- plantas cultivadas transgénicas, por ejemplo de maíz, algodón o especies de soja, que son capaces de producir toxinas de *Bacillus thuringiensis* (toxinas de Bt), o híbridos o mutantes de las mismas, que hacen a las plantas resistentes contra determinadas plagas (documento EP-A-0193259),
- plantas cultivadas transgénicas con una composición modificada de ácidos grasos (documento WO 91/13972),
- plantas cultivadas modificadas genéticamente con nuevas sustancias constitutivas o metabolitos secundarios, por ejemplo nuevas fitoalexinas, que establecen una resistencia aumentada contra las enfermedades (documentos EPA 309862, EPA 0464461),
- plantas modificadas genéticamente con una fotorrespiración reducida, que presentan más altos rendimientos de cosechas y una más alta tolerancia frente al estrés, (documento EPA 0305398),
- plantas cultivadas transgénicas, que producen proteínas importantes farmacéutica o diagnósticamente (en inglés "molecular pharming" = farmacología molecular),
- plantas cultivadas transgénicas, que se distinguen por más altos rendimientos de cosechas o por una mejor calidad,
- plantas cultivadas transgénicas, que se distinguen por una combinación de nuevas propiedades tal como una combinación de las nuevas propiedades arriba mencionadas (en inglés "gene stacking" = amontonamiento de genes).

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

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

La generación de células de plantas con una actividad disminuida de un producto génico se puede conseguir por ejemplo mediante la expresión de por lo menos un correspondiente ARN antisentido, de un ARN del mismo sentido para conseguir un efecto de supresión conjunta, o de una combinación de ARN tanto de antisentido como del mismo sentido que forma una molécula de ARN silenciosa de doble hebra (ARNi), o mediante la expresión de por lo menos una ribozima correspondientemente construida, que disocia específicamente a transcritos del producto génico antes mencionado. Para hacer esto, es posible en primer lugar usar unas moléculas de ADN, que comprenden la totalidad de la secuencia codificadora de un producto génico, inclusive cualesquiera secuencias flanqueadoras que puedan estar presentes, o también moléculas de ADN, que comprenden solamente partes de la secuencia codificadora, siendo necesario que estas partes sean lo suficientemente largas como para establecer en las células un efecto

antisentido. Es posible también usar unas secuencias de ADN que tienen un alto grado de homología con respecto a las secuencias codificadoras de un producto génico, pero que no son totalmente idénticas.

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

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

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

En las plantas, células de plantas o semillas de la invención, se prefiere emplear el herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topramezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topramezona, biciclopirona, tefuriltriona y mesotriona, más particularmente tembotriona en plantas cultivadas transgénicas que son también resistentes a agentes reguladores del crecimiento tales como, por ejemplo, dicamba, o contra herbicidas que inhiben a esenciales enzimas vegetales, por ejemplo acetolactato sintasas (ALS), EPSP sintasas, glutamina sintasas (GS) o hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), o contra herbicidas tomados del conjunto que consiste en las sulfonilureas, glifosato, glufosinato o benzoilisoxazoles y sustancias activas análogos.

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

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

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

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

Los requeridos agentes auxiliares para formulaciones, tales como materiales inertes, agentes tensioactivos, disolventes y otros materiales aditivos, son asimismo conocidos y se describen, por ejemplo, en las obras de: Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers" (Manual de diluyentes y vehículos para polvos finos insecticidas), 2ª edición, Darland Books, Caldwell N.J.; H.v. Olphen "Introduction to Clay Colloid Chemistry" (Introducción a la química de los coloides de arcillas), 2ª edición, J. Wiley & Sons, N.Y.; C. Marsden, "Solvents Guide" (Guía de disolventes), 2ª edición, Interscience, N.Y. 1963; "Detergents and Emulsifiers Annual" (Anual de detergentes y emulsionantes) de McCutcheon, MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley y Wood, "Encyclopedia of

Surface Active Agents" (Enciclopedia de agentes tensioactivos), Chem. Publ. Co. Inc., N.Y. 1964; Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte" (Aductos con óxido de etileno interfacialmente activos), Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" (Tecnología química), tomo 7, editorial C. Hanser Munich, 4ª edición de 1986.

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

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

- 20 Los concentrados emulsionables se preparan por disolución de la sustancia activa en un disolvente orgánico, por ejemplo butanol, ciclohexanona, dimetil-formamida, xileno o también compuestos aromáticos o hidrocarburos de punto de ebullición más alto o mezclas de los disolventes orgánicos, con adición de uno o varios agentes tensioactivos de tipos iónicos y/o no iónicos (agentes emulsionantes). Ejemplos de agentes emulsionantes que se pueden usar son: alquil-aril-sulfonatos de calcio tales como dodecil-benceno-sulfonato de Ca, o emulsionantes no iónicos, tales como ésteres de poliglicoles con ácidos grasos, alquil-aril-poliglicol éteres, (alcohol graso) poliglicol éteres, condensados de óxido de propileno y óxido de etileno, alquil poliéteres, ésteres de sorbitán tales como, por
- 25 ejemplo, ésteres con ácidos grasos de sorbitán, o poli(oxietilen)-ésteres de sorbitán, tales como, por ejemplo, poli(oxietilen)-ésteres con ácidos grasos de sorbitán.

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

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

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

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

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

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

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

Por regla general, las formulaciones agroquímicas comprenden de 0,1 a 99 % en peso, en particular de 0,1 a 95 % en peso, de compuestos conformes la invención. En polvos humectables, la concentración de una sustancia activa

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

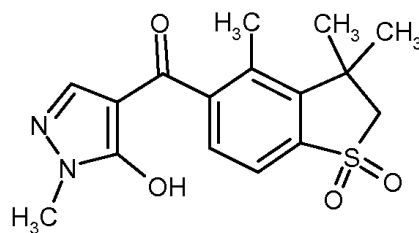
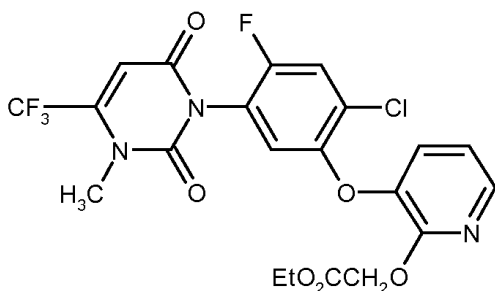
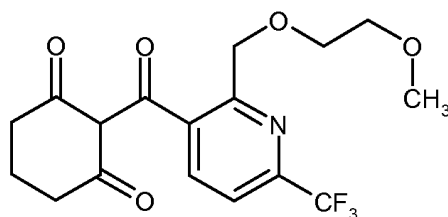
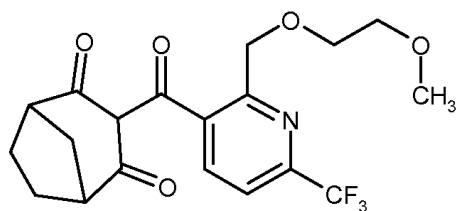
Por añadidura, las mencionadas formulaciones de sustancias activas comprenden, si fuese apropiado, los agentes auxiliares que son convencionales en cada caso, tales como agentes adhesivos, humectantes, dispersantes, emulsionantes, penetrantes, conservantes, protectores frente a las heladas y disolventes,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

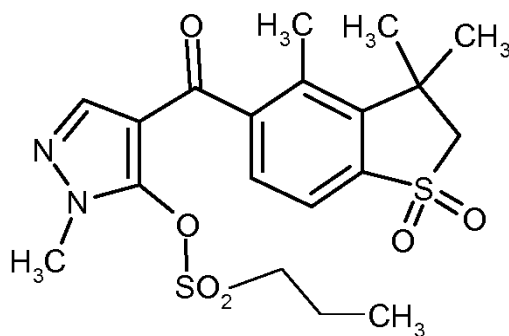
A base de estas formulaciones, es también posible preparar combinaciones de un herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre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

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

acetocloro; acibenzolar, acibenbenzolar-S-metilo, acifluorfen, acifluorfen-sodio, aclonifeno, alacloro, alidocloro, aloxidim, aloxidim-sodio, ametrina, amicarbazona, amidocloro, amidosulfurón, aminociclopiraclo, aminopirialida, amitrol, sulfamato de amonio, ancimidol, anilofos, asulam, atrazina, azafenidina, azimsulfurón, aziprotrina, BAH-043, BAS-140H, BAS-693H, BAS-714H, BAS-762H, BAS-776H, BAS-800H, beflubutamida, benazolina, benazolina-etilo, bencarbazona, benfluralina, benfuresato, bensulida, bensulfurón-metilo, bentazona, benzofendizona, benzobiciclona, benzofenap, benzofluoro, benzoilprop, bifenox, bilanafos, bilanafos-sodio, bispiribac, bispiribac-sodio, bromacilo, bromobutida, bromofenoxima, bromoxinilo, bromurón, buminafos, busoxinona, butacloro, butafenacilo, butamifos, butenaclo, butralina, butroxidim, butilato, cafenstrol, carbetamida, carfentrazona, carfentrazona-etilo, clometoxifeno, cloramben, clorazifop, clorazifop-butilo, clorobromurón, clorobufam, clorfenac, clorfenac-sodio, clorfenprop, cloroflurenol, cloroflurenol-metilo, cloridazona, clorimurón, clorimurón-etilo, cloromequat-cloruro, cloronitrofen, cloroftalim, clortal-dimetilo, clorotolurón, clorosulfurón, cinidon, cinidon-etilo, cinmetilina, cinosulfurón, cletodim, clodinafop, clodinafop-propargilo, clofencet, clomazona, clomeprop, cloprop, clopiralida, cloransulam, cloransulam-metilo, cumilurón, cianamida, cianazina, ciclanilida, cicloato, ciclosulfamurón, cicloxidim, ciclurón, cihalofop, cihalofop-butilo, ciperquat, ciprazina, ciprazol, 2,4-D, 2,4-DB, daimurón/dimron, dalapon, daminozida, dazomet, n-decanol, desmedifam, desmetrina, detosil-pirazolato (DTP), di-alato, dicamba, diclobenilo, dicloroprop, dicloroprop-P, diclofop, diclofop-metilo, diclofop-P-metilo, diclosulam, dietatilo, dietatilo-etilo, difenoxurón, difenzoquat, diflufenican, diflufenzopir, diflufenzopir-sodio, dimefurón, dikegulac-sodio, dimefurón, dimepiperato, dimetaclo, dimetametrina, dimetenamida, dimetenamida-P, dimetipina, dimetrasulfurón, dinitramina, dinoseb, dinoterb, difenamida, dipropetrina, diquat, diquat-dibromuro, ditiopir, diurón, DNOC, eglinazina-etilo, endotal, EPTC, esprocarb, etalfluralina, etametsulfurón-metilo, etefon, etidimurón, etiozina, etofumesato, etoxifeno, etoxifeno-etilo, etoxisulfurón, etobenzanida, F-5331, es decir N-[2-cloro-4-fluoro-5-[4-(3-fluoro-propil)-4,5-dihidro-5-oxo-1H-

tetrazol-1-il-fenil]-etano-sulfonamida, fenoprop, fenoxaprop-P, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-etilo, fentrazamida, fenurón, flamprop, flamprop-M-isopropilo, flamprop-M-metilo, flazasulfurón, florasulam, fluazifop, fluazifop-P, fluazifop-butilo, fluazifop-P-butilo, fluazolato, flucarbazona, flucarbazona-sodio, flucetosulfurón, flucloalrina, flufenacet (tiafluamida), flufenpir, flufenpir-etilo, flumetralina, flumetsulam, flumiclorac, flumiclorac-pentilo, flumioxazina, flumipropina, fluometurón, fluorodifeno, fluoroglicofeno, fluoroglicofeno-etilo, flupoxam, flupropacilo, flupropanato, flupirsulfurón, flupirsulfurón-metil-sodio, flurenol, flurenol-butilo, fluridona, flurocloridona, fluroxipir, fluroxipir-meptilo, flurprimidol, flurtamona, flutiacet, flutiacet-metilo, flutiamida, fomesafeno, foramsulfurón, forclorfenurón, fosamina, furiloxifeno, ácido giberélico, glufosinato, L-glufosinato, L-glufosinato-amonio, glufosinato-amonio, glifosato, glifosato-isopropilamonio, H-9201, halosafeno, halosulfurón, halosulfurón-metilo, haloxifop, haloxifop-P, haloxifop-etoxietilo, haloxifop-P-etoxietilo, haloxifop-metilo, haloxifop-P-metilo, hexazinona, HNPC-9908, HOK-201, HW-02, imazametabenz, imazametabenz-metilo, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquina, imazetapir, imazosulfurón, inabenfida, indanofan, ácido indol-acético (IAA), ácido 4-indol-3-il-butírico (IBA), yodosulfurón, yodosulfurón-metil-sodio, ioxinilo, isocarbamida, isopropalina, Isoprotrún, isourón, isoxabeno, isoxaclortol, isoxaflutol, isoxapirifop, KUH-043, KUH-071, karbutilato, ketospiradox, lactofeno, lenacilo, linurón, hidrazida de ácido maleico, MCPA, MCPB, MCPB-metilo, -etilo y -sodio, mecoprop, mecoprop-sodio, mecoprop-butotilo, mecoprop-P-butotilo, mecoprop-P-dimetilamonio, mecoprop-P-2-etil-hexilo, mecoprop-P-potasio, mefenacet, mefluidida, mepiquat-cloruro, mesosulfurón, mesosulfurón-metilo, metabenzotiazurón, metam, metamifop, metamitron, metazacloro, metazol, metoxifenona, metildimron, 1-metil-ciclopropeno, isotiocianato de metilo, metobenzurón, metobenzurón, metobromurón, metolacloro, S-metolacloro, metosulam, metoxurón, metribuzina, metsulfurón, metsulfurón-metilo, molinato, monalida, monocarbamida, monocarbamida dihidrógeno sulfato, monolinurón, monosulfurón, monurón, MT 128, MT-5950, es decir N-[3-cloro-4-(1-metil-etil)-fenil]-2-metil-pentanamida, NGGC-011, naproanilida, nappropamida, naptalam, NC-310, es decir 4-(2,4-dicloro-benzoil)-1-metil-5-benciloxi-pirazol, neburón, nicosulfurón, nipiraclofeno, nitralina, nitrofeno, nitrofenolato-sodio (mezcla de isómeros), nitrofluorfenol, ácido nonanoico, norflurazona, orbencarb, ortosulfamurón, orizalina, oxadiargilo, oxadiazona, oxasulfurón, oxaziclomefona, oxifluorfenol, paclobutrazol, paraquat, paraquat dicloruro, ácido pelargónico (ácido nonanoico), pendimetalina, pendralina, penoxsulam, pentanocloro, pentoxazona, perfluidona, petoxamida, fenisofam, fenmedifam, fenmedifam-etilo, picloram, picolinafenol, pinoxaden, piperofos, pirifenop, pirifenop-butilo, pretilacloro, primisulfurón, primisulfurón-metilo, probenazol, profuazol, procizafna, prodiamina, prifluralina, profoximid, prohexadiona, prohexadiona-calcio, prohidrojasmona, prometón, prometrina, propacloro, propanilo, propaquizafop, propazina, profam, propisocloro, propoxicarbazona, propoxicarbazona-sodio, propizamida, prosulfalina, prosulfocarb, prosulfurón, prinacolor, piraclonilo, piraflufeno, piraflufeno-etilo, pirasulfotol, pirazolinato (pirazolato), pirazosulfurón-etilo, pirazoxifeno, piribambenz, piribambenz-isopropilo, piribenzoxima, piributicarb, piridafol, piridato, piriftalida, piriminobac, piriminobac-metilo, pirimisulfano, piritiobac, piritiobac-sodio, piroxasulfona, piroxsulam, quinclorac, quinmerac, quincloamina, quizalofop, quizalofop-etilo, quizalofop-P, quizalofop-P-etilo, quizalofop-P-tefurilo, rimsulfurón, saflufenacilo, secbumetona, setoxidim, sidurón, simazina, simetrina, SN-106279, sulcotriona, sulfalato (CDEC), sulfentrazona, sulfometurón, sulfometurón-metilo, sulfosato (glifosato-trimesio), sulfosulfurón, SYN-523, SYP-249, SYP-298, SYP-300, tebutam, tebutiurón, tecnazeno, tepraloxidim, terbacilo, terbucarb, terbucloro, terbumetona, terbutilazina, terbutrina, TH-547, tenilcloro, tiafluamida, tiazafurón, tiazopir, tidiazimina, tidiazurón, tiencarbazona, tiencarbazona-metilo, tifensulfurón, tifensulfurón-metilo, tiobencarb, tiocarbazilo, ralkoxidim, tri-alato, triasulfurón, triaziflam, triazofenamida, tribenurón, tribenurón-metilo, ácido tricloroacético (TCA), triclopír, tridifano, trietazina, trifloxisulfurón, trifloxisulfurón-sodio, trifluralina, triflusulfurón, triflusulfurón-metilo, trimeturón, trinexapac, trinexapac-etilo, tritosulfurón, tsitodef, uniconazol, uniconazol-P, vernolato, ZJ-0166, ZJ-0270, ZJ-0543, ZJ-0862 así como los siguientes compuestos



