

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 026**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2016 PCT/US2016/046041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17039969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2016 E 16842539 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3344775**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la tolerancia a herbicidas en plantas**

30 Prioridad:

01.09.2015 US 201562212716 P
18.04.2016 US 201662323852 P
04.08.2016 US 201615228993

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

EVDOKIMOV, ARTEM G.;
LARUE, CLAYTON T.;
MOSHIRI, FARHAD;
REAM, JOEL E. y
ZHOU, XUEFENG

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 979 026 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para la tolerancia a herbicidas en plantas

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 62/212.716, presentada el 1 de septiembre de 2015, la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 62/323.852, presentada el 18 de abril de 2016, y la Solicitud No Provisional de Estados Unidos Núm. 15/228.993, presentada el 4 de agosto de 2016.

Incorporación del listado de secuencias

- 10 El listado de secuencias que figura en el archivo denominado MONS384WO_sequence_listing.txt, de 204 kilobytes (medidos en MS-Windows) y creado el 3 de agosto de 2016, se adjunta al presente documento por medio de presentación electrónica y se incorpora al mismo por referencia.

Antecedentes

Campo de la invención

- 15 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología. Más concretamente, la invención se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican enzimas que proporcionan tolerancia a herbicidas que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa.

Arte relacionado

- 20 La producción de cultivos agrícolas utiliza a menudo rasgos transgénicos creados por medio de procedimientos biotecnológicos. Un gen heterólogo, también conocido como transgén, puede introducirse en una planta para producir un rasgo transgénico. La expresión del transgén en la planta le confiere un rasgo, tal como la tolerancia a los herbicidas. Algunos ejemplos de rasgos transgénicos de tolerancia a herbicidas son la tolerancia al glifosato, al glufosinato y a la dicamba. Con el aumento de especies de malas hierbas resistentes a los herbicidas de uso común, se necesitan nuevos rasgos de tolerancia a los herbicidas en el campo. Entre los herbicidas de especial interés se encuentran los que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa (PPO, EC 1.3.3.4), denominados herbicidas PPO. Los herbicidas PPO controlan un espectro de malas hierbas resistentes a los herbicidas, lo que hace que un rasgo que confiera tolerancia a estos herbicidas sea especialmente útil en un sistema de cultivo combinado con otro u otros rasgos de tolerancia a los herbicidas.

- 30 La protoporfirinógeno oxidasa funciona tanto en la vía de la biosíntesis de la clorofila como en la del hemo, donde convierte el protoporfirinógeno IX en protoporfirina IX. Tras la producción de protoporfirina IX, las vías biosintéticas de la clorofila y el hemo divergen con la incorporación de diferentes iones metálicos (hierro para el hemo y magnesio para la clorofila). Los segmentos de esta vía se conservan en procariotas y eucariotas, y muchas de las enzimas PPO que se encuentran en procariotas y eucariotas son relativamente similares. Algunas procariotas (por ejemplo, las cianobacterias) utilizan esta vía para la producción de clorofila y hemo, mientras que otras procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*) la utilizan para la producción de hemo.

- 35 Las protoporfirinógeno oxidasas insensibles a los herbicidas (iPPOs) se han aislado de una serie de procariotas y eucariotas. Desde el punto de vista estructural, se cree que existen al menos tres subclases distintas de enzimas PPO: HemY (M Hansson y L Hederstedt, "Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes" *Journal of Bacteriology* 174(24):8081-8093 (1992)), HemG (A Sasarman, et al., "Mapping of a new hem gene in *Escherichia coli* K12" *Microbiology* 113:297-303 (1979)), y HemJ (TO Boynton, et al., "Discovery of a gene involved in a third bacterial protoporphyrinogen oxidase activity through comparative genomic analysis and functional complementation" *Applied and Environmental Microbiology* 77(14):4795-4801 (2011)). Esta invención proporciona nuevos iPPO recombinantes que son miembros de la familia HemY. A pesar de los más de veinte años de investigación y del número de iPPO identificados hasta la fecha, aún no se ha comercializado ninguna planta de cultivo transgénica que incluya un iPPO recombinante. Una plataforma sólida de control de las malas hierbas depende, en parte, del desarrollo continuo de paquetes de rasgos de tolerancia a los herbicidas. Identificar y utilizar las iPPO para crear rasgos de cultivos transgénicos representa, por tanto, un avance para la agricultura.

Sumario de la invención

- 50 En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs:1 y tiene actividad protoporfirinógeno

oxidasa insensible a herbicidas. En algunas realizaciones se proporciona una molécula de ADN recombinante, en la que la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs:26, 31, y 47. En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Por lo tanto, la invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende al menos un 99% de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, en la que el polipéptido tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.

En ciertas realizaciones, un promotor heterólogo, por ejemplo, un promotor funcional en una célula vegetal, está enlazado operablemente a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la invención, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, en la que el polipéptido tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. Dicha molécula de ADN resultante puede comprender además una secuencia diana que funcione para localizar el polipéptido dentro de una célula.

En un aspecto, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención. En una realización, dicha construcción de ADN comprende, en enlace operable con una secuencia de ácido nucleico de la invención, una secuencia diana que funciona para localizar el polipéptido dentro de una célula. La construcción de ADN puede estar presente en el genoma de una planta, semilla o célula transgénica. En ciertas realizaciones, el polipéptido confiere tolerancia a herbicidas a la célula, planta, semilla o parte de la planta.

