(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 335 288**

(51) Int. Cl.:
***C12N 15/82*** (2006.01)
***A01H 5/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05010762 .2**
(96) Fecha de presentación : **18.05.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1598423**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

(54) Título: **Plantas resistentes a compuestos herbicidas.**

(30) Prioridad: **18.05.2004 JP 2004-147363**
**14.03.2005 JP 2005-70980**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**24.03.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**24.03.2010**

(73) Titular/es:
**SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED**
**27-1, Shinkawa 2-chome**
**Chuo-ku, Tokyo 104-8260, JP**

(72) Inventor/es: **Matsushima, Yutaka y**
**Nagasawa, Akitsu**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a compuestos herbicidas.

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

La presente invención se refiere a una planta resistente a compuestos herbicidas.

#### Descripción de la técnica relacionada

El compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa está contenido como ingrediente activo en un agente para el control de las malas hierbas. Como plantas a las que se ha conferido resistencia al compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, se conocen por ejemplo, (1) una planta que expresa en exceso la protoporfirinógeno IX oxidasa en el organismo vegetal, (2) una planta que expresa una variante de protoporfirinógeno IX oxidasa en el organismo vegetal, donde la mutación ha sido introducida en la secuencia de aminoácidos de dicha protoporfirinógeno IX oxidasa de manera que la sensibilidad a un compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa se reduzca (por ejemplo, descrita en la Publicación de Patente Internacional 97/32011 y similares), (3) una planta que expresa citocromo P-450 derivado de actinomyces de manera que semejante compuesto herbicida de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa es metabolizado para su inactivación en el organismo vegetal (por ejemplo, descrita en la Publicación de Patente Internacional 03/40370) y similares.

### Compendio de la invención

En cuanto a la planta resistente al compuesto herbicida anterior, tiende a producirse la fitotoxicidad del compuesto herbicida, puesto que la acción herbicida del compuesto herbicida es generalmente inmediata. Por lo tanto, se ha deseado desarrollar una planta en la que esté adicionalmente reducida la fitotoxicidad del compuesto herbicida.

La presente invención se define en las reivindicaciones. Para una explicación adicional, la presente invención proporciona una planta a la cual se ha conferido resistencia sinérgica al compuesto herbicida introduciendo en la planta una combinación de dos clases de proteínas con diferentes funciones. Es decir, la presente invención proporciona,

1. una planta a la que se confiere resistencia a al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, donde en dicha planta se han introducido y se han expresado ambos de los siguientes ADN (en adelante, puede ser referida como planta de la presente invención):

   (1) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa, y

   (2) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida; donde el citocromo P450 deriva de una bacteria;

2. la planta del apartado 1 anterior, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa y dicho citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida combinados en dicha planta producen una resistencia sinérgica a dicho compuesto herbicida;

3. la planta de los apartados 1 o 2 anteriores, donde dicho citocromo P450 es el citocromo P450 derivado de actinomyces;

4. la planta de los apartados 1 o 2 anteriores, donde dicho citocromo P450 se selecciona del grupo que consiste en:

   (1) citocromo P450 derivado de actinomyces perteneciente a Streptomyces,

   (2) citocromo P450 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de 90% o más con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o 2,

   (3) citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, y

   (4) citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2;

5. la planta de uno cualquiera de los apartados 1 a 4 anteriores, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa es una proteína derivada de una planta y que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa;

6. la planta de uno cualquiera de los apartados 1 a 4 anteriores, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa es

(1a) una proteína derivada de una planta y que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa que es inhibida por dicho compuesto herbicida, o

(1b) una proteína derivada de una planta que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa que no es inhibida por dicho compuesto herbicida;

7. un método para producir una planta resistente a un compuesto herbicida que comprende transformar una planta con ambos de los siguientes ADN:

(1) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa, y

(2) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, donde el citocromo P450 deriva de una bacteria, de manera que dichos ADN son expresados en dicha planta y dicha planta muestra resistencia a dicho compuesto herbicida; y propagar dicha planta;

8. un método para controlar malas hierbas que comprende una etapa de aplicación a una zona de cultivo de la planta de uno cualquiera de los apartados 1 a 6 anteriores, de un compuesto al que dicha planta muestra resistencia, (en adelante se puede referir como método para controlar malas hierbas de la presente invención);

9. un método para seleccionar una planta resistente a un compuesto herbicida, comprendiendo dicho método:

(1) una etapa de aplicación o adición a una zona de cultivo de la planta de uno cualquiera de los apartados 1 a 6 anteriores, de un compuesto al que dicha planta muestra resistencia, y

(2) una etapa de selección de una planta que ha sobrevivido al efecto de control de las malas hierbas de dicho compuesto aplicado o añadido; y

10. un método para conferir a una planta, resistencia a al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, comprendiendo dicho método una etapa de transformación de dicha planta y expresión en dicha planta de ambos de los siguientes ADN:

(1) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa, y

(2) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida; donde el citocromo P450 deriva de una bacteria; y

Material de propagación o porciones cosechables de la planta de la invención; donde dicho material de propagación o porciones cosechables comprenden ambos ADN definidos en la realización 1.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra el mapa de restricción del plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy.

La Fig. 2 muestra el mapa de restricción del plásmido pBI-NdG6-rSt-15B4soy.

La Fig. 3 muestra el mapa de restricción del plásmido pKFGMP03.

La Fig. 4 muestra el mapa de restricción del plásmido pSUM-NdG6-sPPOav.

La Fig. 5 muestra el mapa de restricción del plásmido pBI-NdG6-sPPOav.

La Fig. 6 muestra el mapa de restricción del plásmido pBI-35S-sPPOav.

La Fig. 7 muestra las fotos de la línea de tipo salvaje SR-1, las plantas de los ejemplos comparativos (líneas 6-S-1 y S-P-1) y de la presente invención (línea 6-P-1) desarrolladas durante 14 días en un invernadero después de pulverizar el compuesto (II) (cantidad aplicada 1,78 mg/20 mL líquido de pulverización).

La Fig. 8 es una figura que indica los resultados de eso, antes de pulverizar el compuesto (II), en cuanto al tabaco recombinante de las líneas 6-S-1, S-6-1, P-S-1, S-P-1, P-6-1, 6-P-1, 3-6-1, 6-3-1, 3-S-1 y S-3-1, la expresión del citocromo P450 se analizó utilizando la transferencia Western. La proteína se extrajo de la hoja de cada tabaco recombinante para investigar la acumulación de la proteína que tenía la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1. Las letras en la parte inferior de las calles de la figura indican la línea del tabaco recombinante. Asimismo, "Positivo" indica los resultados de la transferencia Western seguido de la electroforesis de los 10 ng de la proteína (la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1) producida mediante la expresión en *E. coli*, donde dicha proteína era el antígeno para el anticuerpo utilizado en el método de transferencia Western anterior.

La Fig. 9 es una figura que indica los resultados de eso, en cuanto a la línea de tipo salvaje SR-1, las líneas de tabaco recombinante 6-S-1, S-P-1, 6-P-1, 5-S-1 y 5-P-1, los ADN de los genes introducidos fueron amplificados a partir de la solución de ADN cromosómico mediante PCR, y los ADN amplificados fueron detectados después de la electroforesis en gel de agarosa. "Marcador" es 0,5 $\mu$g del marcador $\lambda$/Hind III (fabricado por TAKARA BIO INC.) aplicado a la electroforesis.

Las abreviaturas descritas en las figuras anteriores se explican más abajo.

$P450_{1609soy}$DNA: ADN que codifica el citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.

$P450_{1584soy}$DNA: el ADN que codifica el citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.

RuBPCOssCTP: la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de tránsito a cloroplastos de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de soja (cv. Jack).

CR16G6p: ADN en el que la secuencia de nucleótidos aguas arriba del sitio de restricción de la enzima de restricción NdeI es eliminada del promotor CR16G6.

CR16t: ADN en el que la secuencia de nucleótidos del sitio de restricción de la enzima de restricción ScaI es eliminada del terminador CR16.

NOSp: promotor del gen de la nopalina sintasa.

NPTII: gen de resistencia a kanamicina.

NOSt: terminador del gen de la nopalina sintasa.

35Sp: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

GUS: gen de la $\beta$-glucuronidasa.

RB: la secuencia del límite derecho del ADN T.

LB: la secuencia del límite izquierdo del ADN T.

ColE1 ori: el origen de replicación del plásmido ColE1.

$Km^r$: gen de resistencia a kanamicina.

DNA(sPPOav): el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de soja variante (sPPOav).

HindIII, EcoRI, EcoT221, SacI, NotI, SalI: sitios de restricción de las respectivas enzimas de restricción.

**Descripción detallada de la realización preferida**

Más adelante, se describirá con detalle la presente invención.

El agente para el control de las malas hierbas de la presente invención es una composición para el control de las malas hierbas que contiene un compuesto herbicida como ingrediente activo. La composición puede contener como compuestos insecticidas necesarios, compuestos fungicidas, compuestos reguladores del crecimiento vegetal, ingredientes fertilizantes y similares junto con el compuesto herbicida. En cuanto a tales agentes de control de las malas hierbas, por ejemplo, son composiciones que contienen como ingrediente activo un compuesto que inhibe la biosíntesis de porfirina y similares. En cuanto a los compuestos que inhiben la biosíntesis de porfirina, por ejemplo, existen compuestos que inhiben la actividad de la protoporfirinógeno IX oxidasa (EC 1.13.11.27, más adelante pueden ser referidos como PPO) y similares. Específicamente por ejemplo, como compuestos que inhiben la actividad de PPO (más adelante, pueden ser referidos como los presentes compuestos herbicidas), existen los compuestos descritos por Duke, S.O., Rebeiz, C.A. ACS Symposium Series 559, Porphyric Pesticides, Chemistry, Toxicology, y Pharmaceutical Applications. American Chemical Society, Washington DC (1994) y similares. En los presentes compuestos herbici-

das, están contenidas diferentes especies moleculares que tienen diferentes estructuras (Duke *et al*., Weed Sci. 39: pág 465 (1991): Nandihalli *et al*., Pesticide Biochem. Physiol. 43: pág. 193 (1992); Matringe *et al*., FEBS Lett. 245: p35 (1989); Yanase, Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: p70 (1989)), pueden ser, por ejemplo, difeniléter:

por ejemplo, clorometoxinilo, bifenox, cloronitrofeno (CNP), acifluorfeno (es decir ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitrobenzoico y similares) y su éster etilico, acifluorfeno sódico, oxifluorfeno (es decir 2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-trifluorometil-benceno), u oxadiazol (por ejemplo, oxadiazon (es decir 3-[2,4-dicloro-5-(1-metiletoxi)fenil]-5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona) y similares);

imida cíclica:

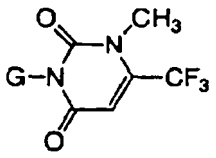
por ejemplo, S-23142 (*es decir* N-(4-cloro-2-fluoro-5-propargiloxifenil)-3,4,5,6-tetrahidroftalimida y similares), o clorftalim (es decir N-(4-clorofenil)-3,4,5,6-tetrahidroftalimida); fenilpirazol:

por ejemplo, TNPP-etilo (*es decir* 2-[1-(2,3,4-triclorofenil)-4-nitropirazolil-5-oxi]propionato de etilo) y similares;

derivados de piridina

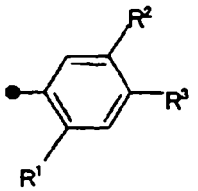
por ejemplo, LS82-556 (es decir N3-(1-feniletil)-2,6-dimetil-5-propionilnicotinamida) y similares; fenopilato, análogo o-fenilpirrolidinocarbamato de fenopilato, o análogo piperidinocarbamato de fenopilato y similares.

En cuanto a los presentes compuestos herbicidas, puede existir, específicamente por ejemplo, un compuesto de la siguiente fórmula (I):

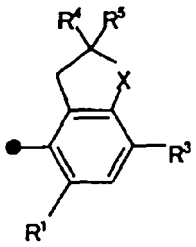


(I)

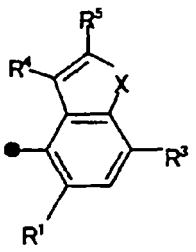
donde en la fórmula (I) G representa un grupo mostrado en una cualquiera de los siguientes G-1 a G-9:



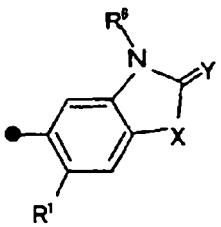
G-1



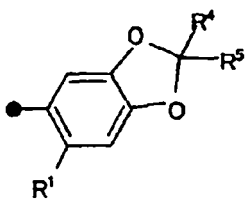
G-2



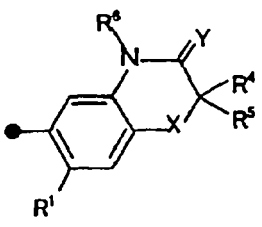
G-3



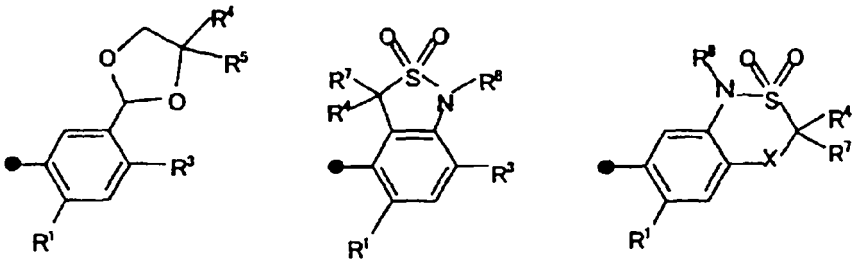
G-4



G-5



G-6



G-7 G-8 G-9

donde en G-1 a G-9,

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

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

$R^1$ representa un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

$R^2$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_8$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_8$, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo -$OR^9$, un grupo -SH, un grupo -S(O)p$R^9$, un grupo -$COR^9$, un grupo -$CO_2R^9$, un grupo -C(O)$SR^9$, un grupo -C(O)$NR^{11}R^{12}$, un grupo -$CONH_2$, un grupo -CHO, un grupo -$CR^9$=$NOR^{18}$, un grupo -$CH$=$CR^{19}CO_2R^9$, un grupo -$CH_2CHR^{19}CO_2R^9$, un grupo -$CO_2N$=$CR^{13}R^{14}$, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo -$NHSO_2R^{15}$, un grupo -$NHSO_2NHR^{15}$, un grupo -$NR^9R^{20}$, un grupo -$NH_2$ o un grupo fenilo que puede estar sustituido con un o más grupos alquilo $C_1$-$C_4$ que pueden ser iguales o diferentes;

p representa 0, 1 o 2;

$R^3$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_2$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_2$, un grupo -$OCH_3$, un grupo -$SCH_3$, un grupo -$OCHF_2$, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro o un grupo alcoxi $C_1$-$C_3$ sustituido con un grupo fenilo que puede estar sustituido en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$, un grupo $OR^{28}$, un grupo $NR^{11}R^{28}$, un grupo $SR^{28}$, un grupo ciano, un grupo $CO_2R^{28}$ y un grupo nitro;

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

$R^5$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$, un grupo ciclopropilo, un grupo vinilo, un grupo alquinilo $C_2$, un grupo ciano, un grupo -C(O)$R^{20}$, un grupo -$CO_2R^{20}$, un grupo -C(O)$NR^{20}R^{21}$, un grupo -$CHR^{16}R^{17}CN$, un grupo -$CR^{16}R^{17}C(O)R^{20}$, un grupo -$C_1{}^6R^{17}CO_2R^{20}$, un grupo -$CR^{16}R^{17}C(O)NR^{20}R^{21}$, un grupo -$CHR^{16}OH$, un grupo -$CHR^{16}OC(O)R^{20}$ o un grupo -$OCHR^{16}OC(O)NR^{20}R^{21}$, o, cuando G representa G-2 o G-6,

$R^4$ y $R^5$ pueden representar un grupo C=O junto con el átomo de carbono al que están unidos;

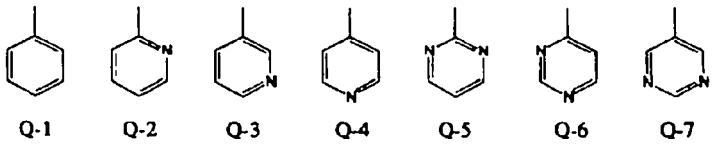
$R^6$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alcoxialquilo $C_2$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$ o un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$;