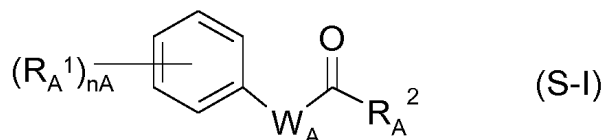


La tasa de aplicación requerida del herbicida inhibidor de las HPPD de la clase de las tricetonas, tales como tembotriona, sulcotriona y mesotriona, o de la clase de los pirazolinatos, tales como pirasulfotol y topamezona, particularmente seleccionado entre tembotriona, sulcotriona, topamezona, biciclopirona,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

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

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

A) compuestos de la fórmula (S-I)

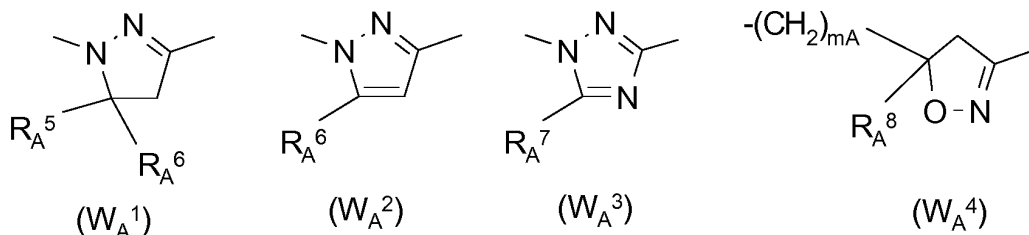


en la que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

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

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

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



m_A es 0 o 1;

R_A^2 es OR_A^3 , SR_A^3 o $NR_A^3R_A^4$ o un heterociclo de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno y hasta 3 heteroátomos, preferentemente tomados entre el conjunto que consiste en O y S, que está unido a través del átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo en (S-I), y que está sin sustituir o sustituido con radicales tomados entre el conjunto que consiste en alquilo de (C_1 - C_4), alcoxi de (C_1 - C_4) y fenilo

eventualmente sustituido, preferentemente un radical de las fórmulas OR_A^3 , NHR_A^3 o $N(CH_3)_2$, en particular de la fórmula OR_A^3 ;

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

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

R_A^5 es H, alquilo de (C_1-C_8) , halo-alquilo de (C_1-C_8) , alcoxi de (C_1-C_4) -alquilo de (C_1-C_8) , ciano o $COOR_A^9$, en que R_A^9 es hidrógeno, alquilo de (C_1-C_8) , halo-alquilo de (C_1-C_8) , alcoxi de (C_1-C_4) -alquilo de (C_1-C_4) , hidroxialquilo de (C_1-C_6) , cicloalquilo de (C_3-C_{12}) o tri-alquilo de (C_1-C_4) -sililo;

10 R_A^6 , R_A^7 , R_A^8 son idénticos o diferentes, y son hidrógeno, alquilo de (C_1-C_8) , halo-alquilo de (C_1-C_8) , cicloalquilo de (C_3-C_{12}) , o fenilo sustituido o sin sustituir;

preferentemente:

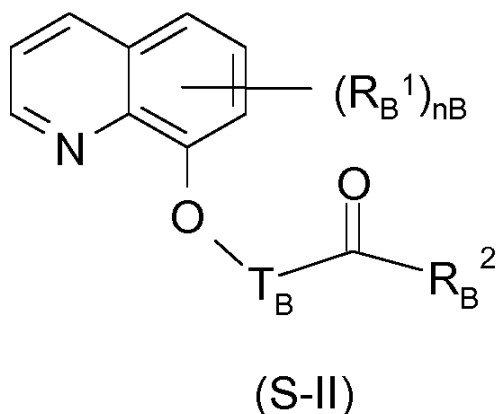
15 a) compuestos del tipo del ácido dicloro-fenil-pirazolina-3-carboxílico, de modo preferido compuestos tales como 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-(etoxicarbonil)-5-metil-2-pirazolina-3-carboxilato de etilo (S1-1), ("mefenpir-dietilo", véase el Manual de los Plaguicidas), y compuestos afines, tal como se describen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

20 b) derivados del ácido dicloro-fenil-pirazol-carboxílico, de modo preferido compuestos tales como 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-metil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-2), 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-isopropil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-3), 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1,1-dimetil-etil)pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-4), 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-fenil-pirazol-3-carboxilato de etilo (S1-5) y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-333 131 y EP-A-269 806;

c) compuestos del tipo de los ácidos triazol-carboxílicos, de modo preferido compuestos tales como el fenclorazol-(éster etilo), es decir 1-(2,4-dicloro-fenil)-5-triclorometil-(1H)-1,2,4-triazol-3-carboxilato de etilo (S1-6), y compuestos afines tal como se describen en los documentos EP-A-174 562 y EP-A-346 620;

25 d) compuestos del tipo de los ácidos 5-bencil- o 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílicos, o del ácido 5,5-difenil-2-isoxazolina-3-carboxílico, de modo preferido compuestos tales como 5-(2,4-dicloro-bencil)-2-isoxazolina-carboxilato de etilo (S1-7) o 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxilato de etilo (S1-8) y compuestos afines, tal como se describen en el documento WO 91/08202, o respectivamente 5,5-difenil-2-isoxazolina-carboxilato de etilo (S1-9) ("isoxadifenoetilo") o 5,5-difenil-2-isoxazolina-carboxilato de n-propilo (S1-10) o 5-(4-fluoro-fenil)-5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxilato de etilo (S1-11), tal como se describen en la solicitud de patente documento WO-A-95/07897.

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



en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

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

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

R_B^2 OR_B^3 , SR_B^3 o $NR_B^3R_B^4$

40 o un heterociclo de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno y hasta 3 heteroátomos, preferentemente tomados entre el conjunto que consiste en O y S, que está unido a través del átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo en (S-II), y que está sin sustituir o sustituido con radicales tomados entre el conjunto que consiste en alquilo de (C_1-C_4) , alcoxi de (C_1-C_4) o fenilo eventualmente sustituido, preferentemente un radical de las fórmulas OR_B^3 , NHR_B^4 o $N(CH_3)_2$, en particular de la fórmula OR_B^3 ;

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

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

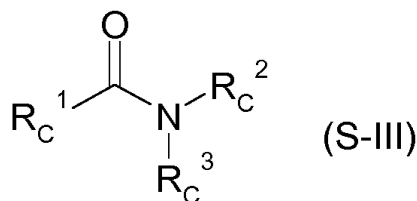
T_B es una cadena de alcano de (C_1 o C_2)-diilo, que está sin sustituir o sustituida con uno o dos radicales de (C_1 - C_4) o con [alcoxi de (C_1 - C_3)]-carbonilo;

preferentemente:

- 5 a) compuestos del tipo del ácido 8-quinolinoxi-acético (S2), de modo preferido (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de (1-metil-hexilo), (nombre común "cloquintocet-mexilo" (S2-1), (véase el Manual de los Plaguicidas), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 1,3-dimetilbut-1-ilo (S2-2), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 4-aliloxibutilo (S2-3), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 1-aliloxiprop-2-ilo (S2-4),
10 (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de etilo (S2-5), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de metilo (S2-6), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de alilo (S2-7), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 2-(2-propilideniminooxi)-1-etilo (S2-8), (5-cloro-8-quinolinoxi)-acetato de 2-oxo-propilo (S2-9)
15 y compuestos afines, tal como se describen en los documentos EP-A-86 750, EP-A-94 349 y EP-A-191 736 o EP-A-0 492 366, y también sus hidratos y sales tal como se describen en el documento WO-A-2002/034048.

- b) compuestos del tipo del ácido (5-cloro-8-quinolinoxi)-malónico, de modo preferido compuestos tales como (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de dietilo, (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de dialilo, (5-cloro-8-quinolinoxi)-malonato de metilo y etilo, y compuestos
20 afines, tal como se describen en el documento EP-A-0 582 198.

C) Compuestos de la fórmula (S-III)



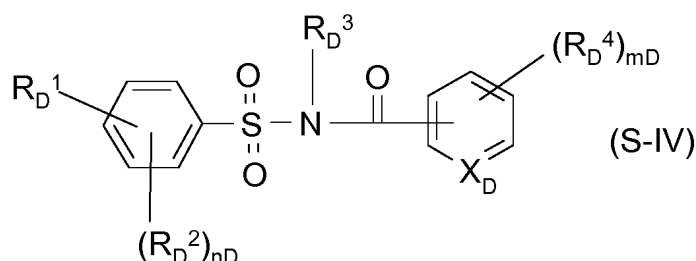
en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

- 25 R_C^1 es alquilo de (C_1 - C_4), halo-alquilo de (C_1 - C_4), alqueno de (C_2 - C_4), halo-alqueno de (C_2 - C_4), cicloalquilo de (C_3 - C_7), preferentemente diclorometilo; R_C^2 , R_C^3 son idénticos o diferentes y son hidrógeno, alquilo de (C_1 - C_4), alqueno de (C_2 - C_4), alquino de (C_2 - C_4), halo-alquilo de (C_1 - C_4), halo-alqueno de (C_2 - C_4), alquil de (C_1 - C_4)-carbamoil-alquilo de (C_1 - C_4), alqueno de (C_2 - C_4)-carbamoil-alquilo de (C_1 - C_4), alcoxi de (C_1 - C_4)-alquilo de (C_1 - C_4), dioxolanil-alquilo de (C_1 - C_4), tiazolilo, furilo, furil-alquilo, tienilo, piperidilo, fenilo sustituido o sin sustituir, o R_C^2 y R_C^3 forman en común un
30 anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, preferentemente un anillo de oxazolidina, tiazolidina, piperidina, morfolina, hexahidropirimidina o benzoxazina; preferentemente:

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

- 35 "diclormida" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= N,N-dialil-2,2-dicloro-acetamida),
"R-29148" (= 3-dicloroacetil-2,2,5-trimetil-1,3-oxazolidona de Stauffer),
"R-28725" (= 3-dicloroacetil-2,2,5-dimetil-1,3-oxazolidona de Stauffer),
"benoxacor" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= 4-dicloroacetil-3,4-dihidro-3-metil-2H-1,4-benzoxazina).
40 "PPG-1292" (= N-alil-N[(1,3-dioxolan-2-il)-metil]dicloroacetamida de PPG Industries),
"DKA-24" (= N-alil-N[(alilaminocarbonil)-metil]dicloroacetamida de Sagro-Chem),
"AD-67" o "MON 4660" (= 3-dicloroacetil-1-oxa-3-aza-espiro[4,5]decano de Nitrokemia o respectivamente Monsanto),
"Ti-35" (= 1-dicloroacetil-azepano de TRI-Chemical RT)
45 "diclonona" (diclonona) o "BAS145138" o "LAB145138" (= 3-dicloroacetil-2,5,5-trimetil-1,3-diaza-biciclo[4.3.0]nonano de ASF) y
"furlazol" o "MON 13900" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= (RS)-3-dicloroacetil-5-(2-furil)-2,2-dimetil-oxazolidona)

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



en la que

X_D es CH o N;

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

R_D^2 es halógeno, halo-alquilo de (C₁-C₄), halo-alcoxi de (C₁-C₄), nitro, alquilo de (C₁-C₄), alcoxi de (C₁-C₄), alquil de (C₁-C₄)-sulfinilo, alcoxi de (C₁-C₄)-carbonilo o alquil de (C₁-C₄)-carbonilo;

R_D^3 es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₄), alqueno de (C₂-C₄) o alquino de (C₂-C₄);

R_D^4 es halógeno, nitro, alquilo de (C₁-C₄), halo-alquilo de (C₁-C₄), halo-alcoxi de (C₁-C₄), cicloalquilo de (C₃-C₆), fenilo, alcoxi de (C₁-C₄), ciano, alquil de (C₁-C₄)-tio, alquil de (C₁-C₄)-sulfinilo, alquil de (C₁-C₄)-sulfonylo, alcoxi de (C₁-C₄)-carbonilo o alquil de (C₁-C₄)-carbonilo;

R_D^5 es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), cicloalquilo de (C₃-C₆), alqueno de (C₂-C₆), alquino de (C₂-C₆), cicloalqueno de (C₅-C₆), fenilo o heterociclilo de 3 a 6 miembros que contiene v_D heteroátomos tomados entre el conjunto que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, realizándose que los siete radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C₁-C₆), halo-alcoxi de (C₁-C₆), alquil de (C₁-C₂)-sulfinilo, alquil de (C₁-C₂)-sulfonylo, cicloalquilo de (C₃-C₆), alcoxi de (C₁-C₄)-carbonilo, alquil de (C₁-C₄)-carbonilo y fenilo y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C₁-C₄) y halo-alquilo de (C₁-C₄);

R_D^6 es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alqueno de (C₂-C₆) o alquino de (C₂-C₆), en que los tres radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D radicales tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, hidróxido, alquilo de (C₁-C₄), alcoxi de (C₁-C₄) y alquil de (C₁-C₄)-tio, o

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

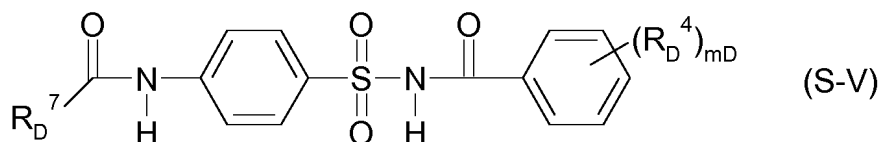
R_D^7 es hidrógeno, alquil de (C₁-C₄)-amino, di-alquil de (C₁-C₄)-amino, alquilo de (C₁-C₆), cicloalquilo de (C₃-C₆), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C₁-C₄), halo-alcoxi de (C₁-C₆) y alquil de (C₁-C₄)-tio y en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C₁-C₄) y halo-alquilo de (C₁-C₄);

n_D es 0, 1 o 2;

m_D es 1 o 2;

v_D es 0, 1, 2 o 3;

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



en la que

R_D^7 significa alquilo de (C₁-C₆), cicloalquilo de (C₃-C₆), en que los 2 radicales mencionados en último término están sustituidos con v_D sustituyentes, tomados entre el conjunto que consiste en halógeno, alcoxi de (C₁-C₄), halo-alcoxi de (C₁-C₆) y alquil de (C₁-C₄)-tio y, en el caso de radicales cíclicos, también están sustituidos con alquilo de (C₁-C₄) y halo-alquilo de (C₁-C₄);

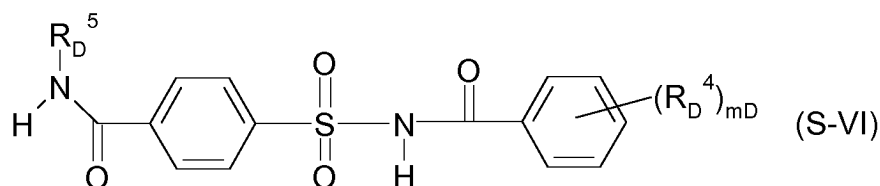
R_D^5 significa halógeno, alquilo de (C₁-C₄), alcoxi de (C₁-C₄), CF_3 ;

m_D significa 1 o 2;

v_D es 0, 1, 2 o 3;

y también

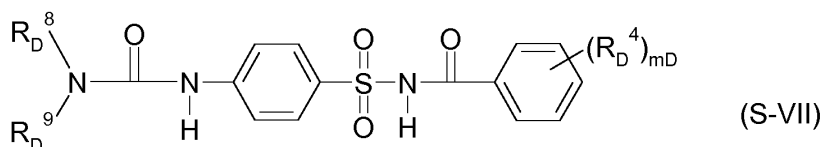
acilsulfamoílbzenamidas, por ejemplo de la siguiente fórmula (S-VI), que son conocidas, por ejemplo, a partir del documento WO 99/16744,



por ejemplo aquellas en que

R_D^5 = ciclopropilo y (R_D^4) = 2-OMe ("ciprosulfamida", S3-1),
 R_D^5 = ciclopropilo y (R_D^4) = 5-Cl-2-OMe (S3-2),
 R_D^5 = etilo y (R_D^4) = 2-OMe (S3-3),
 R_D^5 = isopropilo y (R_D^4) = 5-Cl-2-OMe (S3-4) y
 R_D^5 = isopropilo y (R_D^4) = 2-OMe (S3-5);
 y también

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



en la que

R_D^8 y R_D^9 independientemente uno de otro son hidrógeno, alquilo de (C_1-C_8) , cicloalquilo de (C_3-C_8) , alqueno de (C_3-C_6) , alquino de (C_3-C_6) ,
 R_D^4 es halógeno, alquilo de (C_1-C_4) , alcoxi de (C_1-C_4) , CF_3
 mD es 1 o 2;
 de ellos en particular
 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,
 1-[4-(N-2-metoxibenzoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,
 1-[4-(N-4,5-dimetilbenzoilsulfamoil)fenil]-3-metil-urea,
 1-[4-(N-naftoilsulfamoil)fenil]-3,3-dimetil-urea,

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

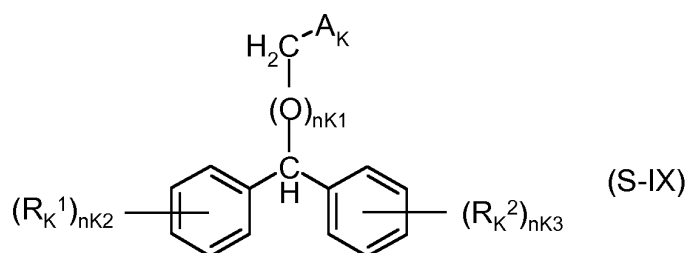
3,4,5-triacetoxi-benzoato de etilo, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido 4-hidroxi-salicílico, ácido 4-fluoro-salicílico, 1,2-dihidro-2-oxo-6-trifluorometil-piridina-3-carboxamida, ácido 2-hidroxi-cinámico, 2,4-dicloro-cinámico, tal como se describen en los documentos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

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

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

"dimepiperato" o "MY-93" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= piperidina-1-tio-carboxilato de S-1-metil-1-fenil-etilo), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por el herbicida molinato,
 "daimurón" o "SK 23" (véase el Manual de los Plaguicidas) (= 1-(1-metil-1-fenil-etil)-3-p-tolil-urea), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por el herbicida imazosulfurón,
 "cumilurón" = "JC-940" (= 3-(2-clorofenilmetil)-1-(1-metil-1-feniletil)urea, véase el documento de solicitud de patente japonesa JP-A-60087254), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por algunos herbicidas,
 "metoxifenona" o "NK 049" (= 3,3'-dimetil-4-metoxi-benzofenona), que es conocido como antídoto para arroz contra daños causados por algunos herbicidas,
 "CSB" (= 1-bromo-4-(clorometilsulfonil)benzeno) (CAS N° de Reg. 54091-06-4 de Kumiai), que es conocido como antídoto contra daños causados por algunos herbicidas en arroz,

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



en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

R_K^1 , R_K^2 independientemente uno de otro, son halógeno, alquilo de (C₁-C₄), alcoxi de (C₁-C₄), halo-alquilo de (C₁-C₄), alquil de (C₁-C₄)-amino, di-alquil de (C₁-C₄)-amino, nitro; A_K es COOR_K³ o COOR_K⁴

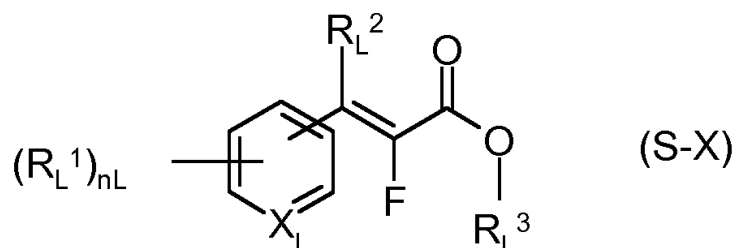
R_K^3 , R_K^4 independientemente uno de otro, son hidrógeno, alquilo de (C₁-C₄), alquenilo de (C₂-C₆), alquinilo de (C₂-C₄), cianoalquilo, halo-alquilo de (C₁-C₄), fenilo, nitrofenilo, bencilo, halobencilo, piridinilalquilo o alquilamonio, n_K^1 0 o 1

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

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

L) compuestos de la fórmula (S-X),

como se describen en el documento WO A-98/27049



en que los símbolos e índices tienen los siguientes significados:

X_L es CH o N,

n_L para el caso de que sea $X = N$, es un número entero de 0 hasta 4 y

para el caso de que sea $X = CH$, es un número entero de 0 hasta 5,

R_L^1 es halógeno, alquilo de (C₁-C₄), halo-alquilo de (C₁-C₄), alcoxi de (C₁-C₄), halo-alcoxi de (C₁-C₄), nitro, alquil de (C₁-C₄)-tio, alquil de (C₁-C₄)-sulfonilo, alcoxi de (C₁-C₄)-carbonilo, fenilo opcionalmente sustituido, fenoxi opcionalmente sustituido,

R_L^2 es hidrógeno o alquilo de (C₁-C₄),

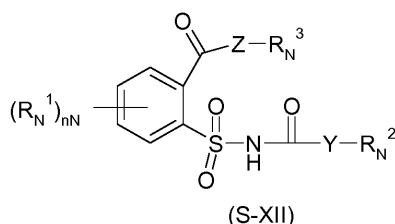
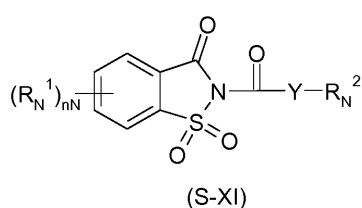
R_L^3 es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₈), alquenilo de (C₂-C₄), alquinilo de (C₂-C₄) o arilo, en que cada uno de los radicales que contienen carbono, antes mencionados, está sin sustituir o sustituido con uno o varios, preferentemente hasta tres, radicales idénticos o diferentes tomados del conjunto que se compone de halógeno y alcoxi; o sus sales.

M) compuestos activos de la clase de las 3-(5-tetrazolilcarbonyl)-2-quinolonas, por ejemplo

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

N) compuestos de las fórmulas (S-XI) o (S-XII)

tal como se describen en los documentos WO-A-2007023719 y WO-A-2007023764



en las que

R_N^1 es halógeno, alquilo de (C_1 - C_4), metoxi, nitro, ciano, CF_3 , OCF_3

Y, Z independientemente uno de otro son O o S,

n_N es un número entero de 0 hasta 4,

5 R_N^2 es alquilo de (C_1 - C_{16}), alquénilo de (C_2 - C_6), cicloalquilo de (C_3 - C_6), arilo; bencilo, halobencilo,

R_N^3 es hidrógeno, alquilo de (C_1 - C_6);

O) uno o más compuestos tomados del conjunto que consiste en:

anhídrido de ácido 1,8-naftálico,

fosforoditioato de O,O-dietilo y S-2-etiltio-etilo (disulfotón),

10 metilcarbamato de 4-cloro-fenilo (mefenato),

fosforotioato de O,O-dietil-O-fenilo (dietolato),

ácido 4-carboxi-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano-4-acético (CL-304415, CAS N° de Reg.: 31541-57-8),

1-oxa-4-azaespiro[4.5]decano-4-carboditioato de 2-propenilo (MG-838, CAS N° de Reg.: 133993-74-5),

15 [(3-oxo-1H-2-benzotiopiran-4(3H)-iliden)metoxi]acetato de metilo (a partir del documento WO-A-98/13361; CAS N° de Reg.: 205121-04-6),

cianometoxiimino(fenil)acetónitrilo (ciometrinilo),

1,3-dioxolan-2-ilmetoxiimino(fenil)acetónitrilo (oxabetrinilo),

O-1,3-dioxolan-2-ilmetil-oxima de 4'-cloro-2,2,2-trifluoro-acetofenona (fluxofenim),

4,6-dicloro-2-fenilpirimidina (fencloirim),

20 2-cloro-4-trifluorometil-1,3-tiazol-5-carboxilato de bencilo (flurazol),

2-diclorometil-2-metil-1,3-dioxolano (MG-191),

incluyendo a los estereoisómeros y a las sales habituales en la agricultura.

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

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

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

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

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

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

En una particular forma de realización, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o pirazolinatos, caracterizado porque la HPPD de la invención comprende la SEQ ID NO: 4 (desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368), o un ADN sintético que codifica la HPPD de la invención adaptada al trato con codones de maíz, arroz, trigo, especies de soja, caña de azúcar, cebolla, plantas de la especie Brassica, o algodón.

En otra particular forma de realización, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta

resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas seleccionado entre tembotriona, mesotriona, dicetonitrilo, isoxaflutol, sulcotriona, tefuriltriona y biciclopirona.

En otra particular forma de realización, la invención se refiere a dicho procedimiento para obtener una planta resistente a un agente inhibidor de las HPPD del tipo de tricetonas o de pirazolinatos, caracterizado porque la planta también comprende un gen quimérico expresable en plantas que codifica una enzima PDH (pfeferato deshidrogenasa), o una enzima con por lo menos PDH.

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

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

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

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

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

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

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

Medios y procedimientos que se podrían usar para obtener un organismo hospedador, particularmente una célula de planta o una planta, transformado(a) tanto con un gen que permite una sobreexpresión de una enzima HPPD, y con un gen que permite una sobreexpresión de una enzima PDH, se describen extensamente en el documento WO 04/024928. La referencia hecha en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella) o a cualquier materia que sea conocida, no se toma, ni se deberá tomar, como un reconocimiento o una admisión o cualquier forma de sugerencia de que dicha publicación anterior (o anterior) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo de la presente invención.

FIGURAS

FIG.1 Mapa del plásmido pSE420::FMP29e

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

FIG.3 Mapa del ADN-T introducido en las diferentes plantas de acuerdo con los Ejemplos 5 hasta 12. A, B, C y G, plantas de tabaco, D, E, y F, plantas de Zea mays, H. Plantas de soja, I. Plantas de arroz y J, plantas de algodón. 35S: promotor de CaMV35S, KanR: gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, nos: promotor de nopalina sintasa, Ter: terminador, H6: secuencia que codifica una marca de His, OTP: péptido de tránsito optimizado, genes de BAR (resistentes a bialafos documento WO 8705629) y de PAT (fosfotricina N-acetiltransferasa, documento EP 257542): que confieren tolerancia a bialafos, fosfotricina o glufosinato, 2mEPSPS: gen que codifica la EPSPS (5-enolpiruvilshikimato sintasa) doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) procedente de Zea mays (documento US 20030027312), 2mAHAS: gen que codifica la ALS (acetolactato sintasa) doble mutante procedente de Arabidopsis (Pro197Ala y Trp574Leu); documento US 5378824, HA: promotor de histona procedente del gen de Arabidopsis, TEV: virus de corrosión del tabaco, FMP29e: gen que codifica una FMP29 optimizada para la expresión en E coli con una secuencia que codifica una marca His junto a su extremidad 5', FMP29t: gen que codifica una FMP29 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas con una secuencia que codifica una marca His junto a su extremidad 5', FMP29t-h, un gen que codifica una FMP29 optimizada para la expresión en plantas dicotiledóneas, FMP29m, un gen que codifica una FMP29 optimizada para la expresión en plantas de Zea mays, LB, borde izquierdo, RB, borde derecho.

LISTA DE SECUENCIAS

	SEQ ID NO: 1	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i>
20	SEQ ID NO: 2	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para <i>E. coli</i> , que contiene en el extremo 5' un ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y 6 aminoácidos histidina.
25	SEQ ID NO: 3	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para <i>Nicotiana tabaccum</i> , que contiene en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca HIS.
	SEQ ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos de la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> derivada de la SEQ ID NO: 1
	SEQ ID NO: 5	Proteína codificada por la SEQ ID NO: 2
	SEQ ID NO: 6	Secuencia de aminoácidos de la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> (SEQ ID NO: 4) fusionada con un OTP (péptido de tránsito optimizado (documento WO 2009/144079))
30	SEQ ID NO: 7	Proteína codificada por la SEQ ID NO: 3
	SEQ ID NO: 8	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Arabidopsis thaliana</i>
	SEQ ID NO: 9	Secuencia de aminoácidos de la HPPD de <i>Arabidopsis thaliana</i>
	SEQ ID NO: 10	Proteína codificada por la SEQ ID NO: 8 más una adicional alanina directamente corriente abajo del inicial aminoácido metionina seguido por 6 aminoácidos histidina
35	SEQ ID NO: 11	Proteína de la SEQ ID NO: 9 más la secuencia de OTP situada junto al extremo terminal de N de la proteína
	SEQ ID NO: 12	Proteína de la SEQ ID NO: 10 más la secuencia de OTP directamente situada junto al extremo terminal de N de la proteína
	SEQ ID NO: 13	Secuencia de cebador de Xho-OTP-for
40	SEQ ID NO: 14	Secuencia de cebador de NcoI-OTP-rev
	SEQ ID NO: 15	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas dicotiledóneas
	SEQ ID NO: 16	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de Zea mays
45	SEQ ID NO: 17	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de Brassica napus
	SEQ ID NO: 18	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de Beta vulgaris

	SEQ ID NO: 19	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de <i>Gossypium hirsutum</i>
	SEQ ID NO: 20	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de <i>Glycine max</i>
5	SEQ ID NO: 21	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de <i>Hordeum vulgare</i>
	SEQ ID NO: 22	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de <i>Oryza sativa</i>
10	SEQ ID NO: 23	Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas de <i>Triticum aestivum</i> ,

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Preparación de la HPPD de *Picrophilus torridus* (que se denomina FMP29e) de la SEQ ID NO: 5 y de la HPPD de *Arabidopsis thaliana* identificada por la SEQ ID NO: 10.

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

La secuencia original de la HPPD de *Picrophilus torridus* (de 1149 pb) que codifica la proteína listada bajo el número de acceso Q6K798 en UniProtKB/TrEMBL se modificó y sintetizó usando un optimizado trato con codones de *Escherichia coli* K12 (operón Eurofins MWG (Ebersberg, Alemania), software (programa lógico) de GENEius) y se clonó en un vector pBluescript modificado (operón Eurofins MWG, Ebersberg, Alemania). En este vector, la secuencia correspondiente al MCS (acrónimo de multiple cloning site = sitio de clonación múltiple) fue eliminada parcialmente de manera tal que quedaron solamente las secuencias correspondientes a los sitios de reconocimiento por la enzima de restricción HindIII a ambos lados del inserto.