$R^7$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un átomo de halógeno, un grupo -$S(O)_2$(alquilo $C_1$-$C_6$) o un grupo -$C(=O)R^{22}$;

$R^8$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_8$, un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_8$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_8$, un grupo alcoxialquilo $C_2$-$C_8$, un grupo alcoxialcoxialquilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_8$, un grupo alquilsulfonilo $C_1$-$C_8$, un grupo haloalquilsulfonilo $C_1$-$C_8$, un grupo alcoxicarbonilalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo -$S(O)_2NH$(alquilo $C_1$-$C_8$), un grupo -C(O)$R^{23}$ o un grupo bencilo que puede estar sustituido con $R^{24}$ en el anillo de fenilo;

$R^9$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_8$, un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_8$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_8$, un grupo alcoxialquilo $C_2$-$C_8$, un grupo alquilalquilo $C_2$-$C_8$, un grupo alquilsulfinilalquilo $C_2$-$C_8$, un grupo alquilsulfonilalquilo $C_2$-$C_8$, un grupo alcoxialcoxialquilo $C_4$-$C_8$, un grupo cicloalquilalquilo $C_4$-$C_8$, un grupo cicloalcoxialquilo $C_4$-$C_8$, un grupo alqueniloxialquenilo $C_4$-$C_8$, un grupo alquiniloxialquilo $C_4$-$C_8$, un grupo haloalcoxialquilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalqueniloxialquilo $C_4$-$C_8$, un grupo haloalquiniloxialquilo $C_4$-$C_8$, un grupo cicloalquiltioalquilo $C_4$-$C_8$, un grupo alqueniltioalquilo $C_4$-$C_8$, un grupo alqueniltioalquilo $C_4$-$C_8$, un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ sustituido con un grupo fenoxi que puede estar sustituido en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$ y un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$, un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ sustituido con un grupo benciloxi que puede estar sustituido en

el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$ y un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$, un grupo trialquilsililalquilo $C_4$-$C_8$, un grupo cianoalquilo $C_2$-$C_8$, un grupo halocicloalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_8$, un grupo alcoxialquenilo $C_5$-$C_8$, un grupo haloalcoxialquenilo $C_5$-$C_8$, un grupo alquiltioalquenilo $C_5$-$C_8$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_8$, un grupo alcoxialquinilo $C_5$-$C_8$, un grupo haloalcoxialquinilo $C_5$-$C_8$, un grupo alquiltioalquinilo $C_5$-$C_8$, un grupo alquilcarbonilo $C_2$-$C_8$, un grupo bencilo que puede estar sustituido en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$, un grupo $-OR^{28}$, un grupo $-NR^{11}R^{28}$, un grupo $-SR^{28}$, un grupo ciano, un grupo $-CO_2R^{28}$ y un grupo nitro, un grupo $-CR^{16}R^{17}COR^{10}$, un grupo $-CR^{16}R^{17}CO_2R^{20}$, un grupo $-CR^{16}R^{17}P(O)(OR^{10})_2$, un grupo $-CR^{16}R^{17}P(S)(OR^{10})_2$, un grupo $-CR^{16}R^{17}C(O)NR^{11}R^{12}$, un grupo $-CR^{16}R^{17}C(O)NH_2$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})COR^{10}$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})CO_2R^{20}$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})P(O)(OR^{10})_2$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})P(S)(OR^{10})_2$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})C(O)NR^{11}R^{12}$, un grupo $-C(=CR^{26}R^{27})C(O)NH_2$, o uno cualquiera de los anillos mostrados en Q-1 a Q-7:



Q-1 Q-2 Q-3 Q-4 Q-5 Q-6 Q-7

que pueden estar sustituidos en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_2$-$C_6$, un grupo haloalquenilo $C_2$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_2$-$C_6$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo alcoxialquilo $C_2$-$C_8$, un grupo $-OR^{28}$, un grupo $-SR^{28}$, un grupo $-NR^{11}R^{28}$, un grupo alcoxicarbonilaquilo $C_3$-$C_8$, un grupo carboxialquilo $C_2$-$C_4$, un grupo $-CO_2R^{28}$ y un grupo ciano;

$R^{10}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_2$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$ o un grupo tetrahidrofuranilo;

$R^{11}$ y $R^{13}$ representan independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo $C_1$-$C_4$;

$R^{12}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo $C_2$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo fenilo que puede estar sustituido en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ y un grupo alcoxi $C_1$-$C_4$ o un grupo $-CR^{16}R^{17}CO_2R^{25}$; o,

$R^{11}$ y $R^{12}$ juntos pueden representar $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_4-$ o $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$, o en ese caso el anillo resultante puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado entre un grupo alquilo $C_1$-$C_3$, un grupo fenilo y un grupo bencilo;

$R^{14}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ o un grupo fenilo que puede estar sustituido en el anillo con un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$ y un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$; o,

$R^{13}$ y $R^{14}$ pueden representar un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_8$ junto con el átomo de carbono al que están unidos;

$R^{15}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_4$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_4$ o un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$; $R^{16}$ y $R^{17}$ representan independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo $C_1$-$C_4$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_4$, un grupo alquenilo $C_2$-$C_4$, un grupo haloalquenilo $C_2$-$C_4$, un grupo alquinilo $C_2$-$C_4$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_4$; o,

$R^{16}$ y $R^{17}$ pueden representar un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_6$ con el átomo de carbono al que están unidos, o el anillo formado de este modo puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$ y un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$;

$R^{18}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$ o un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$;

$R^{19}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ o un átomo de halógeno,

$R^{20}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo cicloalquilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo alcoxialquilo $C_2$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_6$,un grupo fenilo que puede estar sustituido en el anillo con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo $C_1$-$C_4$ y un grupo $-OR^{28}$, o un grupo $-CR^{16}R^{17}CO_2R^{25}$;

$R^{21}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_2$ o un grupo $-CO_2$(alquilo $C_1$-$C_4$);

$R^{22}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alcoxi $C_1$-$C_6$ o un grupo NH(alquilo $C_1$-$C_6$);

$R^{23}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alcoxi $C_1$-$C_6$, un grupo NH(alquilo $C_1$-$C_6$), un grupo bencilo, un grupo dialquilamino $C_2$-$C_8$ o un grupo fenilo que puede estar sustituido con $R^{24}$;

$R^{24}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, de 1 a 2 átomos de halógeno, un grupo alcoxi $C_1$-$C_6$ o un grupo $CF_3$;

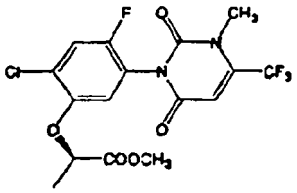
$R^{25}$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$ o un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_6$;

$R^{26}$ y $R^{27}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_4$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_4$, un grupo alquenilo $C_2$-$C_4$, un grupo haloalquenilo $C_2$-$C_4$, un grupo alquinilo $C_2$-$C_4$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_4$, un grupo -$OR^{28}$, un grupo -$NHR^{28}$, o un grupo -$SR^{28}$; o,

$R^{26}$ y $R^{27}$ pueden representar cicloalquilo $C_3$-$C_8$ con el átomo de carbono al que están unidos, o cada uno de los anillos así formados puede estar sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_3$ y un grupo haloalquilo $C_1$-$C_3$; y,

$R^{28}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo $C_1$-$C_6$, un grupo haloalquilo $C_1$-$C_6$, un grupo alquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo haloalquenilo $C_3$-$C_6$, un grupo alquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo haloalquinilo $C_3$-$C_6$, un grupo carboxialquilo $C_2$-$C_4$, un grupo alcoxicarbonilalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo haloalcoxicarbonilalquilo $C_3$-$C_8$, un grupo alqueniloxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$, un grupo haloalqueniloxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$, un grupo alquiniloxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$, un grupo haloalquiniloxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$, un grupo cicloalcoxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$ o un grupo halocicloalcoxicarbonilalquilo $C_5$-$C_9$.

Y adicionalmente, puede ser, específicamente por ejemplo, un compuesto que tenga la siguiente fórmula (referido en adelante como compuesto (II)):




butafenacilo, flufenpir-etilo, 2-[2-cloro-5-[3,6-dihidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)-1(2H)-pirimidinil]-4-fluorofenoxi]fenoxiacetato de metilo, [3-[2-cloro-5-[3,6-dihidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)-1(2H)-2-pirimizinil]-4-fluorofenoxi]-2-piridazinil]oxiacetato de etilo, carfentrazona-etilo, sulfentrazona y similares.

Aquí, "butafenacilo" es el compuesto con el núm. de registro CAS 134605-64-4, "flufenpir-etilo" es el compuesto de núm. de registro CAS 188489-07-8, "carfentrazona-etilo" es el compuesto de núm. de registro CAS 128639-02-1, "sulfentrazona" es el compuesto de núm. de registro CAS 122836-35-5. En adelante, el 2-[2-cloro-5-[3,6-dihidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)-1(2H)-pirimidinil]-4-fluorofenoxi]fenoxiacetato de metilo (núm. de registro CAS 344419-98-3) puede ser referido como compuesto (III), y el [3-[2-cloro-5-[3,6-dihidro-3-metil-2,6-dioxo-4-(trifluorometil)-1(2H)-2-pirimizinil]-4-fluorofenoxi]-2-piridazinil]oxiacetato de etilo (núm. de registro CAS 353292-31-6) puede ser referido como compuesto (IV).

En la presente invención, "homología de secuencia" hace referencia a la homología entre dos secuencias de nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos. Semejante "homología de secuencia" puede ser determinada comparando las dos secuencias, cada una alineada en un estado óptimo, a lo largo de una región completa de las secuencias de ensayo. Como tales, se pueden utilizar adiciones o deleciones (por ejemplo, espacios) en el alineamiento óptimo de las secuencias de ácidos nucleicos o las secuencias de aminoácidos. Semejante homología de secuencia se puede calcular por medio de una etapa de producción de alineamientos realizada mediante un análisis de homología utilizando un programa tal como FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 4, 2444-2448 (1988)), BLAST (Altschul *et al*., Journal of Molecular Biology, 215, 403-410 (1990)), CLUSTAL W (Thompson, Higgins & Gibson, Nucleic Acid Research, 22, 4673-4680 (1994a)) y similares. Tales programas, por ejemplo, se pueden utilizar típicamente en la página de la red (http://www.ddbj.nig.ac.jp) del DNA Data Bank of Japan (el banco de datos internacional regido por el Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan). Adicionalmente, la homología de secuencia se puede determinar utilizando un soporte lógico para el análisis de secuencias disponible en el mercado. Específicamente por ejemplo, se puede calcular produciendo un alineamiento realizado mediante análisis de homología por el método de Lipman-Pearson (Lipman, D.J. y Pearson, W.R., Science, 227, 1435-1441, (1985)) utilizando GENETYX-WIN Ver. 6 (fabricado por GENETYX Corporation). Por ejemplo, como resultado del alineamiento en el análisis de homología de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 utilizando el método, se calculó una homología de secuencia del 90%.

En cuanto al gen (ADN) que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de "la proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa" utilizada en la presente invención, por ejemplo, existe un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de tipo salvaje (por ejemplo, referida en el documento USP 5767373 y similares), un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO variante que tiene actividad PPO que no es inhibida por el presente compuesto herbicida (por ejemplo, referida en los documentos USP 5939602, WO 9704089 y similares), un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de PPO derivada de bacteria que tiene actividad PPO que no es inhibida por el presente compuesto herbicida (por ejemplo, referida en el documento EPO 0770682, WO 9833927 y similares) y similares. Estos genes pueden ser un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de PPO de origen natural, un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad PPO en la que se ha introducido una sustitución, adición o deleción y similares de 1 o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de PPO de origen natural, o un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína seleccionada basándose en la actividad PPO. Asimismo, estos genes pueden ser un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad PPO que es inhibida por el presente compuesto herbicida en una cantidad que inhibe la actividad PPO natural de la planta o un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad PPO que no es inhibida por el presente compuesto herbicida. Concretamente, en cuanto al gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de PPO de origen natural, existen, por ejemplo, genes derivados de *Esherichia coli* (acceso Genbank X68660), *Bacillus subtilis* (acceso Genbank X97208), *Haemophilus influenzae* (acceso Genbank L42023), ratón (acceso Genbank D45185), ser humano (acceso Genbank D38537), Arabidopsis (acceso Genbank D83139) o tabaco (acceso Genbank Y13465, Y13466) y similares. Semejante gen utilizado en la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad PPO y puede conferir a una planta resistencia al presente compuesto herbicida cuando dicho gen y un gen de citocromo P450 (ADN) que muestra actividad metabolizadora del compuesto herbicida descrito más adelante fueron introducidos y expresados en la planta para utilizar dicho gen combinado con el gen del citocromo P450.

El citocromo P450 utilizado en la presente invención es una familia de proteínas que contienen protoheme y denominado por su propiedad espectroscópica que indica una absorción en la banda de Soret cerca de 450 nm cuando se une con monóxido de carbono en un estado de reducción. El citocromo P450 existe en diversos tejidos animales, tejidos vegetales, hongos, levaduras y bacterias.

De acuerdo con la invención, el citocromo P450 es de bacteria.

El citocromo p450 tiene capacidad de catalizar, con oxígeno libre y dos electrones derivados generalmente de NADPH, o raramente derivado de NADH, la monooxigenación de los presentes compuestos herbicidas y similares y posterior eliminación de los grupos funcionales.

El citocromo p450 puede ser (1) un tipo que proporciona electrones del sistema de transferencia de electrones con ferredoxina y NADPH-ferredoxina reductasa, o (2) un tipo que proporciona electrones directamente de NADPH-citocromo P450 reductasa. Preferiblemente, puede ser el primero. El citocromo P450 del primer apartado puede estar localizado en cualquiera de los orgánulos subcelulares de una célula anfitriona o en el citoplasma. La ferredoxina puede ser una ferredoxina endógena en la célula anfitriona o una ferredoxina foránea producida en la célula anfitriona donde se ha introducido un gen de ferredoxina foránea en la célula anfitriona.

El citocromo P450 preferible utilizado en la presente invención puede ser citocromo P450 derivado de actinomyces. Aquí, "Actinomyces" es una familia de procariotas perteneciente a los *Actinomycetales*, que son una familia de bacterias Gram-positivas agrupadas en 8 géneros de *Streptomyces, Actinomyces, Mycobacterium, Frankia, Nocardia* y similares. El citocromo P450 más preferible puede ser el citocromo P450 derivado de actinomyces pertenecientes a *Streptomyces*, concretamente, por ejemplo, citocromo P450 derivado de *Streptomyces phaeochromogenes, Streptomyces testaceus, Streptomyces achromogenes, Streptomyces griseofuscus, Streptomyces thermocoerulescens, Streptomyces nogalater, Streptomyces tsusimaensis, Streptomyces glomerochromogenes, Streptomyces olivochromogenes, Streptomyces ornatus, Streptomyces griseus, Streptomyces lanatus, Streptomyces misawanensis, Streptomyces pallidus, Streptomyces roseorubens, Streptomyces rutgersensis, Streptomyces steffisburgensis, Saccharopolyspora taberi* y similares. Los ejemplos concretos de citocromo P450 derivado de actinomyces perteneciente a *Streptomyces* pueden ser citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, citocromo P450 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 90% o más con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o 2, y similares.

El gen (ADN) que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 puede ser un gen de citocromo P450 que tiene una secuencia de nucleótidos natural, y un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el citocromo P450 en el que se ha optimizado el uso codónico para su expresión en la célula anfitriona. Asimismo, puede ser un gen que codifica una proteína que tiene actividad citocromo P450 en la que se ha introducido una sustitución, adición, deleción o similar de aminoácido en una secuencia de aminoácidos de un citocromo P450 de origen natural, y, un gen que codifica una proteína seleccionada basándose en la actividad del citocromo P450. Concretamente, el gen que codifica el citocromo P450 puede ser un gen que codifica citocromo P450 descrito en la Publicación de la Patente Internacional WO 03040370.

El gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 introducido en la célula anfitriona puede ser localizado en uno cualquiera de los orgánulos subcelulares de la célula o en el cromosoma del núcleo. Asimismo, el citocromo P450 puede estar localizado en uno cualquiera de los orgánulos subcelulares, el citoplasma o el espacio extracelular, preferiblemente orgánulos subcelulares, más preferiblemente plástidos.

Para la transición del citocromo P450 en los orgánulos subcelulares de la célula, se puede introducir en la célula anfitriona un ADN quimérico en el que un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del péptido de tránsito a orgánulos está conectada en marco aguas arriba de un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450. Aquí, "conectado en marco" significa que el marco de lectura de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del péptido de tránsito a orgánulos y el marco de lectura de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del citocromo P450 están conectados para formar un marco de lectura continuo. La secuencia del péptido de tránsito para el tránsito y la localización de la proteína en los orgánulos en la célula anfitriona es, por ejemplo, una secuencia del péptido de tránsito de un precursor citoplásmico de una proteína del cloroplasto de una planta descrita en el documento USP5717084, y una secuencia quimérica que comprende numerosas clases de secuencias de péptidos de tránsito descritas en el documento USRE36449 etc. Concretamente, es, por ejemplo, la secuencia del péptido de tránsito a cloroplastos derivada de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa (en adelante puede ser referida como RuBPCO) de soja que es obtenible mediante un método descrito en la Publicación de Patente Internacional WO03040370.

Como método para causar artificialmente deleciones, adiciones o sustituciones de restos aminoácido en una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO o una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 descrito antes, por ejemplo, existe un método que comprende las etapas de llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio en un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, y permitir después la expresión de semejante ADN mediante un método convencional. Concretamente, por ejemplo, puede ser un método que utilice mutaciones ámbar (método del dúplex con espacios, Nucleic Acids Res., 12, 9441-9456 (1984)), un método de PCR utilizando cebadores para introducir una mutación y similares. Asimismo, por ejemplo, puede ser un método que comprenda las etapas de llevar a cabo la mutagénesis al azar de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos y similares. Concretamente, por ejemplo, puede ser un método de realización de una pCR utilizando el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos como molde y un par de cebadores que puede amplificar toda la longitud del ADN en condiciones en las que la concentración de cada uno de los dATP, dTTP, dGTP y dCTP utilizados como sustrato se cambia, o, en condiciones en las que la concentración de $Mg^2$+ se incrementa más para promover la reacción de la polimerasa, y similares. Tales métodos de PCR pueden ser, por ejemplo, los métodos convencionales descritos en Method in Molecular Biology, (31), 1994, 97- 112 y similares.

En el método para confirmar la actividad PPO de la proteína en la cual se ha introducido artificialmente la mutación como se ha descrito antes, por ejemplo, se inserta el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína en la cual se ha introducido artificialmente la mutación en un plásmido vector en primer lugar, como se describe en el documento WO9732011 y similares. A continuación, introduciendo el plásmido vector y expresando el ADN en una célula anfitriona carente de PPO, se puede confirmar que el ADN introducido compensa la carencia de PPO y se puede desarrollar la célula anfitriona carente de PPO independientemente de heme. Asimismo, en el método para confirmar la actividad del citocromo P450 de la proteína en la cual se ha introducido la mutación como se ha descrito antes, por ejemplo, el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína en la cual se ha introducido la mutación es insertado en un plásmido vector en primer lugar. El plásmido vector es introducido en una célula anfitriona para expresar el ADN, como se describe en el documento WO03040370 y similares. De este modo, semejante actividad puede ser confirmada añadiendo y haciendo reaccionar el presente compuesto herbicida como sustrato, ferredoxina y NADPH-ferredoxina reductasa a un extracto de la célula anfitriona en el que se había producido el citocromo P450 mutado, y midiendo la disminución del sustrato en la mezcla de reacción después de la reacción.

El ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos en la que se ha introducido una sustitución, adición, deleción o similar de aminoácidos para la secuencia de aminoácidos concreta de la proteína que muestra actividad PPO o la secuencia de aminoácidos concreta del citocromo P450 puede ser obtenido a partir de diferentes genotecas de ADN, utilizando un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias de aminoácidos concretas descritas antes como sonda y llevando a cabo la hibridación en condiciones restrictivas de acuerdo con los métodos de la ingeniería genética convencional. Asimismo, el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de 90% o más con secuencias de aminoácidos particulares, concretamente, por ejemplo, un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el citocromo P450 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de 90% o más con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o 2 se puede obtener de diferentes genotecas de ADN, utilizando un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos concreta como sonda y llevando a cabo la hibridación en condiciones restrictivas de acuerdo con los métodos de la ingeniería genética convencional. Como "condiciones restrictivas", se pueden mencionar, por ejemplo, las condiciones en las cuales se realiza la hibridación a 68ºC en una solución que contiene 6xSSC (dejar que la solución que contiene NaCl 3 M y citrato trisódico 0,3 M sea 20xSSC) y después la membrana hibridada se lava a 68ºC con 0,1xSSC y SDS al 0,5% en una hibridación realizada de acuerdo con el método convencional descrito en Sambrook, J., Frisch, E.F., y Maniatis,

T.; capítulo 9.53, Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbor Press (1989). La concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar, por ejemplo, entre las condiciones de 2 x SSC (condiciones de baja restricción) a las condiciones de 0,1 x SSC (condiciones de elevada restricción). Se puede seleccionar una temperatura en la etapa de lavado, por ejemplo, de la temperatura ambiente (condiciones de baja restricción) a 68ºC (condiciones de elevada restricción). Alternativamente, se pueden cambiar tanto la concentración de sal como la temperatura.

Para introducirlo en la planta y expresar el gen que se va a introducir en la presente invención, generalmente, se pueden insertar un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína que se va a expresar, un ADN en el cual el ADN mencionado antes y un promotor funcional en la célula vegetal están conectados operablemente o similares, en un plásmido vector funcional en la célula vegetal, e introducirlos en la célula vegetal. Cuando se utiliza el plásmido vector que ya posee el promotor funcional en la célula vegetal, se puede insertar el ADN mencionado antes aguas abajo del promotor presente en el plásmido vector de manera que el promotor y el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína que se va a expresar estén conectados operablemente.

Aquí, el promotor funcional en la célula anfitriona tal como una célula vegetal es una secuencia de nucleótidos que está conectada 5' aguas arriba de una secuencia de nucleótidos de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína (el gen estructural) y tiene una función de control del inicio de la transcripción del gen en la célula anfitriona tal como una célula vegetal. En cuanto al promotor funcional en la célula vegetal, por ejemplo, se menciona un ADN T derivado de promotores constitutivos tales como el promotor del gen de la nopalina sintasa y el promotor del gen de la octopina sintasa; los promotores derivados de virus vegetales tales como los promotores 19S y 35S derivados del virus del mosaico de la coliflor; los promotores inducibles tales como el promotor del gen de la fenilalanina amonioliasa, el promotor del gen de la chalcona sintasa y el promotor del gen de la proteína relacionada con la patogénesis; el promotor vegetal descrito en la Publicación de Patente Internacional WO2000020613, y similares. Asimismo, se puede conectar un terminador funcional en la célula anfitriona tal como una célula vegetal aguas abajo de un ADN en el que el promotor funcional en la célula anfitriona tal como la célula vegetal descrito antes y un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO o el citocromo P450 están conectados operablemente.

El terminador funcional en la célula anfitriona tal como una célula vegetal es una secuencia de nucleótidos que está conectada 3' aguas abajo de una secuencia de nucleótidos de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína (el gen estructural) y tiene la función de añadir una secuencia de poliadenina para la estabilización de la transcripción del gen. Como terminador funcional en la célula vegetal, por ejemplo, se mencionan terminadores constitutivos derivados de ADN T tales como el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS); terminadores derivados de virus vegetales tales como los terminadores del virus GV1 o GV2 del ajo; el terminador vegetal descrito en la Publicación de Patente Internacional WO2000020613; y similares.

En cuanto a la célula vegetal que se va a utilizar como célula anfitriona, están, por ejemplo, las células vegetales derivadas de plantas dicotiledóneas, incluyendo plantas solanáceas como la berenjena, la patata y el tomate; plantas crucíferas tales como la colza, la canola, la lechuga, la remolacha azucarera y arabidopsis; plantas leguminosas tales como la soja, el guisante y la alfalfa; plantas rosáceas tales como la manzana, la pera y la almendra; cítricos tales como la naranja y el limón; el algodón, el lino, el girasol, la uva, la almendra, el chopo, y células vegetales derivadas de plantas monocotiledóneas incluyendo plantas poáceas tales como maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, avena y sorgo y similares.

En cuanto a la célula vegetal que se va a utilizar como célula anfitriona, existen diferentes células vegetales tales como tejidos vegetales, organismos vegetales, células cultivadas, semillas y similares.

En cuanto al método para la introducción en una célula anfitriona por ejemplo de un ADN de una célula vegetal que tiene el gen estructural en el que están conectados un promotor y un terminador funcional en una célula anfitriona tal como la célula vegetal, se encuentran, por ejemplo, el método de infección con Agrobacterium (Publicación de patente Japonesa examinada Núm. Hei2-58917 y Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Syo-60-70080), la electroporación en protoplastos (Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Syo-60-251887 y Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Hei5-68575), los métodos con pistolas de partículas (Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Hei 5-508316 y Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Syo-63-258525) o similares.

En tal caso, el transformante en el que se ha introducido el ADN puede ser seleccionado basándose en el fenotipo de un gen marcador selectivo, introduciendo simultáneamente un gen marcador selectivo seleccionado entre el gen de la higromicina fosfotransferasa, el gen de la neomicina fosfotransferasa, el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa y similares, y un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO o un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 que muestra la actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida. El gen marcador selectivo, y el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO o el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 que muestra la actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida pueden ser insertados en tándem en el mismo vector e introducidos. Se pueden introducir simultáneamente un plásmido vector que comprende el gen marcador selectivo, y el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de

aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO o el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida. También se puede seleccionar un transformante en el que se ha introducido el gen objetivo cultivándolo con un medio que contiene el presente compuesto herbicida, células vegetales en las cuales se ha introducido un vector que comprende el gen objetivo y aislando los clones desarrollados.

Como método para introducir en una planta un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO y un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 que muestra la actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida, puede haber (1) un método de introducción tanto de los ADN simultáneamente en la misma célula vegetal, o (2) un método de introducción en la misma célula vegetal de un ADN en el que ambos ADN están conectados en tándem.

La presencia de ambos ADN en el transformante se puede confirmar analizando el ADN preparado a partir del transformante utilizando métodos de análisis de ingeniería genética (tales como la confirmación de los sitios para las enzimas de restricción, el análisis de la secuencia de nucleótidos, la hibridación de Southern, la PCR y similares) descritos, por ejemplo, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press y similares.

Específicamente, por ejemplo, se puede obtener arroz o Arabidopsis que tienen introducidos en ellos ambos ADN de acuerdo con el método descrito en Model-Shokubutu-No-Jikken-Protocol: Ine, Shiroinunazuna-Hen (Supervisors: Koh SHIMAMOTO y Kiyotaka OKADA, Shujun-sha, 1996), Cuarto capítulo. Adicionalmente, se puede obtener soja que tiene introducidos ambos ADN mediante introducción en un embrión somático de soja con una pistola de partículas de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada Núm. 3-291501. Del mismo modo, se puede obtener maíz que tiene introducidos ambos ADN mediante la introducción en embriones somáticos de maíz con una pistola de partícula de acuerdo con el método descrito por Fromm, M.E., *et al*., Bio/Technology, 8; p 838 (1990). Se puede obtener trigo que tiene introducidos ambos ADN introduciendo los ADN en un embrión inmaduro de trigo cultivado con una pistola de partículas de acuerdo con el método convencional descrito por TAKUMI *et al*., Journal of Breeding Society (1995), 44: Extra Vol. 1, p 57. Del mismo modo, se puede obtener cebada que tiene introducidos ambos ADN mediante la introducción en embriones inmaduros de cebada cultivados asépticamente con una pistola de partículas de acuerdo con el método descrito por HAGIO, *et al*., Journal of Breeding Society (1995), 44; Extra Vol. 1, p 67.

A partir del transformante producido de este modo, se puede obtener una planta transgénica en la que se han introducido ambos ADN, regenerando un organismo vegetal de acuerdo con el método de cultivo de células vegetales descrito, por ejemplo, en "Shokubutu-Saibou-Soshiki-Baiyo, Jissai, Ouyou, Tenbou", Harada, Komamine Ed., Rikogakusha (1979), p 65-118 y similares.

Adicionalmente, cruzando la planta transgénica en la que se han introducido y expresado ambos ADN y una planta de la variedad elegida como diana, se pueden introducir ambos ADN en un cromosoma de la planta de la variedad elegida como diana, y se puede obtener la planta de la variedad elegida como diana en la que se han introducido ambos ADN.

Asimismo, introduciendo por separado en diferentes células vegetales, un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad PPO y un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida, y seleccionando y regenerando cada individuo, y cruzando después la línea de progenie de los transformantes regenerados por separado, se puede obtener la planta de la presente invención.

Específicamente, por ejemplo, para producir una línea de soja recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de soja variante (sPPOav) y una línea de soja recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, se introducen por separado ambos ADN en embriones somáticos de soja utilizando una pistola de partículas de acuerdo con el método descrito en la Publicación de patente Japonesa no examinada Núm. Hei3-291501. A continuación, se obtiene una línea cruzada cruzando las líneas de soja recombinante producidas. Para investigar la resistencia de la línea cruzada al presente compuesto herbicida, se puede llevar a cabo la evaluación mediante puntuación en cuanto a la sensibilidad en un ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida de acuerdo con el método descrito más abajo en el Ejemplo 9 y similares (evaluación del índice de puntuación basado en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos causados por la pulverización con el compuesto).

Asimismo, concretamente, por ejemplo, para producir una línea de maíz recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de maíz variante y una línea de maíz recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene a secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, ambos ADN son introducidos por separado en embriones somáticos de maíz utilizando una pistola de partículas de acuerdo con el método descrito por Fromm, M. E., *et al*., Bio/Technology, 8; p838 (1990). A continuación, se obtiene una línea cruzada cruzando las líneas de maíz recombinante producidas. Para investigar la resistencia de la línea cruzada al presente compuesto herbicida, se puede llevar

a cabo una evaluación mediante puntuación en cuanto a la sensibilidad en un ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida de acuerdo con el método descrito más abajo en el Ejemplo 9 y similares (evaluación del índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o tallos causados por la pulverización del compuesto).

Asimismo, concretamente, por ejemplo, para producir una línea de algodón recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de algodón variante y una línea de algodón recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene a secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, ambos ADN son introducidos por separado en el algodón de acuerdo con el método de infección con Agrobacterium. A continuación, se obtiene la línea cruzada cruzando las líneas de algodón recombinante producidas. Para investigar la resistencia de la línea cruzada al presente compuesto herbicida, se puede llevar a cabo la evaluación mediante puntuación de la sensibilidad en un ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida de acuerdo con el método descrito más abajo en el Ejemplo 9 y similares (evaluación mediante el índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o tallos causados por la pulverización del compuesto).

Asimismo, concretamente, por ejemplo, para producir una línea de colza recombinante en la cual se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de colza variante y una línea de colza recombinante en la que se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, ambos ADN son introducidos por separado en la colza de acuerdo con el método de infección con Agrobacterium. A continuación, se obtiene una línea cruzada cruzando las líneas de colza recombinante producidas. Para investigar la resistencia de la línea cruzada al presente compuesto herbicida, se puede llevar a cabo la evaluación mediante puntuación de la sensibilidad en un ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida de acuerdo con el método descrito más abajo en el Ejemplo 9 y similares (evaluación mediante el índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o el blanqueamiento de las hojas o los tallos causados por la pulverización del compuesto).

Asimismo, concretamente, por ejemplo, para producir una línea de trigo recombinante en la cual se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPO de trigo variante y una línea de trigo recombinante en la cual se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, ambos ADN se introducen por separado en callos derivados de embriones inmaduros de trigo utilizando una pistola de partículas de acuerdo con el método descrito por TAKUMI *et al*., Journal of Breeding Society (1995), 44: Extra Vol. 1. p 57. A continuación, se obtiene una línea cruzada cruzando las líneas de trigo recombinante producidas. Para investigar la resistencia de la línea cruzada al presente compuesto herbicida, se puede llevar a cabo la evaluación mediante puntuación de la sensibilidad en un ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida de acuerdo con el método descrito más abajo en el Ejemplo 9 y similares (evaluación mediante el índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o tallos causados por la pulverización del compuesto).

En el método para controlar malas hierbas de la presente invención, se aplica una cantidad eficaz del presente compuesto herbicida a la zona de cultivo de la planta de la presente invención. La cantidad de aplicación del presente compuesto herbicida se puede decidir apropiadamente de acuerdo con la estación de la aplicación, la variedad de la mala hierba, la clase del presente compuesto herbicida y similares.