En el extremo 5', directamente corriente abajo del ATG se introdujo una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido alanina y una secuencia de ácido nucleico que codifica una marca HIS6 terminal de N (6x HIS, codificada por: cac cat cac cat cat cac). Corriente arriba del ATG, se añadieron dos adicionales pares de bases de citosina con el fin de obtener una secuencia correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI y corriente abajo con respecto al codón de detención se añadieron las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI. El resultante vector "pBluescript-FMP29e" fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, la banda que no migraba en la longitud del tamaño del vector de aproximadamente 3.000 pb correspondiente al ADN fue separada sobre un gel de agarosa por electroforesis. Luego, el ADN que codifica la HPPD fue purificado usando el Estuche de Extracción con Gel MinEluteTM (Qiagen, Hilden, Alemania) y clonado dentro del vector pSE420(RI)NX (véase más adelante) previamente cortado con las mismas enzimas de restricción.

El vector de clonación y expresión pSE420(RI)NX (5.261 pb) está basado en el plásmido pSE420 producido por Invitrogen (Karlsruhe, Alemania). Las modificaciones de este vector incluyen la adición de un gen de nptII (neomicina fosfotransferasa; Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (Tercera edición)) que confiere tolerancia al antibiótico kanamicina y al que le falta la mayoría de la súper-región de engarzador (sitio de clonación múltiple).

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

El resultante vector fue denominado "pSE420(RI)NX-FMP29e" (véase la Figura 1) y fue usado para transformar

células de *Escherichia coli* BL21 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Para la AtHPPD (HPPD de *Arabidopsis thaliana*) que se usó como referencia, véase el documento WO 2009/144079.

- 5 La expresión de HPPD se llevó a cabo en *E. coli* K-12 BL21 que contiene pQE30-AtHPPD o pSE420(RI)NX-FMP29e. Las células se dejaron crecer hasta que la OD (acrónimo de Optical Density = densidad óptica) llegó a 0,5, luego se inició la expresión desde el promotor trp-lac (trc) por inducción con 1 mM de IPTG que se fija al represor *lac* y causa su disociación desde el operón *lac*. La expresión se llevó a cabo durante 15 h a 28 °C.

- 10 Para preparar el cultivo pre-iniciador, 2 ml del medio TB (100 µg*ml⁻¹ de carbenicilina) se inocularon con 50 µl de una carga original de *E. coli* K-12 BL21 en glicerol. El cultivo pre-iniciador se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 h. 200 µl del cultivo pre-iniciador se usaron para iniciar al cultivo iniciador (5 ml de suplemento TB con 100 µg*l⁻¹), que se incubó durante 3 h a 37°C.

- 15 Para preparar el cultivo principal, 400 ml del medio TB (100 µg*ml⁻¹ de carbenicilina) se inocularon con 4 ml del cultivo iniciador. Este cultivo iniciador se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm hasta que se alcanzó una OD600 de 0,5. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante con 400 µl de una solución 1 M de IPTG. Las células se dejaron crecer durante una hora adicional en estas condiciones, luego la temperatura se disminuyó a 28°C y el cultivo se agitó a 140 rpm durante 15 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 6.000 x g durante 15 min at 4 °C. Luego los sedimentos de células se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento y purificación de His6-AtHPPD y His6-FMP29e en forma natural

Lisis de células

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

Para la purificación de proteínas marcadas con His6 se usó el Estuche de Iniciación Rápida QIAexpress® Ni-NTA Fast Start, siguiendo las instrucciones del manual de los usuarios.

Purificación de proteínas marcadas con His6 por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC = acrónimo de immobilized metal ion affinity chromatography)

- 30 El material lisado de células (10 ml), obtenido después de una centrifugación de la masa de reacción de lisis se cargó sobre una Columna de Iniciación Rápida Ni-NTA Fast Start Column procedente del Estuche QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y la purificación se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones. La proteína marcada con His6 fue eluida con 2,5 ml del tampón de elución.

Desalinización de las soluciones de HPPD mediante filtración en gel.

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

- 40 Las soluciones de HPPD, eluidas a partir de la columna de desalinización, fueron congeladas a -80°C en partes alícuotas de 1 ml.

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

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

- 50 La integridad de la proteína eluida se comprobó mediante una electroforesis en gel de proteína SDS-PAGE usando el gel NuPAGE® Novex 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), se cargaron aproximadamente 10 µg de proteína. 10 µl del Tampón de Muestra de Laemmli se añadieron a 1-10 µl de una solución de proteína y la mezcla se incubó a 90 °C durante 10 min. Después de una corta operación de centrifugación, toda la mezcla fue cargada dentro de una rendija de un gel de SDS previamente fijado en una cámara de gel XCell SureLock™ Novex Mini-Cell rellena con un Tampón de Elución NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (diluido a partir de la solución 20 x con ddH₂O). Luego se aplicó un voltaje de 150 V a la cámara de gel durante 1 h. Para la tinción de bandas de

proteínas, el gel fue sumergido en una Solución de Tinción Coomassie Brilliant Blue R-250. Para destefir al gel de poll(acrilamida), éste fue sumergido en una Solución de Destinción Coomassie Brilliant Blue R-250 hasta que las bandas de la proteína aparecieron de color azul sobre un gel de color blanco.

Ejemplo 2

- 5 Caracterización cinética y evaluación de la tolerancia a agentes inhibidores de las HPPD de las enzimas HPDD "SEQ ID NO: 5" y "SEQ ID NO: 10".

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

Determinación de las propiedades cinéticas in vitro de las HPPD

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

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

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

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

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

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

	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona
SEQ ID NO: 10	>>5,6	>>5,6	>>5,6	5,2

	(continuación)				
	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona	
SEQ ID NO: 5	5,5	4,9	>>5,6	3,4	
	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID NO: 10	5,4	>>5,6	5,4	>>5,6	>>5,6
SEQ ID NO: 5	4,0	>5,6	4,2	5,5	4,8

Tabla 2: Determinación del porcentaje de inhibición en presencia de $5,0 \times 10^{-6}$ M de agentes inhibidores comparado con la actividad medida en ausencia del agente inhibidor para la HPPD originada a partir de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 10) y a partir de *Picrophilus torridus*. (SEQ ID NO: 5).

	Tembotriona	Dicetonitrilo	Mesotriona	Biciclopirona	
SEQ ID NO: 10	92	87	86	29	
SEQ ID NO: 5	58	26	84	24	
	Pirasulfotol	Sulcotriona	Pirazolato	Tefuriltriona	Benzofenap
SEQ ID NO: 10	69	74	61	100.	90
SEQ ID NO: 5	7	92	16	87.	44

En las anteriores Tablas 1 y 2, puede verse con claridad que la HPPD de euriarqueota "SEQ ID NO: 5" mostró un superior nivel de tolerancia a todos los agentes inhibidores de las HPPD ensayados que la planta en todas las concentraciones de agentes inhibidores de las HPPD que el que se observó empleando la HPPD "SEQ ID NO: 10" en idénticas condiciones experimentales.

Ejemplo 3: Construcción de genes quiméricos para la evaluación de la tolerancia a herbicidas inhibidores de las HPPD en plantas de tabaco.

A) Construcción de los genes quiméricos

El vector pRP-RD224 (que se describe extensamente en el documento WO 2009/144079) que contiene la secuencia que codifica el OTP se usó para la fijación mediada por PCR corriente arriba de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI y corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI. El obtenido producto de la PCR fue clonado en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual de los usuarios. El resultante vector fue denominado "pCR-TOPO-OTP". La inserción de la correcta secuencia fue confirmada por una clásica secuenciación de ADN. El ADN correspondiente al OTP fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, separado por apropiadas electroforesis en gel y clonado previamente dentro del plásmido pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) y correspondientemente digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. El plásmido pRT100 contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El resultante vector fue subsiguientemente digerido con las enzimas de restricción NcoI y XbaI. El vector pSE420(RI)NX-FMP29e (véase la Figura 1) fue sometido a las enzimas de restricción NcoI y XbaI con el fin de obtener el fragmento de ADN correspondiente a la SEQ ID NO: 2. El resultante vector fue digerido por empleo de la enzima de restricción HindIII para subclonar la casete CaMV35S::OTP::FMP29e::CaMV35-term (véase la Figura 2) dentro del vector binario pBin19 (Bevan (1984), Nucleic Acid Res. 12:8711-8721.) previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. El resultante vector fue denominado "FMP29ebv".

Los vectores pQE-30-AtHPPD se usaron para la fijación mediada por PCR de un sitio de restricción de NcoI y de una secuencia que codifica una marca His6 terminal de N para los extremos 5' y un sitio de restricción de XbaI para los extremos 3' de AtHPPD.

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

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

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

15 Los vectores binarios FMP29ebv y AtHPPDbv se usaron para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV derivadas de EHA101) seleccionadas sobre medios YEB suplementados con los antibióticos kanamicina y rifampicina (que se describen extensamente en el documento de solicitud de patente US005925808A).

Estas cepas de *Agrobacterium* que contienen los vectores binarios de interés (FMP29ebv o AtHPPDbv) se usaron para transformar discos de hojas procedentes de plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. cv *Samsun* NN, que tienen aproximadamente un tamaño de 5x5 mm², tal como se describen extensamente en la cita de Horsch y col., (1985), Science 227; 1229-1231.

20 Los discos de hojas fueron cultivados conjuntamente durante 2 días con células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen o bien el vector binario FMP29ebv o el AtHPPDbv. Luego los discos de hojas fueron transferidos a un medio que permitía la regeneración de vástagos durante 6 semanas en un medio MS (de Murashige y Skoog, (1962), Physiol Plant 15(3): 473-497) suplementado con BAP (1 mg/ml; bencilaminopurina), carbenicilina (250 mg/ml), cefotaxina (250 mg/ml), kanamicina (75 mg/ml) y tembotriona (10⁻⁶ M)

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

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

Los resultados están recopilados en la Tabla 5 siguiente.

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

Enraizamiento de callos

35 Los callos de vástagos regenerados a partir de una célula transformada con una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD que comprende la SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*) o la SEQ ID NO: 7 (*Picrophilus torridus*) fueron transferidos a un medio que inducía el crecimiento de las raíces, cuyo medio fue suplementado adicionalmente con el agente inhibidor de la HPPD tembotriona durante 6 a 12 semanas. En ninguno de los sucesos que contenían la HPPD definida por la SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*) o no contenían callos transformados, se observó un crecimiento de raíces en las condiciones antes dadas. Al contrario de esto, en las condiciones
40 idénticas, los callos que contenían la HPPD definida por la SEQ ID NO: 7 desarrollaron manifiestamente raíces numerosas y sanas (véase la Tabla 3, siguiente).

Tabla 3

Callos que contienen:	Sucesos seleccionados para análisis molecular	% de elongación & enraizamiento en 10 ⁻⁶ M de tembotriona	Números de sucesos enraizados en medios sin tembotriona
SEQ ID NO: 11	21	0	5
SEQ ID NO: 7	23	65	15

45 Regeneración de discos de hojas

Se cortaron discos de hojas a partir de plantas que contienen las HPPD con SEQ ID NO: 11 (*Arabidopsis thaliana*) o

SEQ ID NO: 7 (*Picrophilus torridus*), seguido por una regeneración durante 6 semanas en condiciones clásicas de cultivo en un medio MS suplementado con BAP (1 mg/ml; bencilaminopurina), carbenicilina (250 mg/ml), cefotaxina (250 mg/ml) y que comprende además uno de los agentes inhibidores de las HPPD seguidamente enumerados en las concentraciones mencionadas (tembotriona (10^{-6} M), dicetonitrilo ($5 \cdot 10^{-6}$ M), mesotriona (10^{-6} M) y biciclopirona (10^{-6} M)), con un medio que no contiene ningún agente inhibidor de las HPPD como el testigo positivo. Al final de los experimentos se evaluó el nivel de regeneración tal como sigue:

“-” significa que los discos de hojas tenían el mismo aspecto que un disco de hoja procedente de tipo silvestre plantas de tabaco en un medio suplementado con el inhibidor antes mencionado.

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

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

Los resultados de los experimentos están recopilados en la Tabla 4.

Tabla 4: Efectos de diversos agentes inhibidores de las HPPD sobre la regeneración de un disco de hoja que se origina a partir de plantas transgénicas que comprenden un gen que codifica una HPPD obtenida o bien a partir de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 11) o a partir de *Picrophilus torridus* SEQ ID NO: 7.

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

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

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

Preparación de linajes de plantas transgénicas que expresan enzimas HPPD o bien de *Arabidopsis* o de FMP29. Ensayo en invernadero en cuanto a tolerancia a herbicidas.

Respuesta a tembotriona, isoxaflutol y biciclopirona

Unas plantas de tabaco T0 que contenían o bien el gen procedente de *Arabidopsis* que codifica una HPPD o el gen FMP29e procedente de *Picrophilus torridus* que codifica una HPPD de FMP29, antes mencionados (Ejemplo 3), fueron transferidas al invernadero (28/20°C), para desarrollarse más y producir semillas. Estas semillas fueron cosechadas y colocadas sobre tierra (ED73 mezclada con arena y osmocote Pro) para germinar en el invernadero (28/20°C). Tres a cuatro semanas más tarde, unas plántulas fueron transferidas a macetas individuales que contenían la tierra antes mencionada. Dos semanas más tarde, unas plantas de un tamaño de 4-6 cm de diámetro fueron rociadas con o bien

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

Siete días después de la aplicación (DAT acrónimo de Days After The application) los síntomas en plantas transformadas fueron evaluados en comparación con la respuesta observada en las plantas de tabaco de tipo silvestre rociadas al mismo tiempo y en las mismas condiciones que las plantas de tabaco que contenían los

transgenes (100 % significa que las plantas presentaron el mismo fenotipo de blanqueo que las plantas de tipo silvestre, 0 % significa que las plantas tenían el mismo aspecto que las plantas de tipo silvestre tratadas con la "formulación a ciegas", y un porcentaje intermedio representa el grado de los síntomas observados).

- 5 Tabla 5: Plantas de tabaco de tipo silvestre (A) y poblaciones T1 de sucesos en tabaco que contienen
alternativamente, las casetes de expresión que se han descrito más arriba que tienen el promotor de CaMV 35S, la
secuencia que codifica un OTP y la secuencia que codifica la HPPD de Arabidopsis (B), o el promotor de CaMV35S,
la secuencia que codifica un OTP, y la secuencia FMP29e que codifica la HPPD de FMP29 (C). Las comprobaciones
del daño causado por herbicidas a los 7 días después de la aplicación (DAT) por rociada con 100 g de IA/ha de
10 tembotriona o isoxaflutol suplementada/o con sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. Es evidente que
las plantas que contenían el gen FMP29e fueron muchísimo más tolerantes a tembotriona y isoxaflutol. Las plantas
que pertenecen a las categorías (B) y (C) no han sido seleccionadas en cuanto a la presencia del respectivo
transgén antes de la aplicación del herbicida.

A % de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha

De tipo silvestre	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol
	WT	1	100	100
	WT	2	100	100
	WT	3	100	100
	WT	4	100	98
	WT	5	100	99
	WT	6	100	99
	WT	7	100	100
	WT	8	100	n.d.
	WT	9	100	n.d.
	WT	10	100	n.d.
	WT	11	100	n.d.
	WT	12	100	n.d.
	WT	13	100	n.d.
	WT	14	100	n.d.