Cada planta de la presente invención puede expresar una clase de proteína que muestra actividad PP y de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora del presente compuesto herbicida, una clase de una proteína y varias clases de la otra proteína simultáneamente, o varias clases de ambas proteínas simultáneamente. Semejante expresión de las proteínas combinadas puede conferir a la planta una resistencia sinérgica al presente compuesto herbicida. Debido a que el grado de fitotoxicidad de la planta de la presente invención es muy reducido al aplicar el presente compuesto herbicida, la planta de la presente invención se puede desarrollar bien cuando se pulveriza el presente compuesto herbicida o se añade a la zona de crecimiento o cultivo de la planta de la presente invención. Cultivando la planta de la presente invención y aplicando un agente para el control de las malas hierbas que contiene el presente compuesto herbicida como ingrediente activo a la zona de cultivo de la planta, se pueden eliminar eficazmente plantas tales como malas hierbas excepto la planta de la presente invención, mejorar después el rendimiento y la calidad de la planta de la presente invención, reducir la cantidad de aplicación de agentes para el control de las malas hierbas, ahorrar mano de obra y similares.

La invención también se refiere a material de propagación de las plantas de acuerdo con la invención. El término "material de propagación" comprende aquellos componentes o partes de la planta que son adecuados para producir vástagos vegetativamente o generativamente. Los medios adecuados para la propagación vegetativa son por ejemplo esquejes, cultivos de callo, rizomas o tubérculos. Otro material de propagación incluye por ejemplo frutos, semillas, plántulas, protoplastos, cultivos celulares, etc.

La invención también se refiere a partes cosechables de las plantas de la invención, tales como, por ejemplo, frutos, semillas, tubérculos, rizomas, hojas o flores.

De acuerdo con la invención, dicho material de propagación o porciones cosechables comprenden ambos ADN de la realización principal.

**Ejemplos**

En adelante, se explica la presente invención adicionalmente con Ejemplos en detalle, pero no se limita a estos.

Ejemplo 1

*Producción de plantas de tabaco recombinantes en las cuales se ha introducido un gen de citocromo P450*

El plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy (Fig. 1) (descrito en la Publicación de Patente Internacional WO0304370) es un plásmido vector binario para expresar la proteína quimérica que comprende la secuencia del péptido de tránsito a cloroplastos de soja (cv. Jack) la subunidad pequeña de RuBPCO y citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 bajo el control del promotor CR16G6 (descrito en la Publicación de Patente Internacional WO00020613). El plásmido pBI-NdG6-rSt-1584 (Fig. 2) (descrito en la Publicación de Patente Internacional WO0304370) es un plásmido vector binario para expresar la proteína quimérica que comprende la secuencia del péptido de tránsito a cloroplastos de soja (cv. Jack) la subunidad pequeña de RuBPCO y citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 bajo el control del promotor CR16G6 (descrito en la Publicación de Patente Internacional WO00020613).

Estos plásmidos pBI-NdG6-rSt-1609soy y pBI-NdG6-rSt-1584soy fueron introducidos por separado en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (fabricada por Clontech). Los transformantes resultantes se cultivaron sobre medio de agar LB (Extracto de Levadura al 0,5%, Bacto triptona al 1,0%, NaCl al 0,5%) que contenía 300 $\mu$g/L de estreptomicina, 100 $\mu$/L de rifampicina y 25 $\mu$/L de kanamicina, seguido de selección de colonias resistentes al fármaco para aislar una cepa de Agrobacterium recombinante que tiene el plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy y una cepa de Agrobacterium recombinante que tiene el plásmido pBI-NdG6-rSt-1584soy respectivamente.

Después, de acuerdo con el método descrito en el Manual for Gene Manipulation of Plant (de Hirofumi Uchimiya, Kodan-sha Scientific (1992)), se llevó a cabo la introducción del gen en tabaco. Cada una de las cepas de Agrobacterium recombinantes anteriores se cultivó a 28ºC durante la noche en medio líquido LB que contenía 300 $\mu$g/L de estreptomicina, 100 $\mu$/L de rifampicina y 25 $\mu$/L de kanamicina. En el medio de cultivo líquido obtenido, se sumergieron discos de hoja tomados como muestra de tabaco cultivado asépticamente (*Nicotiana tabacum* cepa SR-1). Los discos de hoja se plantaron en medio de agar MS (sales inorgánicas MS, vitaminas MS, sacarosa al 3%, y agar al 0,8%; Murashige T. y Skoog F., Physiol. Plant. (1962) 15, p473) que contenía 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético y 1,0 mg/L de bencilaminopurina, y se cultivaron en luz a la temperatura ambiente durante 2 días. Después, los discos de hoja se lavaron con agua esterilizada, y se cultivaron durante 7 días en medio agar MS que contenía 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético, 1,0 mg/L de bencilaminopurina y 500 mg/L de cefotaxima. A continuación, se trasplantaron los discos de hoja y se cultivaron en medio agar MS que contenía 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético, 1,0 mg/L de bencilaminopurina, 500 mg/L de cefotaxima y 100 mg/L de kanamicina. El cultivo se realizó continuamente durante 2 meses mientras se trasplantaban los discos de hoja a medio fresco de la misma composición a intervalos de 2 semanas. Durante ese tiempo, los brotes adventicios desarrollados de los discos de hoja se trasplantaron y enraizaron sobre medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina para obtener plantas regeneradas. Después, las plantas regeneradas se trasplantaron y se cultivaron sobre medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina dispensados en tiestos de cultivo (Technopot fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para obtener un individuo de tabaco recombinante en el que se ha introducido la región ADN T del plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy y un individuo de tabaco recombinante en el que se ha introducido la región ADN T del plásmido pBI-NdG6-rSt-1584soy. Los individuos obtenidos se trasplantaron a tiestos de crecimiento que contenían tierra hortícola (Kureha Engei Baido fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.) de los tiestos de cultivo, se aclimataron al entorno externo en una cámara de crecimiento, luego se hicieron crecer en un invernadero. Las flores se cubrieron con bolsas de papel durante el período de floración para evitar cruces con otros individuos, y se recogieron las semillas de las mismas.

Ejemplo 2

*Selección del individuo de tabaco recombinante con acumulación de citocromo P450*

A partir de los individuos de tabaco recombinante obtenidos en el Ejemplo 1, se seleccionaron individuos de tabaco recombinante en cuyas hojas se había acumulado la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o 2 utilizando el método de transferencia Western.

En primer lugar, se tomaron muestras de cuadrados de aproximadamente 1 cm del tabaco recombinante que se iba a analizar, y se colocaron en tubos de muestreo de 2 mL. Se añadió un lecho de zirconio de 5 mm de diámetro (bolas de YTZ fabricadas por NIKKATO CORPORATION) y se colocó la tapa sobre ello, y luego se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Utilizando un aparato de desorganización celular (Mixer Mill MM300 fabricado por QIAGEN), se sacudió dos veces a una velocidad de 30 veces/segundo durante 15 segundos para homogeneizar la muestra. Añadiendo 0,1 mL de tampón de muestra (tampón PBS (cloruro de sodio 137 mM, hidrogenofosfato de sodio 8,1 mM, cloruro de potasio 2,68 mM, y dihidrogenofosfato de potasio 1,47 mM) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM) y

sacudiendo, se extrajeron las proteínas. Muestreando una parte del extracto, se midió la concentración de proteína en el extracto utilizando el Kit de Análisis de Proteínas BIO-RAD (fabricado por BIO- RAD) y midiendo la absorbancia a 595 nm de acuerdo con el protocolo adjuntado al kit utilizando albúmina de suero bovino como patrón. El extracto preparado de este modo a partir del individuo de tabaco recombinante, se mezcló con el mismo volumen de tampón de muestra 2xSDS (fabricado por Nakalai tesque), se calentó a 100ºC durante 3 minutos, y después se enfrió con hielo. Esto se añadió al pocillo de gel SDS-PAGE (PAG mini "Daiich" fabricado por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd) de manera que se aplicaron 10 $\mu$g de proteína por pocillo. Se llevó a cabo la electroforesis en el tampón de electroforesis SDS-PAGE (tris(hidroximetil)aminometano 15 g, glicina 72 g, y SDS 5 g/L) a 40 mA por gel durante 1 hora. A partir de este gel, se transfirieron las proteínas después de la electroforesis sobre una membrana de PVDF (Immobilon-P fabricado por Millipore) durante 30 minutos a 10 V en tampón de transferencia de Bjerrum y Schafer-Nielsen (tris (hidroximetil)amino metano 48 mM, glicina 39 mM, y metanol al 20%) utilizando un dispositivo de transferencia semi-seca (Transblot SD Cell fabricado por BIO-RAD) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. La membrana se trató utilizando un kit de Inmunotransferencia (fabricado por BIO-RAD) y anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina, y después se llevó a cabo la reacción de coloración utilizando el sistema de coloración NBT/BCIP para detectar una banda de la proteína extraída de la hoja del individuo de tabaco recombinante. En primer lugar, se llevó a cabo el tratamiento de bloqueo sacudiendo la membrana suavemente en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y cloruro de sodio 0,5 mM) que contenía gelatina al 3% durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después, se lavó la membrana con tampón TBS durante 5 minutos, y se sacudió suavemente durante 1 hora a la temperatura ambiente con antisuero del anticuerpo primario diluido 3.000 veces con tampón TBS que contenía Tween 20 al 0,05% para llevar a cabo la reacción con el anticuerpo primario. Como anticuerpo primario, se utilizó antisuero de conejo que se había obtenido mediante inmunización del conejo con la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (descrita en la Publicación de Patente Internacional WO03040370). A continuación, la membrana se lavó dos veces con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05% durante 5 minutos, y después se sacudió suavemente durante 1 hora a la temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (fabricado por Bio-Rad) diluido 3.000 veces con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05% para llevar a cabo la reacción con el segundo anticuerpo. Después, la membrana se lavó dos veces con tampón TBS que contenía Tween 20 al 0,05% durante 5 minutos y después se llevó a cabo la reacción de coloración utilizando un kit de coloración AP (fabricado por Bio-Rad). Después de la coloración la membrana se mantuvo seca. Mediante el método de transferencia Western anterior, en 26 de los 40 individuos de tabaco recombinante en los que se ha introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy que contiene el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, se detectaron cantidades relativamente elevadas de la proteína que tiene un peso molecular de 44 kDa. En 6 de los 20 individuos de tabaco recombinante en los cuales se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-158dsoy que contiene el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, se detectaron cantidades relativamente elevadas de la proteína que tiene un peso molecular de 44 kDa.

Estos individuos de tabaco recombinante en los que se detectaron cantidades relativamente elevadas de la proteína de 44 kDa fueron seleccionados y las semillas fueron cosechadas de los individuos seleccionados para analizar el número de copias del gen introducido.

Ejemplo 3

*Selección de una línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido 1 copia del gen de citocromo P450*

Basándose en el principio de que un gen resistente a kanamicina y un gen conectado en tándem al gen resistente están conectados cuando estos genes son introducidos en una planta mediante el método del Agrobacterium utilizando un vector binario, de los individuos de tabaco recombinante seleccionados en el Ejemplo 2, se seleccionaron adicionalmente líneas de tabaco en las que 1 copia del gen introducido está localizada en uno de los cromosomas homólogos.

Las semillas se cosecharon a partir de la generación $T_o$ de los individuos de tabaco recombinante seleccionados en el Ejemplo 2, y se sumergieron en una dilución 1:5 de solución de hipoclorito de sodio (fabricado por Nacalai tesque) durante 15 minutos para su esterilización. Se sembraron aproximadamente 50 semillas tratadas para la esterilización en medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina, y se cultivaron a 25ºC en la luz para que germinaran asépticamente. Después de aproximadamente 2 semanas, las plántulas germinadas se observaron para seleccionar líneas de tabaco que indicaban una tasa de segregación de 3:1 a un nivel de significación del 5% mediante el test de la Chi cuadrado. Como resultado, de las 26 líneas seleccionadas en el Ejemplo 2 de los individuos de tabaco recombinante en los que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy, se identificaron 9 líneas y se seleccionaron como líneas en las que se localizaba 1 copia del gen introducido en uno de los cromosomas homólogos. De las 6 líneas seleccionadas en el Ejemplo 2 de los individuos de tabaco recombinante en los que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1584soy, 2 líneas fueron identificadas y seleccionadas como líneas en las que 1 copia del gen introducido está localizada en uno de los cromosomas homólogos.

A continuación, se trasplantaron individuos de la generación $T_1$ de las líneas seleccionadas antes a tiestos de crecimiento que contenían tierra hortícola (Kureha Engei Baido fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), se aclimataron al entorno externo en una cámara de crecimiento, después se hicieron crecer en un invernadero. Las flores se cubrieron con bolsas de papel durante el período de floración para evitar cruces con otros individuos, y se cosecharon las semillas a partir de ellas.

Ejemplo 4

*Selección de homocigotos de la línea de tabaco recombinante en la cual se ha introducido el gen de citocromo P450*

Se cosecharon las semillas de las líneas de tabaco recombinante núm. 17, núm. 19, núm. 22, núm. 23, núm. 2 5, núm. 29, núm. 30, núm. 34 y núm. 40 que se seleccionaron en el Ejemplo 3 entre las líneas en las que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy. Asimismo, se cosecharon las semillas de las líneas de tabaco recombinante núm.5 y núm.16 que se habían seleccionado en el Ejemplo 3 entre las líneas en las que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1584soy. Las semillas de 4 individuos de cada una de las líneas núm. 17 y núm. 25 de la línea de tabaco recombinante en la que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1609soy y la línea núm. 16 de la línea de tabaco recombinante en la que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-rSt-1584soy fueron sembradas asépticamente sobre medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. Se seleccionó como homocigoto un individuo cuyas plántulas mostraron todas resistencia a la kanamicina.

Ejemplo 5

*Producción de plantas de tabaco recombinante en las cuales se ha introducido una variante del gen de protoporfirinógeno IX oxidasa de soja*

Se conectó operablemente ADN de un gen de PPO de soja variante que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 con un promotor y un terminador que eran funcionales en células vegetales para construir un plásmido de expresión del gen de PPO de soja variante en una planta. El ADN del gen de PPO de soja variante que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 se obtuvo por sustitución de la citosina del nucleótido 677º de una secuencia de nucleótidos que codifica una PPO derivada de soja (Glycine max cv. Williams82) por timina, con lo que la alanina del resto aminoácido 226º de la PPO derivada de soja fue sustituida por valina.

En primer lugar, se digirió el plásmido pSPPO-E descrito en la publicación de la solicitud de patente Japonesa Núm. Hei11-18775 con las enzimas de restricción Sac I y Sal I para obtener un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO derivada de soja entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I (fragmento Sac I-Sal I). El ADN obtenido se insertó mediante ligación entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I en el sitio de clonación múltiple del plásmido pKF18k-2 (fabricado por TAKARA BIO INC.) para subclonar el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO derivada de soja.

El plásmido en el que se había subclonado el ADN anterior se trató utilizando Mutan-Express Km Kit (fabricado por TAKARA BIO INC.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit para sustituir la citosina del nucleótido 677º de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO derivada de soja por timina mediante el método Oligonucleotide-directed Dual Amber, por medio del cual se obtuvo el plásmido pKFGMP03 (Fig. 3) que contiene un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 4 entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I del sitio de clonación múltiple.

Después de digerir el plásmido pNdG6-ΔT descrito en el Ejemplo 16 del documento WO03040370 con las enzimas de restricción Bgl II y Sac I, se construyó el plásmido pNdG6-#89 insertando entre el sitio de escisión Bgl II y el sitio de escisión Sac I del plásmido pNdG6-ΔT un adaptador de oligonucleótido sintético que contiene una secuencia de reconocimiento Sac I y una secuencia de reconocimiento Sal I. El plásmido pNdG6-#89 contiene, aguas abajo del promotor CR16G6, una secuencia de reconocimiento Sac I y una secuencia de reconocimiento Sal I, y de ese modo se puede construir una unidad de expresión para expresar un ADN en una planta cuando se inserta el ADN entre los sitios de escisión de cada una de las secuencias de reconocimiento. El adaptador insertado en el plásmido pNdG6-#89 fue producido mezclando un volumen igual de cada uno de una solución 100 $\mu$M/L de un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GATCTGAGCTCCATGGATCCGTCGACAGCT-3' (SEQ ID NO: 13) y un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GTCGACGGATCCATGGAGCTCA-3' (SEQ ID NO: 14), calentando a 65ºC durante 10 minutos, y enfriando después a la temperatura ambiente. Después, digiriendo el plásmido pKFGMP03 anterior con Sac I y Sal I, se obtuvo un ADN que tiene entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I (fragmento Sac I-Sal I) la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO de soja variante (SEQ ID NO: 3) en la cual la alanina del resto aminoácido 226º de la PPO derivada de soja fue sustituida por valina (en adelante, la PPO variante puede ser referida como sPPOav). El ADN obtenido fue insertado mediante ligación entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I del plásmido pNdG6-#89 para conectar el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO de soja variante (sPPOav) aguas abajo del promotor CR16G6. De este modo, se construyó el plásmido pSUM-NdG6-sPPOav (Fig. 4) que contiene una unidad de expresión para expresar la PPO de soja variante (sPPOav).

A continuación, después de digerir el plásmido vector binario pBI121 (fabricado por Clontech) con la enzima de restricción Not I, se volvieron romos los extremos del ADN añadiendo nucleótidos complementarios a la porción de hebra sencilla de los sitios de escisión con Not I resultantes, utilizando TaKaRa BKL Kit (fabricado por TAKA-

RA BIO INC.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después, el ADN resultante se auto-ligó para formar un plásmido.

El plásmido obtenido se digirió con las enzimas de restricción Hind III y Eco RI. Entre el sitio de escisión Hind III y el sitio de escisión Eco RI del plásmido digerido, se insertó un ADN que contenía el promotor CR16G6 obtenido mediante digestión del plásmido pNdG6-ΔT con Hind III y Eco RI (fragmento Hind III-Eco RI) para construir el plásmido pBI-NdG6.

Insertando un ADN que contenía la unidad de expresión obtenida mediante digestión del plásmido pSUM-NdG6-sPPOav con Not I, en el sitio de escisión Not I del plásmido pBI-NdG6, se construyó el plásmido pBI-NdG6-sPPOav (Fig. 5).

Analizando la secuencia de nucleótidos del plásmido pBI-NdG6-sPPOav, se confirmó que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 5 estaba contenida entre el sitio de escisión Hind III y el sitio de escisión Eco RI del plásmido.

A continuación, el plásmido pBI121 (fabricado por Clontech), que contiene una unidad de expresión para expresar un gen introducido bajo el control del promotor 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor en células vegetales, fue digerido con las enzimas de restricción Bgl II y Sac I. Entre el sitio de escisión Bgl II y el sitio de escisión Sac I del plásmido digerido pBI121, se insertó el adaptador que contenía una secuencia de reconocimiento Sac I y una secuencia de reconocimiento Sal I para construir el plásmido pBI121#89. El plásmido pBI121#89 contiene, aguas abajo del promotor 35S, una secuencia de reconocimiento del promotor Sac I y una secuencia de reconocimiento Sal I, y de ese modo se puede construir una unidad de expresión para expresar un ADN en una planta cuando el ADN es insertado entre los sitios de escisión de cada una de las secuencias de reconocimiento. El adaptador insertado en el plásmido pBI121#89 fue producido mezclando un volumen igual de cada uno de una solución de 100 $\mu$moles/L de un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GATCTGAGCTCCATGGATCCGTCGACAGCT-3' (SEQ ID NO: 13) y un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GTCGACGGATCCATGGAGCT CA-3' (SEQ ID NO: 14), calentando a 65ºC durante 10 minutos, y enfriando después a la temperatura ambiente. Después, digiriendo el plásmido pKFGMP03 anterior con Sac I y Sal I, se obtuvo un ADN que tenía la secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia de aminoácidos de la PPO de soja variante (sPPOav) entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I (fragmento Sac I-Sal I). El ADN obtenido se insertó mediante ligación entre el sitio de escisión Sac I y el sitio de escisión Sal I del plásmido pBI121#89 para conectar el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la PPO de soja variante (sPPOav) aguas abajo del promotor 35S. De este modo, se construyó el plásmido pBI-35S-sPPOav (Fig. 6) que contiene una unidad de expresión para expresar la PPO de soja variante (sPPOav).

Analizando la secuencia de nucleótidos del plásmido pBI-35S-sPPOav, se confirmó que la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 6 estaba contenida entre el sitio de escisión Hind III y el sitio de escisión Eco RI del plásmido.

El plásmido pBI-NdG6-sPPOav y el plásmido pBI-35S-sPPOav construidos de este modo se introdujeron por separado en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 (fabricado por Clontech) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 de manera que se produjeron individuos de tabaco recombinante utilizando las cepas de Agrobacterium recombinante obtenidas. Se cosecharon individualmente semillas de los recombinantes producidos

## Ejemplo 6

*Selección de una línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido 1 copia del gen de PPO de soja variante (sPPOav)*

A partir de las líneas de tabaco derivadas de los individuos de tabaco recombinante producidos en el Ejemplo 5, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3, se seleccionaron líneas de tabaco en las que 1 copia del gen introducido está localizada en uno de los cromosomas homólogos. Como resultado, de las 27 líneas de individuos de tabaco recombinante en las que se ha introducido el plásmido pBI-NdG6-sPPOav, se identificaron 17 líneas y se seleccionaron como líneas en las que 1 copia del gen introducido está localizada en uno de los cromosomas homólogos. De las 4 líneas de los individuos de tabaco recombinante en los cuales se había introducido el plásmido pBI-35S-sPPOav, se identificaron 3 líneas y se seleccionaron como líneas en las cuales 1 copia del gen introducido está localizada en uno de los cromosomas homólogos.

A continuación, se trasplantaron individuos de la generación $T_1$ de las líneas seleccionadas anteriores a tiestos de crecimiento que contenían tierra hortícola (Kureha Engei Baido fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), se aclimataron al entorno externo en una cámara de crecimiento, después se desarrollaron en un invernadero. Las flores se cubrieron con bolsas de papel para evitar el cruce con otros individuos, y se recogieron las semillas de las mismas. Utilizando las semillas obtenidas, se seleccionaron homocigotos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 7

*Análisis de las líneas de tabaco recombinante en las cuales se ha introducido el gen de PPO de soja variante (sPPOav)*

Entre los homocigotos seleccionados en el Ejemplo 6, en cuanto a la línea de tabaco recombinante P023 en la cual se ha introducido el plásmido pBI-NdG6-sPPOav y la línea de tabaco recombinante 35S-2 en la cual se ha introducido el plásmido pBI-35S-sPPOav, se analizó la producción de la PPO de soja variante (sPPOav) utilizando el método de transferencia Western de acuerdo con las operaciones descritas en el Ejemplo 2. Como anticuerpo primario, se utilizó anti-suero de rata anti-PPO de soja (fabricado por ASAHI TECHNOGLASS CORPORATION), que se había producido fusionando una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido parcial de la PPO de soja variante PPO (sPPOav) aguas abajo del gen de la ácido deshidrofólico reductasa derivado de ratón (plásmido pQE-40 fabricado por QIAGEN) y expresando el gen fusionado para producir una proteína fusionada, inmunizando la rata con la proteína fusionada como antígeno.

Mediante el método de transferencia Western, se confirmó que se detectaba una banda correspondiente al peso molecular de la PPO de soja variante (sPPOav) de cada hoja de la línea de tabaco recombinante P023 en la cual se había introducido pBI-NdG6-sPPOav y de la línea de tabaco recombinante 35S-2 en la cual se había introducido el plásmido pBI-35S-sPPOav.

Ejemplo 8

*Cruce de la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen de PPO de soja variante (sPPOav) con la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen de citocromo P450 que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1*

Se llevó a cabo el cruce de la línea homocigota 1609soy#25 que se había seleccionado en el Ejemplo 4 entre las líneas de tabaco recombinante en las que se había introducido un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (citocromo P450), con la línea P023 en la que se había introducido el plásmido pBI-NdG6-sPPOav o la línea 35S-2 en la que se había introducido el plásmido pBI-35S-sPPOav que son líneas homocigotas seleccionadas en el Ejemplo 6 entre las líneas de tabaco recombinante en las que se había introducido el gen de PPO de soja variante (sPPOav). Asimismo, se llevó a cabo el cruce de la línea 1609soy#25, la línea P023 o la línea 35S-2, con la cepa de tabaco de tipo salvaje SR-1, para producir los individuos en los que se ha introducido el gen heterogéneamente.

Las semillas cosechadas de la generación $T_1$ de los individuos de tabaco recombinante se sembraron asépticamente sobre medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina. Las semillas de tabaco de tipo salvaje se sembraron asépticamente sobre medio agar MS que no contenía kanamicina. A continuación, las plantas germinadas se trasplantaron a tiestos de crecimiento que contenían tierra hortícola (Kureha Engei Baido fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), se aclimataron al entorno externo en una cámara de crecimiento, después se hicieron crecer a 23ºC, con una longitud de día de 23 horas en una cámara de crecimiento.

A partir de una yema de floración de la línea de tabaco utilizada como línea femenina, se separaron los pétalos y se separaron las anteras antes de seccionar para la emasculación. El estigma de la yema de floración resultante de la planta femenina se puso en contacto con la antera dividida de la línea utilizada como línea masculina. Se llevó a cabo el cruce recíproco para cada línea. Tras la polinización la flor se cubrió con una bolsa de papel para evitar la polinización con los pólenes de otras líneas. Después del cruce, la planta se hizo crecer durante aproximadamente 2 meses a 23ºC, con una duración del día de 23 horas en una cámara de crecimiento y se recogieron las semillas de la flor. Las semillas recogidas de la misma vaina derivada de la misma planta femenina se utilizaron como línea 1 para el análisis de la siguiente generación. El nombre de las líneas cruzadas producidas de este modo, las líneas masculinas y las líneas femeninas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

| línea cruzada | línea femenina | línea masculina |
|---|---|---|
| P-S-1 | SR-1 | P023 |
| S-P-1 | P023 | SR-1 |
| 3-S-1 | SR-1 | 35S-2 |
| S-3-1 | 35S-2 | SR-1 |
| 6-S-1 | SR-1 | 1609soy#25 |
| S-6-1 | 1609soy#25 | SR-1 |
| P-6-1 | 1609soy#25 | P023 |
| 6-P-1 | P023 | 1609soy#25 |
| 3-6-1 | 1609soy#25 | 35S-2 |
| 6-3-1 | 35S-2 | 1609soy#25 |

Ejemplo 9

*Ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida para la línea híbrida entre la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen de PPO de soja variante (sPPOav) y la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen del citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1*

Con respecto a cada línea de tabaco recombinante producida mediante el cruce del Ejemplo 8, se sembraron asépticamente semillas sobre medio agar MS que contenía 100 mg/L de kanamicina. Después de aproximadamente 2 semanas, se observaron plántulas germinadas. Todas las líneas cruzadas obtenidas por cruce utilizando la línea SR-1 de tipo salvaje como planta femenina mostraron resistencia a la kanamicina y crecieron normalmente.

Los individuos germinados se trasplantaron a tiestos de crecimiento que contenían tierra hortícola (Kureha Engei Baido fabricado por Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), se aclimataron al entorno externo en una cámara de crecimiento, después se hicieron crecer durante aproximadamente 2 semanas a 23ºC, con una duración del día de 23 horas en una cámara de crecimiento. Las plantas de la presente invención obtenidas de esta manera se aplicaron al ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida.

El compuesto (II) del presente compuesto herbicida se disolvió con cóctel Solvesso mezclado con Solvesso 200 (fabricado por Valent) y Sorpol 3816 (fabricado por Sumitomo Chemical Co., Ltd.) a 87,5:10 de manera que el compuesto (II) contenía respectivamente 0,22 mg, 0,45 mg, 0,89 mg o 1,78 mg en 0,5 mL de cóctel Solvesso. El líquido de pulverización del presente compuesto herbicida se preparó como una solución acuosa que contenía el cóctel Solvesso con una concentración de 2,5% en el cual se disolvió el compuesto (II) y Agri dex con una concentración del 1% (fabricado por Valent) como coadyuvante.

La pulverización del líquido de pulverización a la planta de la presente invención descrita antes se llevó a cabo, utilizando una máquina de pulverización automática (fabricada por Nambasekkei), de manera que se pulverizaron 20 mL de líquido de pulverización a las plántulas de tabaco recombinante colocadas en 0,9 metros cuadrados de la zona pulverizada de una manera uniforme. Después de aproximadamente 2 semanas, se comparó la sensibilidad de la línea de tabaco recombinante aplicada para el compuesto (II) con la sensibilidad de la línea de tabaco de tipo salvaje SR-1 para el compuesto (II). En el ensayo de pulverización anterior, se utilizaron 4 individuos de tabaco recombinante con respecto a cada cantidad aplicada del compuesto (II). La sensibilidad del tabaco recombinante para el compuesto (II) se decidió puntuándola basándose en el último índice, y calculando la media de la puntuación de 4 individuos con respecto a cada línea de tabaco recombinante 1 y la cantidad aplicada para ello. Y, se llevó a cabo el mismo ensayo de pulverización de la línea de tipo salvaje SR-1 como control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

*Índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos causados por la pulverización con el compuesto*

"0": caso en el que el individuo moría;

"1": caso en el que se ocasionaba fitotoxicidad en forma de empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos, y la fitotoxicidad afectaba seriamente al crecimiento del individuo, pero este no moría;

"2": caso en el que se ocasionaba fitotoxicidad en forma de empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos, pero la fitotoxicidad no afectaba seriamente al crecimiento del individuo, pero este no moría; y

"3": caso en el que la fitotoxicidad en forma de empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos era pequeña, o casi no se observaba.

TABLA 2

| | Cantidad aplicada del compuesto (II) (mg/20 mL de líquido pulverizado) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Línea de tabaco aplicada | 0,22 | 0,45 | 0,89 | 1,78 |
| SR-1 de tipo salvaje (control negativo) | 1,5 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6-S-1 (Ejemplo Comparativo) | 2,0 | 1,0 | 0,3 | 0,3 |
| S-P-1 (Ejemplo Comparativo) | 3,0 | 2,0 | 2,0 | 1,5 |
| 6-P-1 (la planta de la presente invención) | 3,0 | 3,0 | 2,5 | 2,5 |

Y adicionalmente, se muestran en la Fig. 7 las fotos de la línea SR-1 de tipo salvaje, las plantas de los ejemplos comparativos (líneas 6-S-1 y S-P-1) y de la presente invención (línea 6-P-1) desarrolladas durante 14 días en un invernadero después de pulverizar el compuesto (II) (cantidad aplicada 1,78 mg/20 mL de líquido pulverizado).

Ejemplo 10

*Análisis de la expresión de la línea cruzada entre la línea de tabaco recombinante en la cual se ha introducido el gen de la PPO de soja variante (sPPOav) y la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen del citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1*

Antes de pulverizar el compuesto (II), a las líneas de tabaco recombinante 6-S-1, S-6-1, P-S-1, S-P-1, P-6-1, 6-P-1, 3-6-1, 6-3-1, 3-S-1 y S-3-1, se analizó la expresión del citocromo P450 utilizando el método de transferencia Western de acuerdo con las operaciones descritas en el Ejemplo 2. La proteína se extrajo de la hoja de cada tabaco recombinante para investigar la acumulación de proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1. Los resultados se muestran en la Fig. 8. En las hojas de las líneas 6-S-1, S-6-1, P- 6-1, 6-P-1, 3-6-1 y 6-3-1 del tabaco recombinante, se detectó la proteína de 44 kDa.

Ejemplo 11

*Cruce de la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen de la PPO de soja variante (sPPOav) con la línea de tabaco recombinante en la que se ha introducido el gen del citocromo P450 que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, y ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida sobre la línea híbrida*

Se llevó a cabo el cruce de la línea homocigota 1584soy#16 que se había seleccionado en el Ejemplo 4 entre las líneas de tabaco recombinante en las cuales se ha introducido un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, con la línea P023 en la que se ha introducido el plásmido pBI-NdG6-sPPOav o la línea 35S-2 en la que se ha introducido el plásmido pBI-35S-sPPOav que son líneas homocigotas seleccionadas en el Ejemplo 6 entre las líneas de tabaco recombinante en las cuales se ha introducido el gen de PPO de soja variante (sPPOav), de acuerdo con las operaciones descritas en el Ejemplo 8. El nombre de las líneas cruzadas producidas, las líneas masculinas y las líneas femeninas se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

| línea cruzada | línea femenina | línea masculina |
|---|---|---|
| 5-S-1 | SR-1 | 1584soy#16 |
| S-5-1 | 1584soy#16 | SR-1 |
| P-5-1 | 1584soy#16 | P023 |
| 5-P-1 | P023 | 1584soy#16 |
| 3-5-1 | 1584soy#16 | 35S-2 |
| 5-3-1 | 35S-2 | 1584soy#16 |

A continuación, en cuanto a las líneas SR-1, 5-S-1, S-P-1 y 5-P-1, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 9 (evaluación por medio del índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad en cuanto a la muerte del individuo y el empardecimiento o el blanqueamiento de las hojas o los tallos causados por la pulverización del compuesto), se investigaron sus sensibilidades para el compuesto (II). Como resultado, en la línea híbrida 5-P-1, se reconoció una mejora notable de la resistencia en comparación con la línea 5-S-1 o S- P-1.