B % de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha

HPPD de Arabidopsis	Linaje		Tembotriona	Isoxaflutol
	258	1	100	100
	258	2	100	100
	258	3	100	100
	258	4	100	100
	258	5	100	100
	258	6	30	100
	252	1	30	30
	252	2	40	70
	252	3	40	95

ES 2 659 086 T3

		(continuación)	
252	4	40	98
252	5	50	98
252	6	60	99
252	7	60	99
252	8	70	99
252	9	70	99
252	12	75	100
252	13	75	100
252	14	75	100
252	15	80	100
327	1	10	10
327	2	20	20
327	3	20	60
327	4	40	60
327	5	50	70
327	6	50	80
327	7	70	95
327	8	70	98
327	9	70	99
327	10	70	100
327	11	70	100
327	12	80	100
327	13	80	100
327	14	80	100
327	15	80	100

C		% de daño, 7 DAT, 100 g de IA/ha	
FMP29e	Linaje	Tembotriona	Isoxaflutol
115	1	30	0
115	2	40	2
115	3	50	5

(continuación)			
115	4	50	10
115	5	50	15
115	6	n.d.	30
115	7	n.d.	30
115	8	n.d.	40
292	1	20	20
292	2	20	30
292	3	30	40
292	4	40	n.d.
292	5	40	n.d.

Respuesta a biciclopirona.

- 5 Semillas de plantas de tabaco de tipo silvestre y plantas de tabaco T1 que eran portadoras del gen FMP29e procedente de *Picrophilus torridus* que codifica una HPPD fueron sembradas en un medio MS (Murashige y Skoog 1964) suplementado con 50 g/l de kanamicina. Después de 4 semanas, las plántulas verdes enraizadas fueron transferidas a tierra y dejadas crecer durante 3 semanas en el invernadero tal como se ha descrito más arriba y luego rociadas con una mezcla que contiene biciclopirona (100 g de IAI/ha), sulfato de amonio y éster metílico de aceite de colza. Las plantas fueron clasificadas en dos categorías basándose en el fenotipo desarrollado como
- 10 respuesta al herbicida a los siete días después del tratamiento. La clase I fue definida como plantas que no presentaron desde ningún daño hasta daños ligeros como respuesta al tratamiento con herbicidas (daño: 0-30 %), la clase II fue definida como las plantas que presentaban desde fuertes daños hasta daños similares a los observados con plantas de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento (daño: 31–100 %). En este caso solamente las plantas que contenían por lo menos un ADN T fueron expuestas al tratamiento con herbicidas.
- 15 En general, puede decirse que incluso las plantas que contenían solamente un inserto de ADN T ya mostraron un nivel significativo y suficiente de tolerancia a una exposición a una dosis de campo del herbicida inhibidor de las HPPD biciclopirona.

Tabla 6:

Biciclopirona, 100 g de IAI /ha

7 DAT

Transgén	Linaje	Clase I	Clase II	% de planta tolerante
-	WT	0	12	0
FMP29e	121	38	11	2

- 20 Las plantas que contenían la HPPD de FMP29 presentaron tolerancia al herbicida inhibidor de las HPPD biciclopirona.

Puede resumirse a partir de las tablas antes presentadas que las plantas que expresan el gen FMP29e procedente de *Picrophilus torridus* que codifica la HPPD de FMP29, obtenidas a partir de diferentes sucesos transgénicos independientes, son altamente tolerantes a varios herbicidas inhibidores de HPPD en dosis aplicadas en condiciones

25 agronómicas clásicas.

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

Clonación en pBin19 de FMP29t (SEQ ID NO: 3), FMP29t-h (SEQ ID NO: 15)

Se diseñaron un gen con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas que codifican la proteína HPPD FMP29, y denominado FMP29t-h (SEQ ID NO: 15) y el mismo gen con una secuencia adicional que codifica una OTP y con una marca HIS junto a su extremidad 5' denominado FMP29t (SEQ ID NO: 3). La secuencia correspondiente al gen FMP29t-h fue clonada usando las enzimas de restricción NcoI y XbaI en el vector pRT100-OTP previamente descrito, que contiene un promotor y un terminador de CaMV35S. El resultante vector fue denominado pRT100-OTP-FMP29t-h. La secuencia correspondiente al FMP29t fue clonada en el vector pRT100 previamente descrito, usando las enzimas de restricción XhoI y XbaI, y el resultante vector fue denominado pRT100-OTP-FMP29t. Los fragmentos correspondientes a PromCaMV35S-OTP-FMP29t-h-TerCaMV35S y PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP29t-TerCaMV35S fueron subclonados en el vector pBIN19 (que se ha descrito más arriba) usando la enzima de restricción SbfI. Los vectores binarios fueron denominados respectivamente pBin19-FMP29t-h (Fig.3C) y pBin19-FMP29t (Fig.3B) y se pueden usar, por ejemplo, para transformar plantas dicotiledóneas, tales como las plantas de tabaco que se han descrito más arriba. Se ensayan luego unas plantas transformantes que han crecido suficientemente, en cuanto a su tolerancia a herbicidas inhibidores de la HPPD, tales como tembotriona. El desarrollo de los síntomas observados como respuesta al tratamiento con herbicidas se evalúa y se compara con la respuesta de plantas del tipo silvestre en las mismas condiciones.

Ejemplo 6: Clonación de los genes FMP29e, FMP29t y FMP29m que codifican la HPPD de FMP29 en un vector para transformar plantas de Zea mays

FMP29e (SEQ ID NO: 2), FMP29t (SEQ ID NO: 3), FMP29m-h (SEQ ID NO: 16)

a- FMP29e en pHoe6/Ac: Gen con un trato con codones optimizado para E. coli, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca His.

El vector pRT100-FMP29e que contiene el gen que codifica la HPPD de FMP29, optimizado para la expresión en E. coli bajo el control del promotor de CaMV35S, fue digerido con la enzima de restricción HindIII. La casete CaMV35S::OTP::FMP29e::CaMV35S-term fue clonada ulteriormente dentro del el vector binario pHoe6/Ac (documento US 6.316.694) previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado. El resultante vector fue denominado pHoe6/Ac/FMP29e.

b- FMP29t en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 3): Gen con un trato con codones optimizado para plantas dicotiledóneas, más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP y una secuencia que codifica una marca His.

FMP29t en pRT100. A versión del gen que codifica la proteína FMP29 optimizado para la expresión en *Nicotiana tobaccum*, que contiene además en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un optimizado péptido de tránsito y una marca HIS, fue encargada y denominada FMP29t. Corriente arriba con relación a esta secuencia se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI y corriente abajo se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. Los ADN correspondientes al OTP y al FMP29t fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y XbaI, separados mediante apropiadas electroforesis en gel y clonados dentro del vector pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15:5890) previamente digerido con las enzimas de restricción XhoI y NcoI. El plásmido pRT100 contiene el promotor de CaMV35S y el terminador de CaMV35S. El resultante vector fue denominado pRT100-FMP29t, y digerido con la enzima de restricción HindIII para separar el ADN correspondiente a la casete CaMV35S::OTP::FMP29t::CaMV35S-term con respecto del resto del vector, con el fin de clonarlo dentro del vector pHoe6/Ac previamente restringido (documento US 6.316.694). El resultante vector fue denominado pHoe6/Ac/FMP29t (Fig.3).

c- FMP29m en pHoe6/Ac (SEQ ID NO: 16): Gen con un trato con codones optimizado para plantas monocotiledóneas más, junto a su extremidad 5', una secuencia que codifica un OTP. FMP29m en pRT100-OTP (NcoI-XbaI) luego HindIII

La variante del gen optimizado para la expresión en plantas monocotiledóneas que codifican FMP29, denominada FMP29m, fue encargada, y corriente arriba del codón de iniciación se añadió un sitio de restricción de NcoI mientras que corriente abajo del codón de detención se añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. La secuencia de ADN correspondiente a FMP29m fue digerida con las enzimas de restricción NcoI y XbaI, luego separada por electroforesis en gel, y finalmente aislada a partir del gel. El fragmento de ADN aislado fue mezclado con el vector pRT100-OTP (antes mencionado) previamente digerido también con las mismas enzimas de restricción. El resultante vector fue denominado pRT100-OTP-FMP29m, que contiene la casete de expresión CaMV35S::OTP::FMP29m::CaMV35S-term, que fue aislada usando la enzima de restricción HindIII y luego clonada ulteriormente dentro del vector pHoe6/Ac previamente abierto y desfosforilado, que contiene el gen que codifica la enzima PAT (de Phosphinothricin Acetyl Transferase = fosfotricina acetil transferasa), que confiere resistencia al herbicida glufosinato (documento US 6.316.694). El resultante plásmido fue denominado pHoe6/Ac/FMP29m (Fig.3F)

Transformación de maíz:

Los plásmidos pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), pHoe6/Ac/FMP29e, pHoe6/Ac/FMP29t y pHoe6/Ac/FMP29m se usaron para transformar un cultivo de maíz.

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

- 5 Los callos transformados fueron seleccionados sobre un medio que contiene fosfinotricina.

Luego las plantas enraizadas y regeneradas se transfirieron a tierra y se dejaron crecer y producir semillas en el invernadero en condiciones clásicas (28/20°C). Las plantas adultas se hicieron crecer hasta la producción de semillas y las semillas se recogieron para una siembra ulterior, y las plantas suficientemente desarrolladas serán tratadas con los respectivos herbicidas inhibidores de las HPPD.

10 **Ejemplo 7: Construcción de vectores binarios para la transformación de soja**

Un vector binario para la transformación de soja es construido, por ejemplo, con el promotor CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP29t-h (SEQ ID NO: 15), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codificaba un OTP, y más corriente arriba una secuencia de TEV (acrónimo de Tabaco Etch Virus = virus de la corrosión del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP29t-h se da en SEQ ID NO: 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para una selección basada en el glufosinato durante el procedimiento de transformación y una casete de gen 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 3H). El vector binario fue denominado pFCO115.

Ejemplo 8: Establecimiento y selección de plantas T0 de soja

La transformación de soja se consigue usando procedimientos bien conocidos en la especialidad, como el que se describe usando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de explantes de mitades de semillas de soja, que ha sido descrita por Paz y col. (2006, Plant cell Rep. 25:206). Los transformantes fueron identificados usando isoxaflutol como marcador de selección. Se observó la aparición de vástagos verdes, y se documentó como un indicador de la tolerancia al herbicida isoxaflutol.

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

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

Ejemplo 9: Construcción de vectores binarios para la transformación de algodón.

Un vector binario para la transformación de algodón es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP29t-h (SEQ ID NO: 15), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y en su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica un OTP, y más corriente arriba se añadió una secuencia de TEV (virus de corrosión de tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos de gen FMP29t-h está dada en SEQ ID NO: 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguida por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el procedimiento de transformación y una casete de gen de 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 3J).

45 **Ejemplo 10: Establecimiento y selección de plantas T0 de algodón**

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

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

Ejemplo 11: Construcción de vectores de transformación binarios para generar plantas tolerantes a cuatro

herbicidas con distintas modalidades de acción.

Un vector binario para la transformación de plantas dicotiledóneas es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP29t-h (SEQ ID NO: 15), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia de un OTP, seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP29t-h se da en la SEQ ID NO: 15. Adicionalmente el vector de transformación también contiene una casete de gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguido por un terminador de CaMV35S para conferir a la planta que expresa el gen una tolerancia a glufosinato, una casete de gen de 2mEPSPS que codifica el EPSPS doble mutante (Thr102Ile y Pro106Ser) en que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glufosinato, y una casete de gen de 2mAHAS de Arabidopsis thaliana que codifica una enzima ALS tolerante (acetolactato sintasa, Pro197Ala, Trp574Leu) impulsada por un promotor de CaMV35S con el fin de conferir a la planta que expresa este gen una tolerancia a herbicidas de las clases de sulfonilureas e imidazolinonas (véase la Fig. 3G)

Las casetes de genes son finalmente clonadas dentro del vector pHoe6/Ac (documento US 6.316.694), y el vector final es denominado pHoe6/FMP29t-h/ PAT/EPSPS/AHAS, y es usado para transformar plantas dicotiledóneas a partir de procedimientos de la técnica anterior mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Unas plantas T0 son transferidas a tierra, y después de un período de tiempo de aclimatación, las plantas que han crecido suficientemente son rociadas sucesivamente con un herbicida de la clase de los agentes inhibidores de las HPPD, luego con glifosato, luego con glufosinato y finalmente con un herbicida de la clase de las sulfonilureas, por ejemplo.

Ejemplo 12: Generación de plantas transgénicas que muestran tolerancia a herbicidas con tres distintas modalidades de acción.

Un vector binario para la transformación de tabaco es construido, por ejemplo, con el promotor de CaMV35 que impulsa la expresión del gen FMP29t-h (SEQ ID NO: 15), con un trato con codones optimizado para la expresión en plantas dicotiledóneas y junto a su extremidad 5' se añadió una secuencia que codifica un OTP, y más corriente arriba se añadió una secuencia de TEV (virus de la corrosión del tabaco) para mejorar la estabilidad del ARNm en plantas, seguida por el terminador de CaMV35S. La secuencia de nucleótidos del gen FMP38t-h está dada en SEQ ID NO: 15. Adicionalmente, el vector de transformación contiene también una casete del gen de PAT en la que el gen es impulsado por un promotor de CaMV35S y seguida por un terminador de CaMV35S para una selección basada en glufosinato durante el procedimiento de transformación y una casete de gen de 2mEPSPS en la que el gen es impulsado por un promotor de histona procedente de Arabidopsis para conferir a las plantas transformadas una tolerancia al herbicida glifosato (véase la Fig. 3H). El vector binario fue denominado pFCO115. El anterior vector se usó para transformar discos de hojas obtenidos a partir de plantas de *Nicotiana tabacum*, de acuerdo con el Ejemplo 3.

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer CropScience AG Bayer CropScience AG
- <120> Plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de las HPPD
- <130> BCS 09-1042-PCT
- <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1107
- <212> ADN
- <213> *Picrophilus torridus*

<400> 1

```

atgtatggca aaaattttaat ctcagaacta agggaaaagg agatctttaa acgattacat      60
cacgtggaat tttacgttag cagtgccaaa acatgggtcat atttcatgaa caggggtctt      120
ggatttaaaa cagtggcata tgccgggtcca gaaaccggga taagggacaa gatatacctat      180
gttatgtccc agggcactgc aaggatatct tttacatcat caatgaatga tgatagctat      240
atatcgaatc atgttaaaaa acacgggggat ggcgtaaagg atatagcact tgagggtcgat      300
gatctggacg aggcaaaaag cctgatagaa aagtatggaa caaaggtttc aaaaataaat      360
gaaataaagg atggaaatgg aaagataaga actgcagaga taaaaacgta cgggtgaaacc      420
gttcatacat taatagaaac cggggattac aatggcgtat tcatgcccgg ttatgaggaa      480
tctgaaataa attcaaaaaa cactgggata aaaaagatcg atcatatagt tggaaatgtc      540
tatgagggcg agatggatag ctgggttaat ttttacatag aaaaacttgg ctttgagcat      600
ttaataacct ttgatgataa agatataaga actgattaca gcgcattaag atcaaagggt      660
gtaaaataca atgacgatat cgtattttcca ataaatgagc ctgcaaaggg cttaagaaaa      720
tcacagatag aggaatatct tgactattac aggtctgagg gcgttcagca catagcactg      780
ttaactgatg atataataaa aactgtatcc atgatggagg aaaacggcat agaattttta      840
aaaacaccag gatcatacta tgaatcccta tcatcaagga taggctcaat agacgaggat      900
ttaaatgaaa tagagaaaca taacatactt gtggatcgtg atgagaacgg atacctatta      960
cagatcttca caaagcctgt tactgacagg ccaacgttct tctttgaggt catacagaga     1020
aaggggtgcaa ggtcattcgg caacggtaac ttttaaggcac tttttgaggc gatagaaagg     1080
gagcaggcaa agagaggaaa cctatga                                     1107

```

5

<210> 2

<211> 1128

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

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

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> secuencia que codifica Ala

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(24)

<223> secuencia que codifica una marca His que contiene 6 His

25

<400> 2

```

atggcacatc accatcatca tcactatggc aagaacctga ttagcgaact gcgcgagaaa      60
gaaatcttca aacgcctgca tcatgtagag ttttatgtgt caagcgccaa aacctggctcg    120
tactttatga accgtggttt agggttcaaa acggtagcct atgcgggtcc agaaacgggc     180
attcgcgata aaatttccta cgttatgtcc caaggaactg ctgcgatttc ttttacgagt     240
agcatgaacg atgacagcta tatctccaat catgtcaaaa aacatggaga tgggtgtgaaa     300
gacatcgctc ttgaggttga tgatctggat gaagcaaaat cgttgatcga gaagtacggg     360
accaaagtca gcaaaattaa cgaaattaa gatgggaatg gtaaaattcg cactgccgaa     420
atcaaaacat atggcgaaac agtgcacact ctcatcgaaa ccggcgatta caatgggtgtc     480
tttatgccgg ggtatgaaga gtctgaaatc aactcgaaga acaccggcat caagaaaatt     540
gaccacattg tgggtaacgt gtacgaagga gagatggatt catgggtaaa cttctatatc     600
gagaaactgg gctttgaaca cctcattacg ttcgacgaca aggacattcg taccgattac     660
agcgctttac gcagtaaggt tgtcaaatac aacgatgaca tagtgtttcc gatcaatgaa     720
cccgcaaaag gcttgcgcaa aagccagatc gaggagtatc tggactacta tcgttcggaa     780
ggtgtgcagc atattgcgct tctgaccgat gacattatca aaaccgtgtc aatgatggaa     840
gaaaatggca ttgaattcct gaaaaccctt ggtagctact atgaaagtct gtcctctcgc     900
ataggggtcta ttgacgaaga tctcaacgag atagaaaagc acaatatcct ggttgatcgg     960
gatgaaaatg gctatttgct gcaaattctt accaaaccgg ttacggatcg tccgacattc    1020
ttctttgagg tcattcagcg caaaggtgcg cgtagttttg gcaatggcaa tttcaaagcg    1080
ctgtttgaag ccattgaacg ggaacaggcg aaacgtggca acttataa                    1128

```

<210> 3
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para *Nicotiana tabaccum*, que contiene en el extremo 5' una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito optimizado y una marca HIS.

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

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

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

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

5

<400> 3

```

atggcttcta tttcttcttc tgtggctact gtttctagga ctgctccagc tcaagctaata 60
atggtggctc cattcacagg cttgaaatcc aatgctgctt tcccaactac taagaaggct 120
aacgatttct ctactctccc atctaattgtt ggaaggggtc agtgtatgca agtttggcca 180
gcttacggaa ataagaagtt cgagactctt tcttaccttc caccactttc tatggctcca 240
actgtgatga tggcttcttc tgctactgct gttgctccat tccaaggatt gaagtctact 300
gcttctttgc cagttgctag aaggtcatct cgttctcttg gaaacgtttc taacggtgga 360
aggattagat gtgctatggc tcatcatcat caccatcact acggaagaa ccttatttct 420
gagcttagag agaaagagat cttcaagagg cttcatcacg ttgagttcta cgtttcttcc 480
gctaagactt ggtcctactt catgaatagg ggactcggat tcaagactgt tgcttatgct 540
ggaccagaaa ctggaatcag ggataagatc tcctacgtta tgtctcaagg tactgctagg 600
atttctttca cttcctccat gaacgatgat tcctacattt ccaaccacgt taagaaacac 660
ggtgatggtg ttaaggatat cgctctcgaa gtggatgatc ttgatgaggc taagtctctc 720
attgagaagt acggaactaa ggtgtccaag atcaacgaga tcaaggatgg aaacggaaag 780
attaggactg ctgagatcaa gacttacggt gaaactgtgc acactcttat cgagactggt 840
gattacaacg gtgttttcat gccaggatac gaagagtctg agatcaactc caagaacact 900
ggtatcaaaa aaatcgatca cattgtggga aatgtttacg agggtgaaat ggattcttgg 960
gtgaacttct acattgagaa gttgggattc gagcacctta tcactttcga tgataaggat 1020
atcaggactg attactctgc tcttaggtct aaggtggtga agtacaacga tgatatcgtg 1080
ttccctatta acgaaccagc taagggactt aggaagtccc aaatcgaaga gtacctcgat 1140
tattaccggt ctgaggggtg tcaacacatt gctttgctca cagacgatat catcaagact 1200
gtgtccatga tggaagagaa cggaattgag ttccttaaga ctccaggatc ttactacgag 1260
tctttgtcct ctaggattgg atctatcgat gaggatctca acgaaatcga gaagcacaac 1320

attcttgtgg atagggatga gaacggatac cttctccaga ttttactaa gccagtgact 1380
gataggccaa cattcttctt cgaagtgatc caaagaaagg gtgctagatc tttcggaaac 1440
ggaaacttca aggctctttt cgaggctatt gagagagaac aagctaagag gggaaacctt 1500
tga 1503
    
```

10

<210> 4

ES 2 659 086 T3

<211> 368
 <212> PRT
 <213> *Picrophilus torridus*

5 <400> 4

Met	Tyr	Gly	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Glu	Leu	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Phe	1	5	10	15
Lys	Arg	Leu	His	His	Val	Glu	Phe	Tyr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Trp	20	25	30	
Ser	Tyr	Phe	Met	Asn	Arg	Gly	Leu	Gly	Phe	Lys	Thr	Val	Ala	Tyr	Ala	35	40	45	
Gly	Pro	Glu	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Ser	Tyr	Val	Met	Ser	Gln	50	55	60	
Gly	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Phe	Thr	Ser	Ser	Met	Asn	Asp	Asp	Ser	Tyr	65	70	75	80
Ile	Ser	Asn	His	Val	Lys	Lys	His	Gly	Asp	Gly	Val	Lys	Asp	Ile	Ala	85	90	95	
Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Ile	Glu	Lys	Tyr	100	105	110	
Gly	Thr	Lys	Val	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Ile	Lys	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	115	120	125	
Ile	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Val	His	Thr	Leu	130	135	140	
Ile	Glu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Asn	Gly	Val	Phe	Met	Pro	Gly	Tyr	Glu	Glu	145	150	155	160
Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	His	Ile	165	170	175	
Val	Gly	Asn	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Asn	Phe	Tyr	180	185	190	

ES 2 659 086 T3

```

Ile Glu Lys Leu Gly Phe Glu His Leu Ile Thr Phe Asp Asp Lys Asp
    195                                200                                205

Ile Arg Thr Asp Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Lys Val Val Lys Tyr Asn
    210                                215                                220

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

Ser Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Glu Gly Val Gln
                                245                                250                                255

His Ile Ala Leu Leu Thr Asp Asp Ile Ile Lys Thr Val Ser Met Met
                                260                                265                                270

Glu Glu Asn Gly Ile Glu Phe Leu Lys Thr Pro Gly Ser Tyr Tyr Glu
                                275                                280                                285

Ser Leu Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ile Asp Glu Asp Leu Asn Glu Ile
    290                                295                                300

Glu Lys His Asn Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asn Gly Tyr Leu Leu
    305                                310                                315                                320

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Thr Asp Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu
                                325                                330                                335

Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Arg Ser Phe Gly Asn Gly Asn Phe Lys
                                340                                345                                350

Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Lys Arg Gly Asn Leu
    355                                360                                365

```

<210> 5
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína codificada por la SEQ ID NO: 2

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

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

<400> 5

ES 2 659 086 T3

Met	Ala	His	His	His	His	His	His	Tyr	Gly	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Glu	1	5	10	15
Leu	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Phe	Lys	Arg	Leu	His	His	Val	Glu	Phe	Tyr	20	25	30	
Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Phe	Met	Asn	Arg	Gly	Leu	Gly	35	40	45	
Phe	Lys	Thr	Val	Ala	Tyr	Ala	Gly	Pro	Glu	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp	Lys	50	55	60	
Ile	Ser	Tyr	Val	Met	Ser	Gln	Gly	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Phe	Thr	Ser	65	70	75	80
Ser	Met	Asn	Asp	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ser	Asn	His	Val	Lys	Lys	His	Gly	85	90	95	
Asp	Gly	Val	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	100	105	110	
Lys	Ser	Leu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	115	120	125	
Ile	Lys	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	130	135	140	
Gly	Glu	Thr	Val	His	Thr	Leu	Ile	Glu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Asn	Gly	Val	145	150	155	160
Phe	Met	Pro	Gly	Tyr	Glu	Glu	Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gly	165	170	175	
Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	His	Ile	Val	Gly	Asn	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Met	180	185	190	
Asp	Ser	Trp	Val	Asn	Phe	Tyr	Ile	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Glu	His	Leu	195	200	205	
Ile	Thr	Phe	Asp	Asp	Lys	Asp	Ile	Arg	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	210	215	220	
Ser	Lys	Val	Val	Lys	Tyr	Asn	Asp	Asp	Ile	Val	Phe	Pro	Ile	Asn	Glu	225	230	235	240
Pro	Ala	Lys	Gly	Leu	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	245	250	255	
Tyr	Arg	Ser	Glu	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile				

260							265					270				
Ile	Lys	Thr	Val	Ser	Met	Met	Glu	Glu	Asn	Gly	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	
		275					280					285				
Thr	Pro	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Leu	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Ser	Ile	
	290					295					300					
Asp	Glu	Asp	Leu	Asn	Glu	Ile	Glu	Lys	His	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	
305					310					315					320	
Asp	Glu	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Thr	Asp	
				325					330					335		
Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Phe	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	
			340					345					350			
Phe	Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	
		355					360					365				
Gln	Ala	Lys	Arg	Gly	Asn	Leu										
	370					375										

$\langle 210 \rangle$ 6

<211> 493

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de aminoácidos de la HPPD de *Picrophilus torridus* (SEQ ID NO: 4) fusionada con un péptido de tránsito optimizado (documento WO 2009/144079))

$\langle 220 \rangle$

<221> TRÁNSITO

<222> (1)..(125)

<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

<400> 6

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

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

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

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

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro

ES 2 659 086 T3

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

ES 2 659 086 T3

```

Asp Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Lys Val Val Lys Tyr Asn Asp Asp Ile
      340                      345                      350

Val Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Lys Gly Leu Arg Lys Ser Gln Ile
      355                      360                      365

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

Leu Leu Thr Asp Asp Ile Ile Lys Thr Val Ser Met Met Glu Glu Asn
385                      390                      395                      400

Gly Ile Glu Phe Leu Lys Thr Pro Gly Ser Tyr Tyr Glu Ser Leu Ser
      405                      410                      415

Ser Arg Ile Gly Ser Ile Asp Glu Asp Leu Asn Glu Ile Glu Lys His
      420                      425                      430

Asn Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asn Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe
      435                      440                      445

Thr Lys Pro Val Thr Asp Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu Val Ile Gln
      450                      455                      460

Arg Lys Gly Ala Arg Ser Phe Gly Asn Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe
465                      470                      475                      480

Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Lys Arg Gly Asn Leu
      485                      490

```

```

<210> 7
<211> 500
5 <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Proteina codificada por la SEQ ID NO: 3

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

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

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

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

<400> 7

```

ES 2 659 086 T3

Met	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	1	5	10	15
Ala	Gln	Ala	Asn	Met	Val	Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Leu	Lys	Ser	Asn	Ala	20	25	30	
Ala	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Lys	Ala	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	35	40	45	
Asn	Gly	Gly	Arg	Val	Gln	Cys	Met	Gln	Val	Trp	Pro	Ala	Tyr	Gly	Asn	50	55	60	
Lys	Lys	Phe	Glu	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	65	70	75	80
Thr	Val	Met	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Phe	Gln	Gly	85	90	95	
Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Val	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	100	105	110	
Leu	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Gly	Gly	Arg	Ile	Arg	Cys	Ala	Met	Ala	His	115	120	125	
His	His	His	His	His	Tyr	Gly	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Glu	Leu	Arg	Glu	130	135	140	
Lys	Glu	Ile	Phe	Lys	Arg	Leu	His	His	Val	Glu	Phe	Tyr	Val	Ser	Ser	145	150	155	160
Ala	Lys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Phe	Met	Asn	Arg	Gly	Leu	Gly	Phe	Lys	Thr	165	170	175	
Val	Ala	Tyr	Ala	Gly	Pro	Glu	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Ser	Tyr	180	185	190	
Val	Met	Ser	Gln	Gly	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Phe	Thr	Ser	Ser	Met	Asn	195	200	205	
Asp	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ser	Asn	His	Val	Lys	Lys	His	Gly	Asp	Gly	Val	210	215	220	
Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu				

ES 2 659 086 T3

225		230		235		240
Ile Glu Lys Tyr	Gly Thr Lys Val Ser Lys Ile Asn Glu Ile Lys Asp					
	245		250		255	
Gly Asn Gly Lys	Ile Arg Thr Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Gly Glu Thr					
	260		265		270	
Val His Thr Leu	Ile Glu Thr Gly Asp Tyr Asn Gly Val Phe Met Pro					
	275		280		285	
Gly Tyr Glu Glu	Ser Glu Ile Asn Ser Lys Asn Thr Gly Ile Lys Lys					
	290		295		300	
Ile Asp His Ile	Val Gly Asn Val Tyr Glu Gly Glu Met Asp Ser Trp					
305		310		315		320
Val Asn Phe Tyr	Ile Glu Lys Leu Gly Phe Glu His Leu Ile Thr Phe					
	325		330		335	
Asp Asp Lys Asp	Ile Arg Thr Asp Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Lys Val					
	340		345		350	
Val Lys Tyr Asn	Asp Asp Ile Val Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Lys					
	355		360		365	
Gly Leu Arg Lys	Ser Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser					
	370		375		380	
Glu Gly Val Gln	His Ile Ala Leu Leu Thr Asp Asp Ile Ile Lys Thr					
385		390		395		400
Val Ser Met Met	Glu Glu Asn Gly Ile Glu Phe Leu Lys Thr Pro Gly					
	405		410		415	
Ser Tyr Tyr Glu	Ser Leu Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ile Asp Glu Asp					
	420		425		430	
Leu Asn Glu Ile	Glu Lys His Asn Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asn					
	435		440		445	
Gly Tyr Leu Leu	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Thr Asp Arg Pro Thr					
	450		455		460	
Phe Phe Phe Glu	Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Arg Ser Phe Gly Asn					
465		470		475		480
Gly Asn Phe Lys	Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Lys					
	485		490		495	
		Arg Gly Asn Leu				
		500				

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

5

<400> 8

```

atgtgtctat cgtagcttc tacagctcaa cgaaacacac agttccgtag cagagtttta      60
gttttagcag agttggtgaa atcaatgggc caccaaaacg ccgccgtttc agagaatcaa      120
aaccatgatg acggcgctgc gtcgtcgccg ggattcaagc tcgtcggatt ttccaagttc      180
gtaagaaaga atccaaagtc tgataaattc aagggttaagc gcttccatca catcgagttc      240
tggtgcgggc acgcaaccaa cgtcgctcgt cgcttctcct ggggtctggg gatgagattc      300
tccgccaaat ccgatctttc caccggaac atggttcacg cctcttacct actcacctcc      360
ggtgacctcc gattcctttt cactgctcct tactctccgt ctctctccgc cggagagatt      420
aaaccgacaa ccacagcttc tatcccaagt ttcgatcacg gctcttgctg ttccttcttc      480
tcttcacatg gtctcgggtg tagagccgtt gcgattgaag tagaagacgc agagtcagct      540
ttctccatca gtgtagctaa tggcgtctatt ccttcgtcgc ctctctccgt cctcaatgaa      600
gcagttacga tcgctgaggt taaactatac ggcgatgttg ttctccgata tgtagttac      660
aaagcagaag ataccgaaaa atccgaattc ttgccagggt tcgagcgtgt agaggatgcg      720
tcgtcgttcc cattggatta tggatatccg cggcttgacc acgccgtggg aaacgttcct      780
gagcttggtc cggctttaac ttatgtagcg gggttcactg gttttcacca attcgcagag      840
ttcacagcag acgacgttgg aaccgccgag agcggtttaa attcagcggc cctggctagc      900
aatgatgaaa tggttcttct accgattaac gagccagtgc acggaacaaa gaggaagagt      960
cagattcaga cgtattttga acataacgaa ggcgcagggc tacaacatct ggctctgatg     1020
agtgaagaca tattcaggac cctgagagag atgaggaaga ggagcagtat tggaggattc     1080
gacttcatgc cttctcctcc gcctacttac taccagaatc tcaagaaacg ggtcggcgac     1140
gtgctcagcg atgatcagat caaggagtgt gaggaattag ggattcttgt agacagagat     1200
gatcaaggga cgttgcttca aatcttcaca aaaccactag gtgacaggcc gacgatattt     1260
atagagataa tccagagagt aggatgcatg atgaaagatg aggaaggga ggcttaccag     1320
agtggaggat gtgggtggtt tggcaaaggc aatttctctg agctcttcaa gtccattgaa     1380
gaatacgaaa agactcttga agccaaacag ttagtgggat ga                          1422
    
```