Ejemplo 12

*Ensayo de pulverización del presente compuesto herbicida a la línea híbrida entre la línea de tabaco recombinante en la cual se ha introducido un gen de PPO de soja variante (sPPOav) y la línea de tabaco recombinante en la cual se ha introducido el gen del citocromo P450 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (ver. 2)*

Se obtuvieron individuos de tabaco de las semillas de la línea de tabaco de tipo salvaje SR-1 y las líneas de tabaco recombinante 6-S-1, S-P-1 y 6-P-1 producidas mediante el cruce del Ejemplo 8, y se aplicaron al ensayo de pulverización de butafenacilo, flufenpir-etilo, el compuesto (III), y calfentolazonetilo, de acuerdo con las operaciones descritas en el Ejemplo 9. En cuanto al compuesto herbicida,

(1) en el caso del flufenpir-etilo y el compuesto (III), el líquido de pulverización se preparó disolviendo cada compuesto herbicida por separado para que contuviera 0,89 mg o 1,78 mg en 0,5 mL de cóctel Solvesso respectivamente;

(2) en el caso del butafenacilo, se preparó el líquido herbicida disolviendo el compuesto herbicida para que contuviera 8,9 mg o 17,8 mg en 0,5 mL de cóctel Solvesso;

(3) en el caso de la carfentrazona-etilo, se preparó el líquido de pulverización disolviendo una preparación vertible seca del compuesto herbicida (AIM® HERBICIDE fabricado por FMC, que contenía 40% (p/p) de carfentrazona-etilo) en una solución acuosa al 1% de Agri dex (fabricado por Valent) para que contuviera 0,89 mg o 1,78 mg del ingrediente activo.

A continuación, en cuanto a las líneas SR-1, 6-S-1, 5-P-1 y 6-P-1, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 9 (evaluación mediante el índice de puntuación basándose en el grado de fitotoxicidad como muerte del individuo y empardecimiento o blanqueamiento de las hojas o los tallos causados por la pulverización del compuesto), se investigaron sus sensibilidades para butafenacilo, flufenpir-etilo, el compuesto (III) y carfentrazona-etilo. Como resultado, en la línea híbrida 6-P-1, se reconoció una mejora notable de la resistencia a todos los compuestos herbicidas en comparación con la línea 6-S-1 o S-P-1.

Ejemplo 13

*Confirmación de la introducción del gen en el cromosoma de la línea de tabaco recombinante híbrida*

Se confirmó que el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, o el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 se habían introducido en el cromosoma de la línea cruzada de tabaco recombinante de acuerdo con el método de PCR descrito aquí más adelante.

Las semillas de cada una de la línea de tipo salvaje SR-1, las líneas de tabaco recombinante 6-S-1, S-P-1, 6- P-1, 5-S-1 y 5-P-1 se sembraron asépticamente sobre medio agar MS que no contenía kanamicina. Después de tomar muestras de plántulas al cabo de 11 días desde la siembra, se añadieron a esta 40 $\mu$L de Reactivo PreMan Ultra (fabricado por Applied Biosystems). La mezcla obtenida se calentó a 100ºC durante 10 minutos, y después se enfrió. Centrifugando la mezcla enfriada a 15.000 rpm durante 1 minuto, se obtuvo el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se utilizó como solución de ADN cromosómico para que fuera el molde en la siguiente reacción de PCR. Utilizando 1 $\mu$L de la solución de ADN cromosómico como molde, y la ADN polimerasa Ex-Taq-HS (fabricada por TAKARA BIO INC.), se prepararon un total de 20 $\mu$L de la mezcla de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto. La mezcla de reacción preparada se mantuvo a 94ºC durante 2 minutos, y se repitió 3 veces el ciclo que era un conjunto de las etapas para mantener a 94ºC durante 30 segundos, después a 58ºC durante 30 segundos, después a 72ºC durante 1 minuto, y finalmente se mantuvo a 72ºC durante 2 minutos. En cuanto a los cebadores, se utilizaron 2 clases de oligonucleótidos sintéticos en combinaciones de los últimos (1) a (3) . Se aplicaron 10 $\mu$L de la mezcla de reacción a la electroforesis utilizando un gel de agarosa que contenía agarosa al 1,5% en tampón BFE, y después se tiñó el gel de agarosa con bromuro de etidio para detectar con irradiación ultravioleta de 254 nm un ADN amplificado en la reacción de PCR anterior. Como resultado, se detectó el gen introducido en el ADN cromosómico (Fig. 9). En el cromosoma de la línea de tabaco recombinante 6-S-1, se confirmó un ADN amplificado en la PCR anterior de un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1. En el cromosoma de la línea de tabaco recombinante S-P-1, se confirmó un ADN amplificado en la PCR anterior de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3. En el cromosoma de la línea de tabaco recombinante 6-P-1, se confirmaron ADN amplificados respectivamente en la PCR anterior de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 y de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3. En el cromosoma de la línea de tabaco recombinante 5-S-1, se confirmó un ADN amplificado en la PCR anterior de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2. En el cromosoma de la línea de tabaco recombinante 5-P-1, se confirmaron ADN amplificados respectivamente en la PCR anterior de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y de un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3.

(1) En el caso del SEQ ID NO: 1:

Se utilizaron como cebadores el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 7, y el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 8. Detectando un ADN 503 pb amplificado en la PCR, se confirmó que se había introducido un ADN que contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.

(2) En el caso del SEQ ID NO: 2:

Se utilizaron como cebadores el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 9, y el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 10. Detectando un ADN de 656 pb amplificado en la PCR, se confirmó que se había introducido un ADN que contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.

(3) En el caso del SEQ ID NO: 3

Se utilizaron como cebadores el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 11, y el oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 12. Detectando un ADN de 686 pb amplificado en la PCR, se confirmó que se había introducido un ADN que contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 4

Parte de un plásmido que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

SEQ ID NO: 5

Parte de un plásmido de expresión que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

SEQ ID NO: 6

Parte de un plásmido de expresión que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

SEQ ID NO: 7

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 8

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 9

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 10

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 11

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 12

Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

SEQ ID NO: 13

Oligonucleótido diseñado para producir un ADN adaptador

SEQ ID NO: 14

Oligonucleótido diseñado para producir un ADN adaptador

## REIVINDICACIONES

1. Una planta transformada que muestra resistencia a al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, donde dicha planta comprende y expresa ambos de los siguientes ADN:

(1) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa,

(2) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida, donde el citocromo P450 deriva de una bacteria.

2. La planta de la reivindicación 1, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa y dicho citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida combinados en dicha planta dan como resultado una resistencia sinérgica a dicho compuesto herbicida.

3. La planta de la reivindicación 1 o 2, donde dicho citocromo P450 es citocromo P450 derivado de actinomyces.

4. La planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho citocromo P450 se selecciona del grupo que consiste en:

(1) citocromo P450 derivado de actinomyces perteneciente a Streptomyces,

(2) citocromo P450 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 90% o más con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o 2.

(3) citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, y

(4) citocromo P450 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.

5. La planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa es una proteína derivada de una planta que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa.

6. La planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa es

(1a) una proteína derivada de una planta y que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa que es inhibida por dicho compuesto herbicida, o

(1b) una proteína derivada de una planta y que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa que no es inhibida por dicho compuesto herbicida.

7. Un método para producir una planta resistente a un compuesto herbicida que comprende transformar una planta con ambos de los siguientes ADN:

(1) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa, y

(2) un ADN introducido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa, donde el citocromo P450 deriva de una bacteria, de manera que dichos ADN son expresados en dicha planta y dicha planta muestra resistencia a dicho compuesto herbicida; y propagar dicha planta.

8. Un método para controlar una etapa de aplicación a una zona de cultivo de la planta de la reivindicación 1 de un compuesto al cual dicha planta muestra resistencia.

9. Un método para seleccionar una planta resistente a un compuesto herbicida, comprendiendo dicho método:

(1) una etapa de aplicación o adición a una zona de cultivo de la planta de la reivindicación 1 de un compuesto al cual dicha planta muestra resistencia, y

(2) una etapa de selección de una planta que ha sobrevivido al efecto de control de las malas hierbas de dicho compuesto aplicado o añadido.

10. Un método para conferir resistencia a al menos uno de los compuestos herbicidas de tipo inhibidor de protoporfirinógeno IX oxidasa a una planta, comprendiendo dicho método una etapa de transformación de dicha planta y de expresión en dicha planta de ambos de los siguientes ADN:

(1) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína que muestra actividad protoporfirinógeno IX oxidasa, y

(2) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de citocromo P450 que muestra actividad metabolizadora de dicho compuesto herbicida, donde el citocromo P450 deriva de una bacteria.

11. Material de propagación o porciones cosechables de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho material de propagación o porciones cosechables comprenden ambos ADN definidos en la reivindicación 1.

Fig. 1

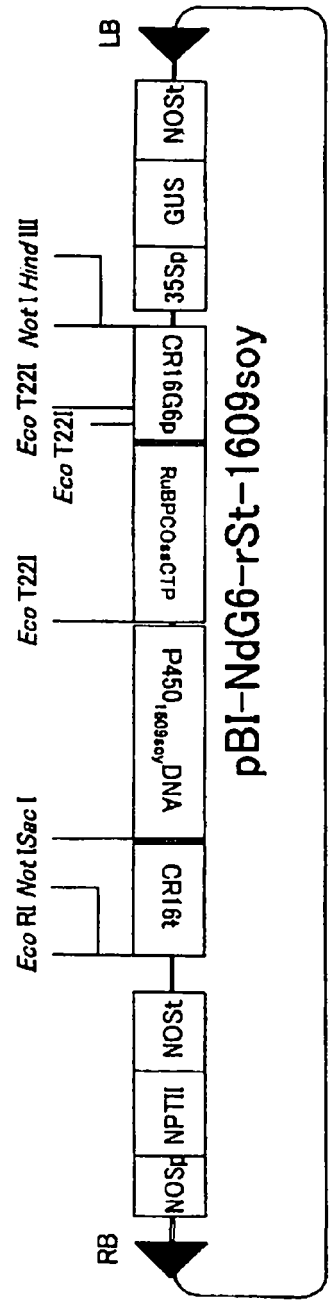

pBI-NdG6-rSt-1609soy
LB
RB
NOSt
GUS
35Sp
CR16Gp
RuBPCOssCTP
P450 1609soy DNA
CR16t
tNOS
NPTII
pNOS
Eco RI
Not I
Sac I
Eco T221
Eco T221
Eco T221
Not I
Hind III

Fig. 2

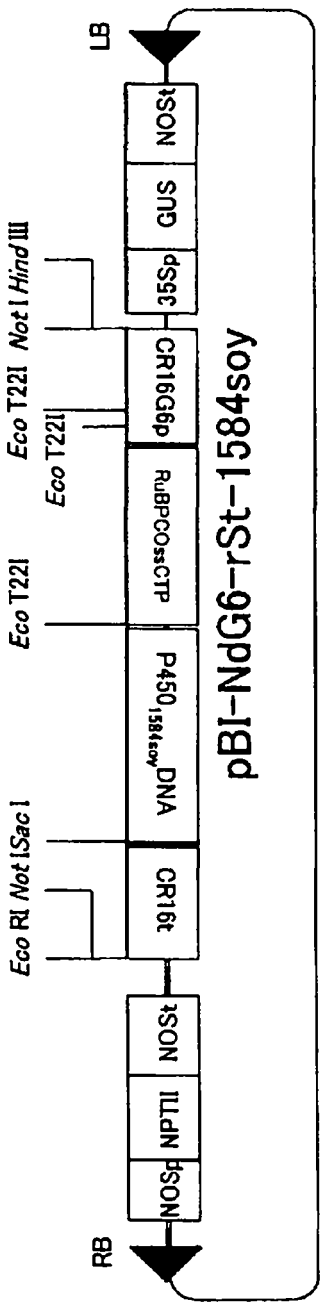

pBI-NdG6-rSt-1584soy
LB
RB
NOSt
GUS
35Sp
CR16Gp
RuBPCOssCTP
P450 1584soy DNA
CR16t
tNOS
NPTII
pNOS
Eco RI
Not I
Sac I
Eco T221
Eco T221
Eco T221
Not I
Hind III

Fig. 3

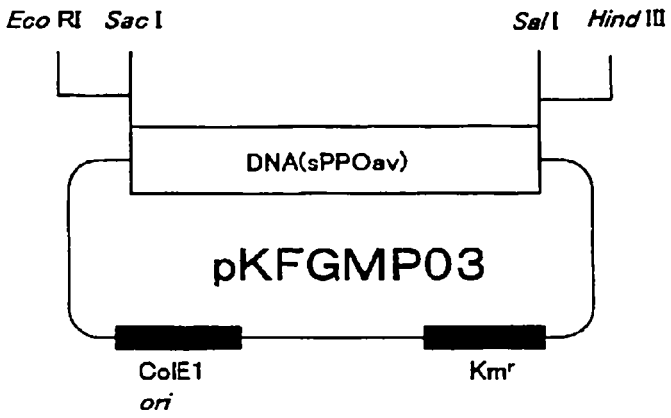
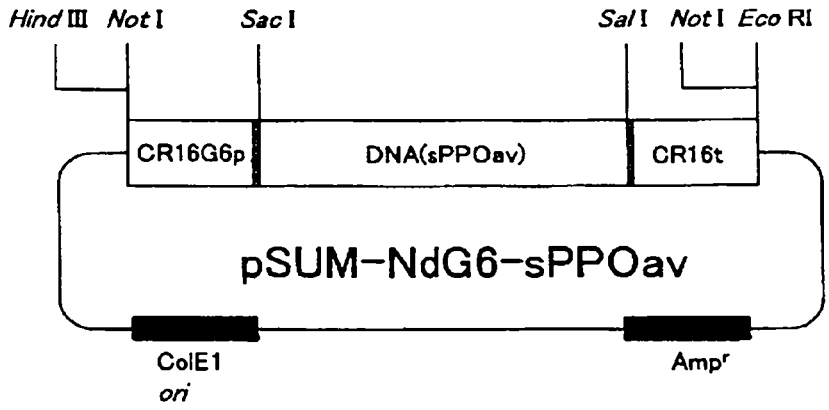

Eco RI
Sac I
Sal I
Hind III
DNA(sPPOav)
pKFGMP03
ColE1
ori
Kmr

Fig. 4


Hind III
Not I
Sac I
Sal I
Not I
Eco RI
CR16G6p
DNA(sPPOav)
CR16t
pSUM-NdG6-sPPOav
ColE1
ori
Ampr

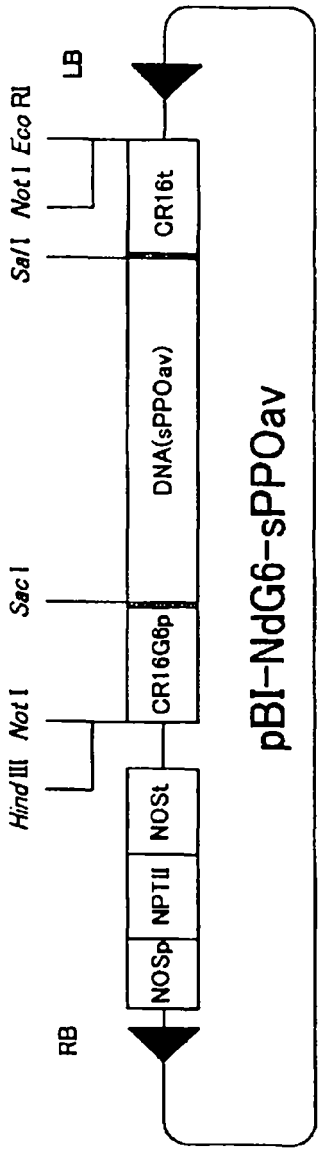

LB
Sal I Not I Eco RI
CR16t
DNA(sPPOav)
Sac I
CR16G8p
Hind III Not I
NOSt
NPTII
NOSp
RB
pBI-NdG6-sPPOav