10

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

15

<400> 9

ES 2 659 086 T3

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

ES 2 659 086 T3

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

<210> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Ala

<220>

ES 2 659 086 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> Marca His constituída por 6 His

5 <400> 10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly

```

ES 2 659 086 T3

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

<210> 11
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la SEQ ID NO: 9 más la secuencia del péptido de tránsito optimizado situada en el extremo N terminal de la proteína

5

<220>

<221> TRÁNSITO

<222> (1)..(125)

<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

10

<400> 11

Met	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Ala	Pro	1	5	10	15
Ala	Gln	Ala	Asn	Met	Val	Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Leu	Lys	Ser	Asn	Ala	20	25	30	
Ala	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Lys	Ala	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	35	40	45	
Asn	Gly	Gly	Arg	Val	Gln	Cys	Met	Gln	Val	Trp	Pro	Ala	Tyr	Gly	Asn	50	55	60	
Lys	Lys	Phe	Glu	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	65	70	75	80
Thr	Val	Met	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Phe	Gln	Gly	85	90	95	
Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Val	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	100	105	110	
Leu	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Gly	Gly	Arg	Ile	Arg	Cys	Ala	Met	Gln	Asn	115	120	125	
Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gln	Asn	His	Asp	Asp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	130	135	140	
Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Lys	Asn	Pro	145	150	155	160
Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Lys	Val	Lys	Arg	Phe	His	His	Ile	Glu	Phe	Trp	165	170	175	
Cys	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	Arg	Phe	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	180	185	190	
Met	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Met	Val	His	195	200	205	
Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Arg	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	210	215	220	

ES 2 659 086 T3

Pro	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	225	230	235	240
Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Arg	Ser	Phe	Phe	Ser	245	250	255	
Ser	His	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Ile	Glu	Val	Glu	Asp	Ala	260	265	270	
Glu	Ser	Ala	Phe	Ser	Ile	Ser	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	275	280	285	
Pro	Pro	Ile	Val	Leu	Asn	Glu	Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	290	295	300	
Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	305	310	315	320
Glu	Lys	Ser	Glu	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Glu	Asp	Ala	Ser	325	330	335	
Ser	Phe	Pro	Leu	Asp	Tyr	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Ala	Val	Gly	340	345	350	
Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Val	Ala	Gly	Phe	Thr	355	360	365	
Gly	Phe	His	Gln	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Asp	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	370	375	380	
Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Asn	Asp	Glu	Met	Val	385	390	395	400
Leu	Leu	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Lys	Ser	Gln	405	410	415	
Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	His	Asn	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	His	Leu	420	425	430	
Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	435	440	445	
Arg	Ser	Ser	Ile	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Met	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	450	455	460	
Tyr	Tyr	Gln	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	465	470	475	480

ES 2 659 086 T3

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

Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro
500 505 510

Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp
515 520 525

Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys
530 535 540

Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr
545 550 555 560

Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
565

<210> 12

<211> 575

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la SEQ ID NO: 10 más la secuencia del péptido de tránsito optimizado directamente situada en el extremo N terminal de la proteína

<220>

<221> TRÁNSITO

<222> (1)..(125)

<223> Péptido de tránsito optimizado para los cloroplastos

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (128)..(133)

<223> Marca His constituida por 6 His

<400> 12

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

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

ES 2 659 086 T3

Ala	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Lys	Ala	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	35	40	45
Asn	Gly	Gly	Arg	Val	Gln	Cys	Met	Gln	Val	Trp	Pro	Ala	Tyr	Gly	Asn	50	55	60
Lys	Lys	Phe	Glu	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	65	70	75
Thr	Val	Met	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Phe	Gln	Gly	85	90	95
Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Val	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	100	105	110
Leu	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Gly	Gly	Arg	Ile	Arg	Cys	Ala	Met	Ala	His	115	120	125
His	His	His	His	His	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gln	Asn	His	130	135	140
Asp	Asp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	145	150	155
Lys	Phe	Val	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Lys	Val	Lys	Arg	165	170	175
Phe	His	His	Ile	Glu	Phe	Trp	Cys	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	180	185	190
Arg	Phe	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Met	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	195	200	205
Ser	Thr	Gly	Asn	Met	Val	His	Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	210	215	220
Leu	Arg	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	225	230	235
Glu	Ile	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Asp	His	Gly	245	250	255
Ser	Cys	Arg	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	His	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	260	265	270
Ala	Ile	Glu	Val	Glu	Asp	Ala	Glu	Ser	Ala	Phe	Ser	Ile	Ser	Val	Ala	275	280	285

ES 2 659 086 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser

```

ES 2 659 086 T3

	545	550	555	560											
	Ile	Glu	Glu	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Lys	Gln	Leu	Val	Gly
					565					570					575
5	<210> 13 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial														
10	<220> <223> Cebador Xho-OTP-for <400> 13 ctcgagatgg cttcgatctc ctcctc26														
15	<210> 14 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial														
20	<220> <223> Cebador NcoI-OTP-rev <400> 14 cccatggcgc accggattct tccgcc26														
25	<210> 15 <211> 1110 <212> ADN <213> Secuencia artificial														
30	<220> <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de <i>Picrophilus torridus</i> optimizada para plantas dicotiledóneas														
35	<400> 15														

ES 2 659 086 T3

```

atggccttacg gaaagaacct tatttctgag cttagagaga aagagatctt caagaggctt      60
catcacgttg agttctacgt ttcttccgct aagacttggc cctacttcat gaatagggga      120
ctcggattca agactgttgc ttatgctgga ccagaaactg gaatcaggga taagatctcc      180
tacgttatgt ctcaaggtag tgctaggatt tctttcactt cctccatgaa cgatgattcc      240
tacatttcca accacgttaa gaaacacggc gatggtgtta aggatatcgc tctcgaagtg      300
gatgatcttg atgaggctaa gtctctcatt gagaagtacg gaactaaggc gtccaagatc      360
aacgagatca aggatggaaa cggaaagatt aggactgctg agatcaagac ttacggtgaa      420
actgtgcaca ctcttatcga gactgggtgat tacaacgggtg ttttcatgcc aggatacgaa      480
gagtctgaga tcaactccaa gaacactggc atcaaaaaaa tcgatcacat tgtgggaaat      540
gtttacgagg gtgaaatgga ttcttgggtg aacttctaca ttgagaagtt gggattcgag      600
caccttatca ctttcgatga taaggatgc aggactgatt actctgctct taggtctaag      660
gtggtgaagt acaacgatga tatcgtgttc cctattaacg aaccagctaa gggacttagg      720

aagtcccaa tcgaagagta cctcgattat taccgttctg aggggtgttc acacattgct      780
ttgctcacag acgatatcat caagactgtg tccatgatgg aagagaacgg aattgagttc      840
cttaagactc caggatctta ctacgagtct ttgtcctcta ggattggatc tatcgatgag      900
gatctcaacg aaatcgagaa gcacaacatt cttgtggata gggatgagaa cggatacctt      960
ctccagattt tactaagcc agtgactgat aggccaacat tcttcttcga agtgatccaa     1020
agaaaggggtg ctagatcttt cggaaacgga aacttcaagg ctcttttcga ggctattgag     1080
agagaacaag ctaagagggg aaacctttga                                     1110

```

<210> 16

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de Zea mays

<400> 16

```

atggcatatg gcaaaaatth aatctcagaa ctaagggaaa aggagatctt taaacgatta      60
catcacgtgg aatthttacgt tagcagtgcc aaaacatggg catatthtcat gaacaggggt      120
cttggattta aaacagtggc atatgccggg ccagaaaccg ggataaggga caagatatcc      180
tatgttatgt cccagggcac tgcaaggata tctthttacat catcaatgaa tgatgatagc      240
tatatatcga atcatgttaa aaaacacggg gatggcgtaa aggatatagc acttgaggtc      300
gatgatctgg acgaggcaaa aagcctgata gaaaagtatg gaacaaagggt ttcaaaaata      360
aatgaaataa aggatggaaa tggaaagata agaactgcag agataaaaaac gtacgggtgaa      420
accgttcata cattaataga aaccggggat tacaatggcg tattcatgcc cggttatgag      480
gaatctgaaa taaattcaaa aaacactggg ataaaaaaga tcgatcatat agttggaaat      540
gtctatgagg gcgagatgga tagctgggtt aatthtttaca tagaaaaact tggctttgag      600
catttaataa cctttgatga taaagatata agaactgatt acagcgcat t aagatcaaag      660
gttgtaaaat acaatgacga tatcgtatth ccaataaatg agcctgcaaa gggcttaaga      720
aaatcacaga tagaggaata tcttgactat tacaggtctg agggcggttca gcacatagca      780
ctgttaactg atgatataat aaaaactgta tccatgatgg aggaaaacgg catagaatth      840
ttaaaaaacac caggatcata ctatgaatcc ctatcatcaa ggataggctc aatagacgag      900
gatttaaatg aaatagagaa acataacata cttgtggatc gtgatgagaa cggataccta      960
ttacagatct tcacaaagcc tgttactgac aggccaacgt tcttctttga ggtcatacag     1020
agaaagggtg caaggtcatt cggcaacggg aactthtaagg cactthtttga ggcgatagaa     1080
agggagcagg caaagagagg aaacctatga                                     1110

```

<210> 17

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de *Brassica napus*

<400> 17

```

atggccttatg ggaaaaacct catctcagag cttagggaaa aggaaatatt caaaagactc      60
catcacgtgg agtttttatgt ttcctctgcc aaaacttggg cttattttat gaacagaggt      120
ctcggtttta agactgtggc ctacgccggg cctgaaacag gaattcgaga caaaatttcc      180
tacgtcatgt cacaaggtac agctagaatt agtttcacat cctcaatgaa tgatgactcg      240
tacataagca accatgtcaa gaagcacgga gacggagtaa aagatatcgc gttggaggta      300
gacgatcttg acgaagctaa gagtttgata gaaaagtacg gtacgaaagt ttccaagatc      360
aatgagatta aagatggtaa cggtaaaata cgcactgccg agatcaagac ttacggggaa      420
acggtgcaca ccttgattga gacaggagac tacaatggag tattcatgcc cggttacgaa      480
gaaagcgaaa ttaacagcaa gaataccggt atcaagaaga tagatcacat cgtaggaaac      540
gtctacgaag gagagatgga ctcatgggtc aatttctata tcgagaagtt gggtttcgaa      600
cacttaataa catttgacga caaagatata cgaacagact attccgcatt gcgttcaaaa      660
gttgtgaaat acaacgatga tatagtgttc cctatcaatg agcccgctaa gggcctaaga      720
aagtcgcaga ttgaagagta cttggactac taccgctctg aggggggttca gcatattgct      780
ctggtgactg atgatattat taagacagtc agtatgatgg aggagaacgg tattgaattc      840
ttgaaaacac ccggctcgta ctacgaatcc ttgtcttcaa gaatcggaag tatcgatgag      900
gatcttaacg aaatcgagaa gcacaacatc ctggtggatc gtgacgagaa cggatatctc      960
ctgcaaattc tcacaaagcc agtaactgac cgccctactt tcttttttga agtgattcaa     1020
cgtaaggag ctagatcctt tggtaatggg aacttcaaag cgctgttcga agctatcgaa     1080
agagagcagg ccaagagagg caatctgtga                                     1110

```

<210> 18

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de *Beta vulgaris*

<400> 18

```

atggccttacg gaaaaaattt aatcagcgaa ctacgtgaaa aggagatatt caaaaggctg      60
catcatgtag agtttttacgt atctagtgcg aaaacttggg catatttcat gaaccgagga      120
ttaggattca agacagtagc gtatgctgga cctgaaacag gaatacgtga caagatttcg      180
tacgttatga gtcagggtac ggcccgaata tcttttacca gttccatgaa tgacgattcg      240

```

ES 2 659 086 T3

tatatctcaa accatgttaa aaagcatgga gatggtgtta aggatattgc tttggagggt	300
gatgatcttg atgaggccaa atctcttata gaaaaatatg gtacaaaggt cagtaaaatc	360
aatgaaatca aggatggtaa cggtaagatt aggactgctg aaattaagac gtatggtgaa	420
acagttcata ctcttatcga gaccggtgac tataacgggg ttttcatgcc agggatatgag	480
gagagcgaaa ttaattcaaa gaatactggc attaagaaaa tagatcatat cgttggtaac	540
gtttatgaag gagaaatgga tagttgggtc aacttctata ttgaaaaatt gggttttgag	600
catctcatta cattcgacga taaggatatt aggactgatt actctgcatt gaggtctaag	660
gttggttaagt ataatgatga tatagtattc ccgatcaatg aacctgccaa aggcttgagg	720
aaatcgcaga tagaagagta tctggattat tataggtcag agggcgtcca acatatagcc	780
ttgttgactg atgacataat taaaactggt tcgatgatgg aggaaaacgg aatagagttt	840
ttgaagacct cgggatctta ttatgagagc ctatcatcac gtattgggag tattgatgaa	900
gacttgaatg agattgagaa gcataacata ttagttgatc gtgacgagaa tggttacctc	960
ctccaaatct ttactaaacc tgtgacagat cgtccaacat tttttttcga ggtcatccaa	1020
cgcaaggggtg ctcgtagttt cggtaacgga aatttcaaag ctctttttga ggccatagaa	1080
agagaacaag ccaaaagggg gaatttgtag	1110

<210> 19

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de *Gossypium hirsutum*

<400> 19

```

atggcttacg gaaaaaacct gatatccgaa ttgagagaaa aagaaatatt caagaggctt      60
caccatgtgg aattctatgt cagttccgcc aaaacttggt cctactttat gaaccgtggc      120
cttggtttca agacggtggc atatgcagga cccgaaacag ggattagaga caagatttca      180
tacgtgatgt ctgaggaac cgcccgcat tcttccactt cttccatgaa cgatgattcc      240
tatattagta accacgtcaa gaaacatggt gatggagtta aggatatagc tttggaggtg      300
gacgaccttg atgaggcgaa atcactgatc gaaaagtatg gtacgaaagt ttcaaagatt      360
aacgaaatta aggatggtaa cggaaaaatt cggaccgcag aaattaaaac atatggtgaa      420
accgtgcaca cacttatcga gacgggtgat tataatggag tttttatgcc aggctacgag      480
gaaagcgaaa ttaacagtaa gaatactggg ataaagaaaa tcgatcatat cgttgggaac      540
gtgtacgaag gcgaaatgga tagttgggtt aatttctaca ttgagaagtt gggtttcgag      600
catctcatta ctttcgatga caaggacatt cggaccgact attctgcttt gagatctaaa      660
gttgtaaaat acaacgacga catcgtgttt cccattaacg agccggcaaa aggcttgaga      720

aagtcgcaga ttgaggaata tcttgattat tatcgtagcg aaggagttca acacatcgct      780
cttttgaccg atgacattat aaaaactgtg tcaatgatgg aagaaaatgg cattgagttt      840
ctcaaaaccc caggctcata ctacgaatct ttatcttcga gaattgggtt aatcgatgag      900
gatttaaatg agattgagaa acataatata ttggttgacc gggatgagaa cggatatctt      960
cttcaaatat ttaccaagcc agttacagat aggccacct tcttttttga agttattcag     1020
cgtaaagggtg ctcggtcggt cggcaatggc aattttaagg ctctctttga ggccatcgaa     1080
agggagcagg ccaagcgtgg aaacctatga                                     1110