Fig. 5

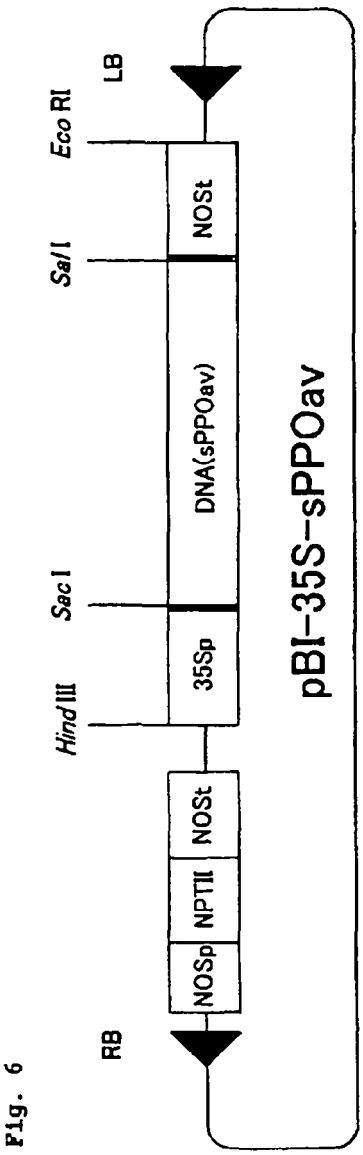

LB
Sal I Eco RI
NOSt
DNA(sPPOav)
Sac I
35Sp
Hind III
NOSt
NPTII
NOSp
RB
pBI-35S-sPPOav

Fig. 6

**Fig. 7**

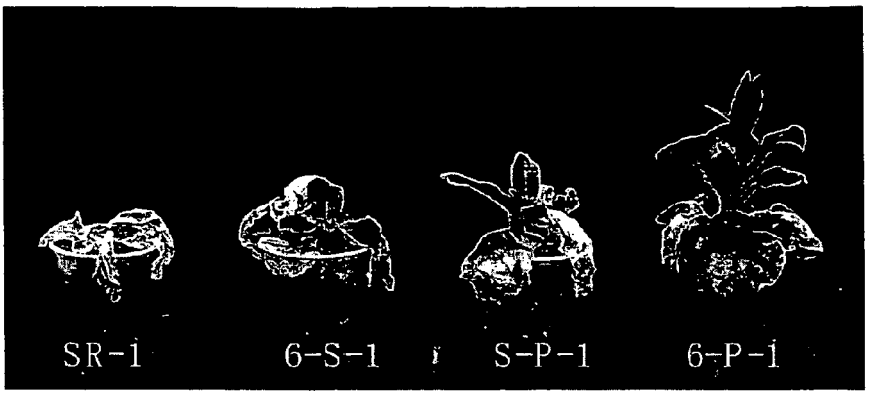

SR-1
6-S-1
S-P-1
6-P-1

**Fig. 8**

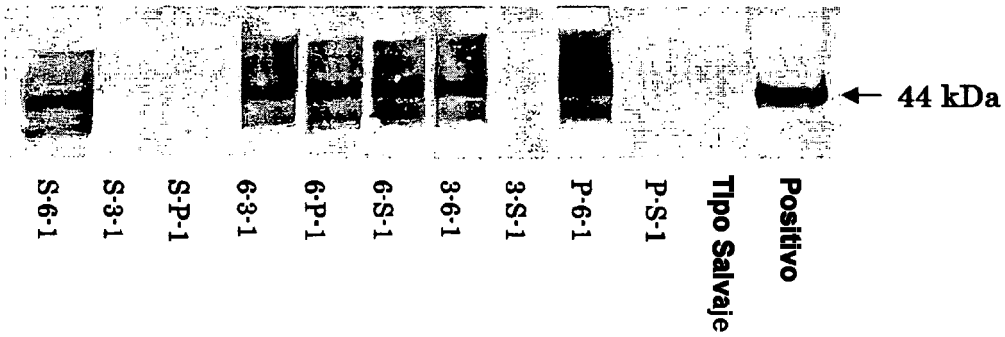
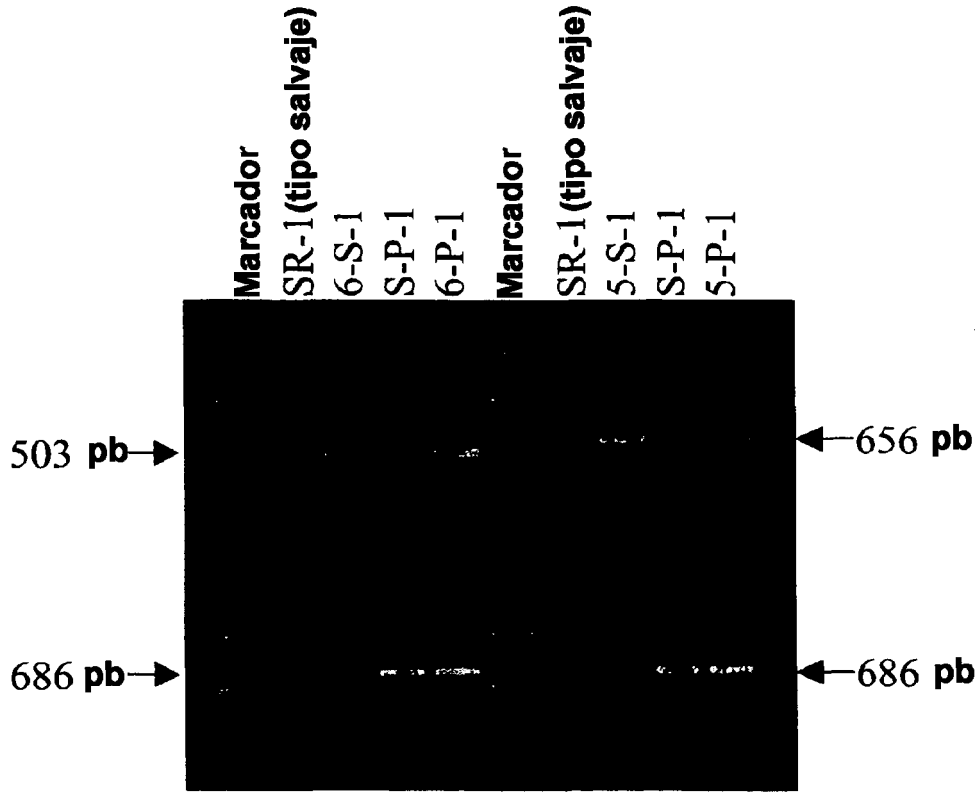

44 kDa
S-6-1
S-3-1
S-P-1
6-3-1
6-P-1
6-S-1
3-6-1
3-S-1
P-6-1
P-S-1
Tipo Salvaje
Positivo

Fig. 9


Marcador
SR-1(tipo salvaje)
6-S-1
S-P-1
6-P-1
Marcador
SR-1(tipo salvaje)
5-S-1
S-P-1
5-P-1
503 pb
686 pb
656 pb
686 pb

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sumitomo Chemical Co., Ltd.

<120> PLANTA RESISTENTE A COMPUESTOS HERBICIDAS

<130>

<150> JP 2004/147363
<151> 2004-05-18

<150> JP 2005/070980
<151> 2005-03-14

<160> 14

<210> 1
<211> 398
<212> PRT
<213> *Streptomyces steffisburgensis* IF013446T

<400> 1

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

```
Ala Gly Leu Arg Pro Arg Ile Gln Arg Ile Val Asp Arg Arg Leu Asp
        115                 120                 125
Ala Met Ile Ala Gln Gly Pro Pro Ala Asp Leu Val Ser Ser Phe Ala
    130                 135                 140
Leu Pro Val Pro Ser Met Val Ile Cys Ala Leu Leu Gly Val Pro Tyr
145                 150                 155                 160
Ala Asp His Asp Phe Phe Glu Thr Gln Ser Arg Arg Leu Leu Arg Gly
                165                 170                 175
Pro Gln Thr Ala Asp Val Met Asp Ala Arg Ala Arg Leu Asp Glu Tyr
            180                 185                 190
Phe Gly Glu Leu Ile Asp Arg Lys Arg Lys Glu Pro Gly Ala Gly Leu
        195                 200                 205
Leu Asp Asp Leu Val Gln Arg Gln Leu Arg Asp Gly Ala Leu Asp Arg
    210                 215                 220
Glu Gly Leu Ile Ala Leu Ala Leu Ile Leu Leu Val Ala Gly His Glu
225                 230                 235                 240
Thr Thr Ala Asn Met Ile Ser Leu Gly Thr Phe Thr Leu Leu Gln His
                245                 250                 255
Pro Glu Arg Leu Ala Glu Leu Arg Ala Asp Pro Arg Leu Leu Pro Ala
            260                 265                 270
Ala Val Glu Glu Leu Met Arg Met Leu Ser Ile Ala Asp Gly Leu Leu
        275                 280                 285
Arg Leu Ala Val Glu Asp Ile Glu Val Ala Gly Thr Thr Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Gly Asp Gly Val Val Phe Leu Thr Ser Val Ile Asn Arg Asp Glu Thr
305                 310                 315                 320
Val Tyr Pro Glu Pro Asp Thr Leu Asp Trp His Arg Ser Ala Arg His
                325                 330                 335
His Val Ala Phe Gly Phe Gly Ile His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu
            340                 345                 350
Ala Arg Ala Glu Leu Glu Ile Ala Leu Trp Thr Leu Phe Asp Arg Leu
        355                 360                 365
Pro Thr Leu Arg Leu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Ile Ala Phe Lys Pro
    370                 375                 380
Gly Asp Thr Ile Gln Gly Met Leu Glu Leu Pro Val Thr Trp
385                 390                 395
```

<210> 2
<211> 398
<212> PRT
<213> *Streptomyces roseorubens* IF013682T

<400> 2

```
Met Thr Asp Thr Thr Ala Pro Val Ala Phe Pro Gln Ser Arg Thr Cys
 1               5                  10                  15
Pro Tyr His Pro Pro Ala Ala Tyr Glu Pro Leu Arg Ala Glu Arg Pro
            20                  25                  30
Leu Thr Arg Ile Thr Leu Phe Asp Gly Arg Glu Ala Trp Leu Val Ser
        35                  40                  45
Gly His Ala Thr Ala Arg Ala Leu Leu Ala Asp Pro Arg Leu Ser Ser
    50                  55                  60
Asp Arg Asp Arg Pro Gly Phe Pro Thr Pro Thr Ala Arg Phe Ala Gly
65                  70                  75                  80
Ile Arg Asn Arg Arg Thr Ala Leu Leu Gly Val Asp Asp Pro Glu His
                85                  90                  95
Arg Ala Gln Arg Arg Met Val Val Gly Asp Phe Thr Leu Lys Arg Ala
            100                 105                 110
Ala Ala Leu Arg Pro Arg Ile Gln Arg Ile Val Asp Glu Arg Leu Asp
        115                 120                 125
Ala Met Ile Ala Gln Gly Pro Pro Ala Asp Leu Val Ser Ala Phe Ala
    130                 135                 140
Leu Pro Val Pro Ser Met Val Ile Cys Ala Leu Leu Gly Val Pro Tyr
145                 150                 155                 160
Ala Asp His Asp Phe Phe Glu Ala Gln Ser Arg Arg Leu Leu Arg Gly
                165                 170                 175
Pro Gly Thr Ala Asp Val Gln Asp Ala Arg Ser Arg Leu Glu Glu Tyr
            180                 185                 190
Phe Gly Glu Leu Ile Asp Arg Lys Arg Glu Asp Pro Gly Thr Gly Leu
        195                 200                 205
Leu Asp Asp Leu Val Gln Arg Gln Pro Gly Asp Gly Gly Pro Asp Arg
    210                 215                 220
Glu Gly Leu Ile Ala Met Ala Leu Ile Leu Leu Val Ala Gly His Glu
225                 230                 235                 240
Thr Thr Ala Asn Met Ile Ser Leu Gly Thr Phe Thr Leu Leu Gln His
                245                 250                 255
Pro Glu Arg Leu Ala Glu Leu Arg Ala Asp Ser Glu Val Met Pro Ala
            260                 265                 270
Ala Val Glu Glu Leu Met Arg Leu Leu Ser Ile Ala Asp Gly Leu Leu
        275                 280                 285
Arg Ile Ala Val Glu Asp Val Glu Val Ala Gly Thr Thr Ile Arg Ala
    290                 295                 300
Gly Glu Gly Val Val Phe Ala Thr Ser Val Ile Asn Arg Asp Glu Thr
305                 310                 315                 320
Val Phe Ala Glu Pro Asp Thr Leu Asp Trp Ser Arg Pro Ala Arg His
                325                 330                 335
His Val Ala Phe Gly Phe Gly Ile His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu
            340                 345                 350
Ala Arg Ala Glu Leu Glu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Phe Gly Arg Leu
        355                 360                 365
Pro Thr Leu Arg Leu Ala Ala Pro Pro Asp Glu Ile Pro Phe Lys Pro
    370                 375                 380
Gly Asp Thr Ile Gln Gly Met Leu Glu Leu Pro Val Thr Trp
385                 390                 395
```

<210> 3
<211> 543
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 3

```
Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu
 1               5                  10                  15
Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr
            20                  25                  30
Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile
        35                  40                  45
Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro
    50                  55                  60
Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala
65                  70                  75                  80
Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu
                85                  90                  95
Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly
            100                 105                 110
Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met
        115                 120                 125
Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly
    130                 135                 140
Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro
145                 150                 155                 160
Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile
                165                 170                 175
Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro
            180                 185                 190
Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu
        195                 200                 205
Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val
    210                 215                 220
Tyr Val Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys
225                 230                 235                 240
Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe
                245                 250                 255
Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro
            260                 265                 270
Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly
        275                 280                 285
Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val
    290                 295                 300
Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys
                325                 330                 335
Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu
```

```
                340                 345                 350
Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr
        355                 360                 365
Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg
    370                 375                 380
Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His
385                 390                 395                 400
Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser
                405                 410                 415
Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr
            420                 425                 430
Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu
        435                 440                 445
Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro
    450                 455                 460
Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala
465                 470                 475                 480
Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys
                485                 490                 495
Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn
            500                 505                 510
Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu
        515                 520                 525
Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys
    530                 535                 540
```

<210> 4
<211> 1653
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (8) ... (1639)
<220>

<223> Parte de un plásmido que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

<400> 4

```
gagctcc atg gtt tcc gtc ttc aac gag atc cta ttc ccg ccg aac caa     49
       Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln
         1               5                  10
acc ctt ctt cgc ccc tcc ctc cat tcc cca acc tct ttc ttc acc tct     97
Thr Leu Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser
 15                  20                  25                  30
ccc act cga aaa ttc cct cgc tct cgc cct aac cct att cta cgc tgc    145
Pro Thr Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys
                 35                  40                  45
tcc att gcg gag gaa tcc acc gcg tct ccg ccc aaa acc aga gac tcc    193
Ser Ile Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser
             50                  55                  60
gcc ccc gtg gac tgc gtc gtc gtc ggc gga ggc gtc agc ggc ctc tgc    241
Ala Pro Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys
         65                  70                  75
atc gcc cag gcc ctc gcc acc aaa cac gcc aat gcc aac gtc gtc gtc    289
Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val
     80                  85                  90
acg gag gcc cga gac cgc gtc ggc ggc aac atc acc acg atg gag agg    337
Thr Glu Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg
 95                 100                 105                 110
gac gga tac ctc tgg gaa gaa ggc ccc aac agc ttc cag cct tct gat    385
Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp
                115                 120                 125
cca atg ctc acc atg gtg gtg gac agt ggt tta aag gat gag ctt gtt    433
Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val
            130                 135                 140
ttg ggg gat cct gat gca cct cgg ttt gtg ttg tgg aac agg aag ttg    481
Leu Gly Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu
        145                 150                 155
agg ccg gtg ccc ggg aag ctg act gat ttg cct ttc ttt gac ttg atg    529
```

```
Arg Pro Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met
    160                 165                 170
agc att ggt ggc aaa atc agg gct ggc ttt ggt gcg ctt gga att cgg    577
Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg
175                 180                 185                 190
cct cct cct cca ggt cat gag gaa tcg gtt gaa gag ttt gtt cgt cgg    625
Pro Pro Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg
                195                 200                 205
aac ctt ggt gat gag gtt ttt gaa cgg ttg ata gag cct ttt tgt tca    673
Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser
            210                 215                 220
ggg gtc tat gta ggc gat cct tca aaa tta agt atg aaa gca gca ttc    721
Gly Val Tyr Val Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe
        225                 230                 235
ggg aaa gtt tgg aag ctg gaa aaa aat ggt ggt agc att att ggt gga    769
Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly
    240                 245                 250
act ttc aaa gca ata caa gag aga aat gga gct tca aaa cca cct cga    817
Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg
255                 260                 265                 270
gat ccg cgt ctg cca aaa cca aaa ggt cag act gtt gga tct ttc cgg    865
Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg
                275                 280                 285
aag gga ctt acc atg ttg cct gat gca att tct gcc aga cta ggc aac    913
Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn
            290                 295                 300
aaa gta aag tta tct tgg aag ctt tca agt att agt aaa ctg gat agt    961
Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser
        305                 310                 315
gga gag tac agt ttg aca tat gaa aca cca gaa gga gtg gtt tct ttg   1009
Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu
    320                 325                 330
cag tgc aaa act gtt gtc ctg acc att cct tcc tat gtt gct agt aca   1057
Gln Cys Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr
335                 340                 345                 350
ttg ctg cgt cct ctg tct gct gct gct gca gat gca ctt tca aag ttt   1105
```

```
Leu Leu Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe
                355                 360                 365
tat tac cct cca gtt gct gca gtt tcc ata tcc tat cca aaa gaa gct   1153
Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala
            370                 375                 380
att aga tca gaa tgc ttg ata gat ggt gag ttg aag ggg ttt ggt caa   1201
Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln
        385                 390                 395
ttg cat cca cgt agc caa gga gtg gaa aca tta gga act ata tac agc   1249
Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser
    400                 405                 410
tca tca cta ttc ccc aac cga gca cca cct gga agg gtt cta ctc ttg   1297
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu
415                 420                 425                 430
aat tac att gga gga gca act aat act gga att tta tcg aag acg gac   1345
Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp
                435                 440                 445
agt gaa ctt gtg gaa aca gtt gat cga gat ttg agg aaa atc ctt ata   1393
Ser Glu Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile
            450                 455                 460
aac cca aat gcc cag gat cca ttt gta gtg ggg gtg aga ctg tgg cct   1441
Asn Pro Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro
        465                 470                 475
caa gct att cca cag ttc tta gtt ggc cat ctt gat ctt cta gat gtt   1489
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val
    480                 485                 490
gct aaa gct tct atc aga aat act ggg ttt gaa ggg ctc ttc ctt ggg   1537
Ala Lys Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly
495                 500                 505                 510
ggt aat tat gtg tct ggt gtt gcc ttg gga cga tgc gtt gag gga gcc   1585
Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala
                515                 520                 525
tat gag gta gca gct gaa gta aac gat ttt ctc aca aat aga gtg tac   1633
Tyr Glu Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr
            530                 535                 540
aaa tag tagcagttgt cgac                                          1653

Lys
```

<210> 5
<211> 2930
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (930) ... (2561)

<220>

<223> Parte de un plásmido de expresión que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

<400> 5

```
aagcttgcgg ccgctatgga ttggacacgg agactaagaa aaatgtataa agtaatgtag    60
agtaaaaaga aagagaaaga aaagtgggta aagtagcggg acccatcaat atataattga   120
tagatttaga aaagtagttg aaagtagtgg gtgggtggga ttttatatt ataaaaattt    180
actatttga gaaagttttg aaatgtatag aattgagtgg gacatccata aaaggaaagt    240
gtatagaatt aaatgggaca gagggagtaa tacctttatg atatataaat tttgttatt    300
ttgatttcat aagattataa atctatgtta taatgataat ataattttaa aaataatact   360
atattaattc tgattagtcg attaccgcct tttataattt tacaatactg agtaatatga   420
ataaatcagt tatctgaaaa gcaaataata tcttttgtaaa acagcgttcg gtcaaatggg   480
aagttcatgt gtatttcaata gttttaatat aaaagtaaat tttaaattaa ttgttatttt   540
tgtttcagaa atttaaaata aattattgag catgggaagt tcacgggcat cattgagcag   600
cactagactg ttttgaacaat gtatgtccgg tgtacatcta tgacctttca actcaaacta   660
gtgaataatg catttctagaa tacatctttt caaatttcaa caaacacagc tttaactttt   720
ctttcaacgg attggaatcc tttttctaaac ttttttaaaat aaaaaaaatg cattattgta  780
atatttatca acacctcaac attgatgtta gcgtactata aataggtgct cttggtgctc    840
tactatcatc acatcaatct tacaccacaa accttgagct taatttttct acttattctc    900
agcaatcaca ttctaaagat ctgagctcc atg gtt tcc gtc ttc aac gag atc       953
                              Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile
                                1               5
cta ttc ccg ccg aac caa acc ctt ctt cgc ccc tcc ctc cat tcc cca      1001
```

```
Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro
 10                  15                  20
acc tct ttc ttc acc tct ccc act cga aaa ttc cct cgc tct cgc cct  1049
Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro
 25                  30                  35                  40
aac cct att cta cgc tgc tcc att gcg gag gaa tcc acc gcg tct ccg  1097
Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro
                 45                  50                  55
ccc aaa acc aga gac tcc gcc ccc gtg gac tgc gtc gtc gtc ggc gga  1145
Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly
             60                  65                  70
ggc gtc agc ggc ctc tgc atc gcc cag gcc ctc gcc acc aaa cac gcc  1193
Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala
         75                  80                  85
aat gcc aac gtc gtc gtc acg gag gcc cga gac cgc gtc ggc ggc aac  1241
Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn
 90                  95                  100
atc acc acg atg gag agg gac gga tac ctc tgg gaa gaa ggc ccc aac  1289
Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn
105                 110                 115                 120
agc ttc cag cct tct gat cca atg ctc acc atg gtg gtg gac agt ggt  1337
Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly
                125                 130                 135
tta aag gat gag ctt gtt ttg ggg gat cct gat gca cct cgg ttt gtg  1385
Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val
            140                 145                 150
ttg tgg aac agg aag ttg agg ccg gtg ccc ggg aag ctg act gat ttg  1433
Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu
        155                 160                 165
cct ttc ttt gac ttg atg agc att ggt ggc aaa atc agg gct ggc ttt  1481
Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe
    170                 175                 180
ggt gcg ctt gga att cgg cct cct cct cca ggt cat gag gaa tcg gtt  1529
Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val
185                 190                 195                 200
gaa gag ttt gtt cgt cgg aac ctt ggt gat gag gtt ttt gaa cgg ttg  1577
```

```
Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu
                205                 210                 215
ata gag cct ttt tgt tca ggg gtc tat gta ggc gat cct tca aaa tta  1625
Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp Pro Ser Lys Leu
            220                 225                 230
agt atg aaa gca gca ttc ggg aaa gtt tgg aag ctg gaa aaa aat ggt  1673
Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly
        235                 240                 245
ggt agc att att ggt gga act ttc aaa gca ata caa gag aga aat gga  1721
Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly
    250                 255                 260
gct tca aaa cca cct cga gat ccg cgt ctg cca aaa cca aaa ggt cag  1769
Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln
265                 270                 275                 280
act gtt gga tct ttc cgg aag gga ctt acc atg ttg cct gat gca att  1817
Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile
                285                 290                 295
tct gcc aga cta ggc aac aaa gta aag tta tct tgg aag ctt tca agt  1865
Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser
            300                 305                 310
att agt aaa ctg gat agt gga gag tac agt ttg aca tat gaa aca cca  1913
Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro
        315                 320                 325
gaa gga gtg gtt tct ttg cag tgc aaa act gtt gtc ctg acc att cct  1961
Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro
    330                 335                 340
tcc tat gtt gct agt aca ttg ctg cgt cct ctg tct gct gct gct gca  2009
Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala
345                 350                 355                 360
gat gca ctt tca aag ttt tat tac cct cca gtt gct gca gtt tcc ata  2057
Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile
                365                 370                 375
tcc tat cca aaa gaa gct att aga tca gaa tgc ttg ata gat ggt gag  2105
Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu
            380                 385                 390
ttg aag ggg ttt ggt caa ttg cat cca cgt agc caa gga gtg gaa aca  2153
```

```
Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr
        395                 400                 405

tta gga act ata tac agc tca tca cta ttc ccc aac cga gca cca cct   2201
Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro
    410                 415                 420

gga agg gtt cta ctc ttg aat tac att gga gga gca act aat act gga   2249
Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly
425                 430                 435                 440

att tta tcg aag acg gac agt gaa ctt gtg gaa aca gtt gat cga gat   2297
Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp
                445                 450                 455

ttg agg aaa atc ctt ata aac cca aat gcc cag gat cca ttt gta gtg   2345
Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val
            460                 465                 470

ggg gtg aga ctg tgg cct caa gct att cca cag ttc tta gtt ggc cat   2393
Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His
        475                 480                 485

ctt gat ctt cta gat gtt gct aaa gct tct atc aga aat act ggg ttt   2441
Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe
    490                 495                 500

gaa ggg ctc ttc ctt ggg ggt aat tat gtg tct ggt gtt gcc ttg gga   2489
Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly
505                 510                 515                 520

cga tgc gtt gag gga gcc tat gag gta gca gct gaa gta aac gat ttt   2537
Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe
                525                 530                 535

ctc aca aat aga gtg tac aaa tag tagcagttgt cgacagctct caacttcgta  2591
Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys
            540

attttatgag tgagtggagg aattgcaacg ttttcttttg tgttttgttt tcgagcaact 2651
tcataattta cagagtgagt gacagtcagt gacagaattg caacttttc tttgtacttt 2711
gttgtgactt gtgatgaata acttcatctg gctggtaatg tatgcgatct ttttaaataa 2771
aatacactat tattaaacca ataatcatat tcatttcttat ttctgtgttt gtcatttctc 2831
atttagtata aacatttctta taagaagtaa ctccagcttt ttgcttccac tttccttgac 2891
ccgtttgtgt aaaaaagtaa gaagtgcggc cgcgaattc                         2930
```

<210> 6
<211> 2805
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (884) ... (2515)

<220>

<223> Parte de un plásmido de expresión que contiene un gen de Protoporfirinógeno IX oxidasa derivado de Glycine max

<400> 6

```
aagcttgcat gcctgcaggt ccccagatta gccttttcaa tttcagaaag aatgctaacc   60
cacagatggt tagagaggct tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagcaata  120
atctccagga aatcaaatac cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga  180
ctaactgcat caagaacaca gagaaagata tatttctcaa gatcagaagt actattccag  240
tatggacgat tcaaggcttg cttcacaaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta  300
aaaaggtagt tcccactgaa tcaaaggcca tggagtcaaa gattcaaata gaggacctaa  360
cagaactcgc cgtaaagact ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca  420
agaagaaaat cttcgtcaac atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca  480
aagatacagt ctcagaagac caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg  540
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgttcact tattgtgaag atagtggaaa  600
aggaaggtgg ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg  660
ccttgcccga cagtggtccc aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag  720
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa  780
gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat  840
ttcatttgga gagaacacgg gggactctag aggatcgagc tcc atg gtt tcc gtc     895
                                                Met Val Ser Val
                                                  1
ttc aac gag atc cta ttc ccg ccg aac caa acc ctt ctt cgc ccc tcc     943
Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu Leu Arg Pro Ser
  5                  10                  15                  20
ctc cat tcc cca acc tct ttc ttc acc tct ccc act cga aaa ttc cct     991
```

```
Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr Arg Lys Phe Pro
                  25                  30                  35
cgc tct cgc cct aac cct att cta cgc tgc tcc att gcg gag gaa tcc   1039
Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile Ala Glu Glu Ser
            40                  45                  50
acc gcg tct ccg ccc aaa acc aga gac tcc gcc ccc gtg gac tgc gtc   1087
Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro Val Asp Cys Val
        55                  60                  65
gtc gtc ggc gga ggc gtc agc ggc ctc tgc atc gcc cag gcc ctc gcc   1135
Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala
    70                  75                  80
acc aaa cac gcc aat gcc aac gtc gtc gtc acg gag gcc cga gac cgc   1183
Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
85                  90                  95                  100
gtc ggc ggc aac atc acc acg atg gag agg gac gga tac ctc tgg gaa   1231
Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
                105                 110                 115
gaa ggc ccc aac agc ttc cag cct tct gat cca atg ctc acc atg gtg   1279
Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val
            120                 125                 130
gtg gac agt ggt tta aag gat gag ctt gtt ttg ggg gat cct gat gca   1327
Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly Asp Pro Asp Ala
        135                 140                 145
cct cgg ttt gtg ttg tgg aac agg aag ttg agg ccg gtg ccc ggg aag   1375
Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro Val Pro Gly Lys
    150                 155                 160
ctg act gat ttg cct ttc ttt gac ttg atg agc att ggt ggc aaa atc   1423
Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile
165                 170                 175                 180
agg gct ggc ttt ggt gcg ctt gga att cgg cct cct cct cca ggt cat   1471
Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly His
                185                 190                 195
gag gaa tcg gtt gaa gag ttt gtt cgt cgg aac ctt ggt gat gag gtt   1519
Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val
            200                 205                 210
ttt gaa cgg ttg ata gag cct ttt tgt tca ggg gtc tat gta ggc gat   1567
```

```
Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp
        215                 220                 225
cct tca aaa tta agt atg aaa gca gca ttc ggg aaa gtt tgg aag ctg   1615
Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu
    230                 235                 240
gaa aaa aat ggt ggt agc att att ggt gga act ttc aaa gca ata caa   1663
Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln
245                 250                 255                 260
gag aga aat gga gct tca aaa cca cct cga gat ccg cgt ctg cca aaa   1711
Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
                265                 270                 275
cca aaa ggt cag act gtt gga tct ttc cgg aag gga ctt acc atg ttg   1759
Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu
            280                 285                 290
cct gat gca att tct gcc aga cta ggc aac aaa gta aag tta tct tgg   1807
Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val Lys Leu Ser Trp
        295                 300                 305
aag ctt tca agt att agt aaa ctg gat agt gga gag tac agt ttg aca   1855
Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Leu Thr
    310                 315                 320
tat gaa aca cca gaa gga gtg gtt tct ttg cag tgc aaa act gtt gtc   1903
Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys Lys Thr Val Val
325                 330                 335                 340
ctg acc att cct tcc tat gtt gct agt aca ttg ctg cgt cct ctg tct   1951
Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu Arg Pro Leu Ser
                345                 350                 355
gct gct gct gca gat gca ctt tca aag ttt tat tac cct cca gtt gct   1999
Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala
            360                 365                 370
gca gtt tcc ata tcc tat cca aaa gaa gct att aga tca gaa tgc ttg   2047
Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu
        375                 380                 385
ata gat ggt gag ttg aag ggg ttt ggt caa ttg cat cca cgt agc caa   2095
Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln
    390                 395                 400
gga gtg gaa aca tta gga act ata tac agc tca tca cta ttc ccc aac   2143
```

```
Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
405                 410                 415                 420
cga gca cca cct gga agg gtt cta ctc ttg aat tac att gga gga gca   2191
Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
                425                 430                 435
act aat act gga att tta tcg aag acg gac agt gaa ctt gtg gaa aca   2239
Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu Leu Val Glu Thr
            440                 445                 450
gtt gat cga gat ttg agg aaa atc ctt ata aac cca aat gcc cag gat   2287
Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn Ala Gln Asp
        455                 460                 465
cca ttt gta gtg ggg gtg aga ctg tgg cct caa gct att cca cag ttc   2335
Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe
    470                 475                 480
tta gtt ggc cat ctt gat ctt cta gat gtt gct aaa gct tct atc aga   2383
Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys Ala Ser Ile Arg
485                 490                 495                 500
aat act ggg ttt gaa ggg ctc ttc ctt ggg ggt aat tat gtg tct ggt   2431
Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
                505                 510                 515
gtt gcc ttg gga cga tgc gtt gag gga gcc tat gag gta gca gct gaa   2479
Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu
            520                 525                 530
gta aac gat ttt ctc aca aat aga gtg tac aaa tag tagcagttgt cgacag 2531
Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys
        535                 540
ctcgaatttc cccgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 2591
tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 2651
taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt 2711
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 2771
cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attc                            2805
```

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 7

aggctttcat ctgatcgtga cagac 25

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 8

atcagacctt ccctgtctaa tgctc 25

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 9

gctttgctag gtgttcccta tgctg 25

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 10

ctaagtgtgg gcaacctacc gaaga 25

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 11

ttgttcaggg gtctatgt 18

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico diseñado para la PCR

<400> 12

gttcactgtc cgtcttcg 18

<210> 13
<211> 30

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido diseñado para producir un ADN adaptador

<400> 13

gatctgagct ccatggatcc gtcgacagct 30

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido diseñado para producir un ADN adaptador

<400> 14

gtcgacggat ccatggagct ca 22