```

<210> 20

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 20

ES 2 659 086 T3

```

atggcctacg ggaagaactt gatatcggag ctgcgagaaa aagaaatctt caagaggctt      60
catcatgtag aattctatgt ctctcggca aaaacttgggt cttattttat gaatagaggt      120
ttgggattca agacagtggc ttatgccgga cctgagaccg gtattagaga taaaatttct      180
tacgttatgt ctcaaggtag cgccagaatt tccttcacca gttctatgaa tgacgatagt      240
tatatatcca atcatgttaa aaagcatggc gacgggggtga aagatattgc acttgaagtg      300
gatgatcttg acgaagcaaa atccctaatac gagaagtacg gcaccaaggt ctcaaagata      360
aatgaaatta aggatggaaa tggaaagata agaaccgcag aaatcaagac atacggtgag      420
acagttcata ctttgattga aacagggtgat tacaacggag tgtttatgcc tgggtatgag      480
gaatctgaga ttaattcaaa gaacaccgga ataaagaaga ttgatcatat tgtaggcaat      540
gtgtatgaag gcgagatgga tagctgggtc aatttttata tcgaaaaact tgggtttgaa      600
cacctgataa ctttcgatga taaggacatc agaacggatt attctgccct tcgtagcaag      660
gtggtgaaat acaatgatga catagttttc ccaataaacg agcccgctaa aggtcttaga      720
aagtctcaga ttgaggagta cttagactac tacagggtctg agggcgtgca gcatatcgcg      780
ctcttgactg acgacatcat taaaaccgtg tccatgatgg aagaaaatgg tatcgagttt      840
ctcaagacac ccggtagtta ttacgagtca ttgtccagta ggattgggtc tattgatgag      900
gatttgaacg aaattgagaa acataatatt ttggtagata gagatgagaa tggctatctc      960
cttcagatat ttaccaagcc agtgactgat agaccgacat tcttcttcga gggtattcag     1020
agaaagggag ctagatcatt cggaacggg aactttaagg ccctctttga agcaatagaa     1080
cgggagcaag caaaaagggg caacctctaa                                     1110

```

<210> 21

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 21

```

atggcctacg gcaagaatth gatctcggag ttacgcgaaa aagagattht caagcgcctg      60
caccacgttg agthtttacgt gagcagtgcc aagacttggt cgtatthttat gaatagggggc      120
cttgggttta agacggttgc gtacgctggg cccgagaccg gtatccgtga taaaatctcg      180
tacgtgatgt ctcaggggaa cgcccgatat tccttcacgt cctcaatgaa cgacgattcc      240
tacattagta accacgttaa aaagcacggt gacggagtga aggacattgc ccttgagggt      300
gacgacctag acgaagcgaa gtcactgatc gagaagtacg gcactaaggt ctcaaagatt      360
aacgaaatca aggacggaaa cggcaagatc aggaccgcgg agatcaagac gtacggagaa      420
acagtccaca ccctcatcga gactggcgac tacaatggcg thttcatgcc tggttacgag      480
gagtccgaaa tcaattccaa gaacactggt attaagaaga tcgaccatat tgtcggcaac      540
gtatatgaag gggagatgga ctctgggtc aatttctata tcgaaaagtt gggcttcgag      600
cacctaatac ccttcgatga caaagacata aggaccgact actctgctct acgtagtaag      660
gtggtcaagt acaacgatga tatagtcttc ccaattaacg agccggctaa gggccttcgg      720
aagtcccaga tagaagaata ccttgactac taccgaagcg aaggcgtgca gcacattgcc      780
ctcctaaccg atgatattat caagacggtg tctatgatgg aagagaatgg tatcgagttc      840
ttaaagacac cgggttctta ttacgaatca ctgtcatctc ggattggctc tatcgatgag      900
gacctcaacg aaatcgagaa gcataacatc ctggttgaca gagatgagaa cggctacctg      960
ttgcagatat tcaccaagcc ggtcacccgac cgcccgacct tcttcttcga ggtgatccaa      1020
cgcaagggcg ctagatcatt cggcaatggg aacttcaagg cgctgtttga ggccatcgag      1080
cgcgagcagg caaaacgcgg taacctctga      1110

```

<210> 22

<211> 1110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de *Oriza sativa*

<400> 22

```

atggcatacg ggaagaacct tatatcggaa ttacgcgaaa aagagatctt caagagactt      60
caccatgtgg agthtttacgt gtccagcgca aagacctggt cgtacttcat gaaccgcggg      120
ctgggtttca aaactgtggc ttacgcgggt ccagagacag gcattcgcga taagatttca      180

```

ES 2 659 086 T3

```

tacgttatgt ctcaagggac cgcccgcatc agcttcacct cttcaatgaa cgacgatagc 240
tatatctcaa accacgtaaa gaagcatgga gatggagtga aagacatcgc tctggaggta 300
gacgatctcg acgagggcga gtcgctaata gaaaaatatg ggactaaggt ctctaaaatc 360
aacgagatta aggatgggaa tggtaagatc cgtacagccg agatcaaaac gtatggggag 420
acagtccaca ctctaatacg aacgggagac tacaatgggg tcttcatgcc tggttacgaa 480
gagtcggaga ttaattccaa gaacacgggc attaagaaaa ttgaccacat tgttggcaac 540
gtgtacgagg gagagatgga cagctgggtg aacttctaca tcgaaaaact gggcttcgag 600
caccttatca cattcgacga taaggacatc cgcaccgact actcggcggt gcgttccaag 660
gtcgtcaagt acaacgacga cattgtgttt cctatcaatg aacctgctaa gggccttcgt 720
aagtcacaaa tagaggaata tttagactac tatcgctccg aaggagtgca gcatatcgcc 780
ctattgacag atgatataat caaaaccgtt tcgatgatgg aagaaaacgg catcgagttc 840
ctcaagaccc cgggaagtta ttacgaaagt ctctcaagcc ggatcggctc aatcgacgaa 900
gaccttaacg aaatcgagaa gcacaacata ctggttgacc gagatgaaaa cggctacctc 960
cttcagatct tactaagcc agtgactgat cgccctacgt ttttcttcga ggtgattcaa 1020
cgtaaaggcg cacgctcctt cggtaatggg aacttcaaag ccctcttcga ggctatcgag 1080
cgtgagcagg caaaagagg aaatctgtaa 1110

```

<210> 23

<211> 1110

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de *Picrophilus torridus* optimizada para plantas de *Triticum aestivum*

<400> 23

ES 2 659 086 T3

atggcatacg gcaagaatct cattagcgaa cttagggaga aggagatctt caagcggctc	60
catcacgttg agttttacgt cagttcagca aaaacctgga gttacttcat gaacagggga	120
cttggcttca agaccgtcgc atacgccgga cccgagactg ggattcggga caagatatca	180
tacgttatgt cacagggcac cgctcggatt tccttcacct cttctatgaa cgacgattct	240
tatatatcga accatgtgaa gaaacatggt gatggagtga aggacatcgc cctagaggtg	300
gacgacctcg acgaggccaa gtccttaatt gagaagtacg gcacgaagggt gtccaaaatc	360
aacgaaatca aggacggcaa cggcaaaatc cgcaccgcag agatcaagac ctacggcgag	420
acagtccaca cgcttatcga gaccggggac tataacggcg tgttcatgcc aggatacgaa	480
gagtcagaga taaactcaaa gaacactggg atcaagaaga tcgaccatat agtggggaac	540
gtttacgaag gggagatgga tagctgggtc aacttctaca tagagaagct cggggttgag	600
cacctaataa ccttcgacga caaggatata aggacggact actccgcact ccgcagtaag	660
gtggtgaagt ataatgacga tatagtcttc ccaattaacg agcccgctaa ggggctaaga	720
aagagtcaga tcgaagagta tctcgactat taccgatcgg aggggtgttca acatattgcg	780
ctcctcactg acgatattat caagactgtt tccatgatgg aggagaacgg aattgagttc	840
ctgaagacgc caggtagcta ctacgaatct ctttcaagcc ggatcggaag cattgacgaa	900
gatctgaatg agatagaaaa gcacaacatt ctggtagacc gtgatgagaa tggctacctg	960
ctacaaatct tcacaaaacc agttactgac aggccaacct tctttttcga agtgatccag	1020
cggaaaggag caagatcttt cgggaatggc aatttcaagg cattgttcga ggcgattgag	1080
cgggagcagg cgaagagggg caatctgtaa	1110

REIVINDICACIONES

1. Un gen quimérico que comprende una secuencia codificante unida operativamente a un promotor expresable en plantas, en que el último es un elemento regulador heterólogo para la secuencia codificante, **caracterizado porque** la secuencia codificante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, o una proteína HPPD con una identidad entre secuencias de por lo menos 80 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, desde la posición de aminoácido 2 hasta la posición de aminoácido 368, que muestra las propiedades de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato a homogentisato, y que es menos sensible a un herbicida inhibidor de la HPPD que la HPPD endógena de la planta hospedadora.
2. El gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende corriente arriba de la secuencia codificante de HPPD una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito activo en plantas, de manera tal que dicho gen quimérico codifica una proteína de fusión del péptido de tránsito/HPPD.
3. Un vector que comprende por lo menos un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Una célula de planta, parte de planta, planta o semilla, **caracterizada porque** comprende un gen quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La célula de planta, parte de planta, planta o semilla de la reivindicación 8, que comprende también un gen quimérico que codifica una enzima PDH (pfeferato deshidrogenasa).
6. La célula de planta, parte de planta, planta o semilla de la reivindicación 4 o 5, que comprende adicionalmente uno o más genes quiméricos que confieren tolerancia a reguladores del crecimiento, preferentemente a 2,4-D o dicamba, y/o a herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), la EPSP sintasa (EPSPS) y la glutamina sintasa (GS).
7. Un procedimiento de obtención de una planta tolerante a un herbicida inhibidor de la HPPD, **caracterizado porque** se introduce un gen quimérico en dicha planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Un procedimiento de obtención de un aceite o una harina, que comprende hacer crecer una planta de acuerdo con la reivindicación 5, 6 o 7, opcionalmente tratar tal planta con un herbicida inhibidor de la HPPD, cosechar los granos y moler los granos para fabricar harina, y opcionalmente extraer el aceite.
9. Uso de una proteína HPPD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o de una proteína HPPD con una identidad entre secuencias de por lo menos 80 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y cuya proteína HPPD muestra las propiedades de catalizar la conversión de para-hidroxifenilpiruvato a homogentisato para hacer a las plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de la HPPD.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los herbicidas inhibidores de la HPPD se seleccionan entre el conjunto que consiste en: isoxaflutol, tembotriona, mesotriona, sulcotriona, pirasulfotol, topamezona, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ fenil)propano-1,3-diona, biciclopirona, benzobiciclona, tefuriltriona, dicetonitrilo y pirazoxifeno.

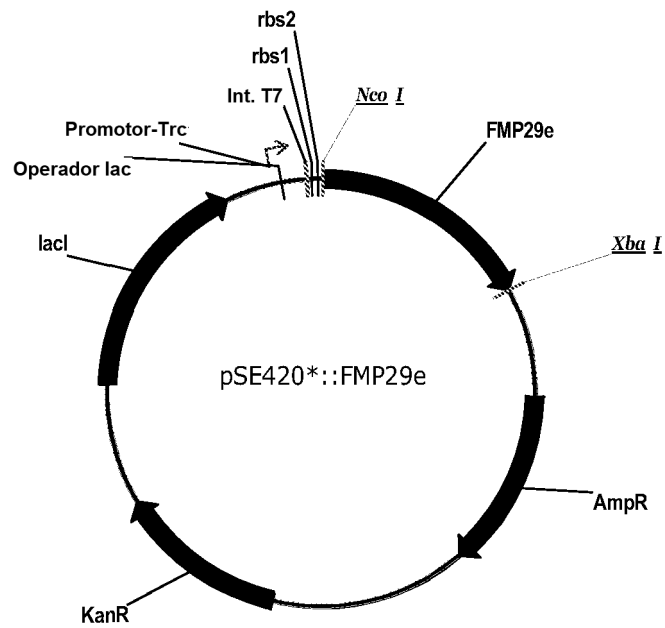


Figura 1: mapa del plásmido pSE420-FMP29e

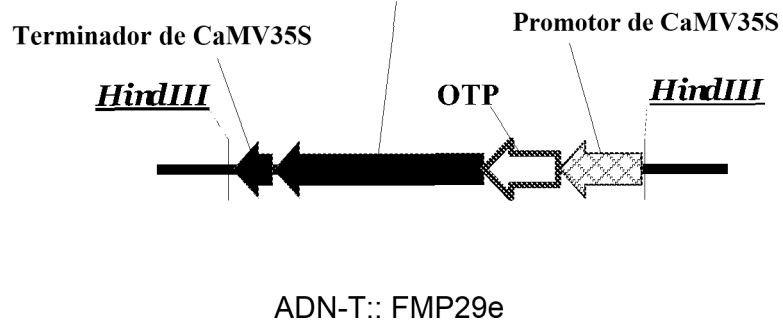


Figura 2: mapa del ADN-T insertado en las plantas de tabaco.

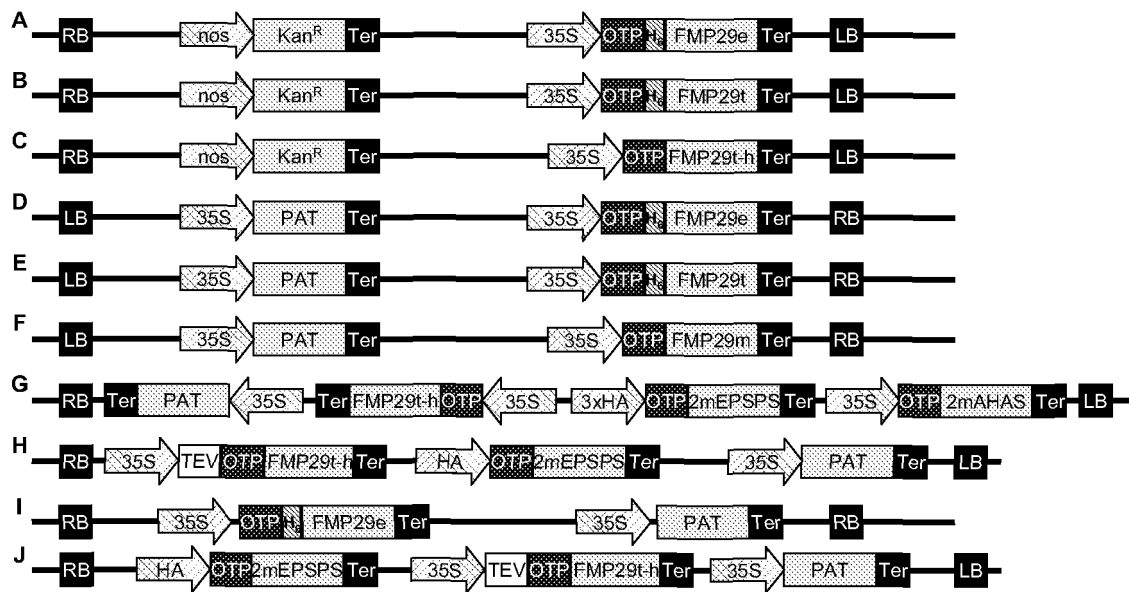


Figura 3: Mapa de los diferentes ADN-T insertados en las plantas