Otro aspecto de la invención proporciona una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención o un polipéptido recombinante de la invención. La planta, semilla, célula o parte de la planta transgénica puede así comprender, es decir, mostrar, tolerancia a al menos un herbicida PPO. En algunas realizaciones, la planta, semilla, célula o parte de la planta transgénica comprende un rasgo transgénico adicional de tolerancia a herbicidas.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para conferir tolerancia a herbicidas a una planta, semilla, célula o parte de planta que comprende: expresar heterológicamente un polipéptido recombinante de la invención en la planta, semilla, célula o parte de planta. En algunas realizaciones del procedimiento, la planta, semilla, célula o parte de la planta comprende actividad protoporfirinógeno oxidasa conferida por el polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, la tolerancia a herbicidas es a al menos un herbicida PPO seleccionado del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafen, lactofeno, fluoroglicofeno-etilo, oxifluorfen, flumioxazina, azafenidina, carfentrazona-etilo, sulfentrazone, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazón, piraflufeno-etilo, saflufenacil y S-3100.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de transformación de plantas, que comprende los etapas de: a) introducir una molécula de ADN recombinante de la invención en una célula vegetal; y b) regenerar una planta transgénica a partir de la misma que comprende la molécula de ADN recombinante. El procedimiento puede comprender además el etapa de seleccionar una planta que sea tolerante al menos a un herbicida PPO. El procedimiento puede comprender además una etapa de cruzamiento de la planta regenerada consigo misma o con una segunda planta y la recogida de semillas del cruce.

Otro aspecto más de la invención proporciona un procedimiento para controlar las malas hierbas en un área de crecimiento vegetal, que comprende el contacto de un área de crecimiento vegetal que comprende la planta o semilla transgénica con al menos un herbicida PPO, en el que la planta o semilla transgénica es tolerante al herbicida PPO y en el que se controlan las malas hierbas en el área de crecimiento vegetal.

También se proporciona un procedimiento de identificación de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa, el procedimiento comprende: a) transformar una cepa de *E. coli* que tiene un bloqueo de genes para la enzima PPO nativa de *E. coli* con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína candidata de tolerancia a herbicidas; y b) cultivar dicha *E. coli* transformada mediante el uso de un medio bacteriano libre de hemo, en el que el crecimiento mediante el uso de dicho medio bacteriano identifica una proteína que tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa.

La invención proporciona además un procedimiento de identificación de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas, que comprende: a) transformar una cepa de *E. coli* que tiene un gen de bloqueo para la enzima PPO nativa de *E. coli* con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína recombinante; y b) cultivar dicha cepa de *E. coli* transformada mediante el uso de un medio bacteriano que contiene la proteína *coli* con un vector de expresión bacteriano que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína recombinante; y b) cultivar dicha *E. coli* transformada mediante el uso de un medio bacteriano que contiene al menos un herbicida PPO, en el que el crecimiento de las bacterias identifica una proteína que tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a los herbicidas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de cribado para un gen de tolerancia a herbicidas que comprende: a) expresar una molécula de ADN recombinante de la invención en una célula vegetal; e b) identificar una célula vegetal que muestre tolerancia a un herbicida PPO.

Además, la invención proporciona procedimientos de cribado para un gen de tolerancia a herbicidas que comprenden: a) expresar una molécula de ADN recombinante de la invención en una célula bacteriana que carece de HemG, en la que la célula bacteriana se cultiva en un medio libre de hemo en presencia de un herbicida PPO; y b) identificar una célula bacteriana que muestra tolerancia a un herbicida PPO.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producción de una planta tolerante a un herbicida PPO y al menos a otro herbicida que comprende: a) obtener una planta que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención; b) cruzar la planta transgénica con una segunda planta que comprende tolerancia al menos a otro herbicida, y c) seleccionar una planta progenie resultante de dicho cruce que comprende tolerancia a un herbicida PPO y al menos a otro herbicida es otro aspecto de la invención.
- 10 La invención también proporciona, en otro aspecto, un procedimiento para reducir el desarrollo de malas hierbas tolerantes a herbicidas que comprende: a) cultivar en un entorno de cultivo una planta de la presente invención que comprende tolerancia a un herbicida PPO, por ejemplo comprendiendo una molécula de ADN de la presente invención, y comprende tolerancia a al menos otro herbicida; y b) aplicar un herbicida PPO y al menos otro herbicida al entorno de cultivo, en el que la planta de cultivo es tolerante al herbicida PPO y al menos otro herbicida. En ciertas realizaciones
- 15 del procedimiento, el herbicida PPO puede seleccionarse del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafeno, lactofeno, fluoroglicofeno-etilo, oxifluorfen, flumioxazina, azafenidina, carfentrazona-etilo, sulfentrazona, fluciacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazón, piraflufeno-etilo, saflufenacilo y S-3100. **Breve descripción de los dibujos**

- Figura 1. Resultados de ensayos del sistema de cribado bacteriano de herbicidas con herbicidas PPO. Ensayo de *E. coli* HemG (H_N10) (SEQ ID NO:76), HemY PPO R1N473 (SEQ ID NO: 13), HemY PPO R1N533 (SEQ ID NO:14); o HemY PPO R1N171 (SEQ ID NO:15) en presencia de los herbicidas PPO acifluorfen, flumioxazina, lactofeno, o fomesafeno. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 20 Figura 2. Resultados de ensayos del sistema de cribado bacteriano de herbicidas con herbicidas PPO. Ensayo de HemY R2N30 (SEQ ID NO:1), HemY R2N40 (SEQ ID NO:2), HemY R2N70 (SEQ ID NO:3), HemY R2N90 (SEQ ID NO:4), HemY R2N100 (SEQ ID NO:5), y control negativo *Amaranthus tuberculatus* (WH) PPO (SEQ ID NO:80) en presencia de los herbicidas PPO acifluorfen y S-3100
- 25

Breve descripción de las secuencias

- SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de R2N30.
- SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de R2N40. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 30 SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de R2N70. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de R2N90. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de R2N100. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 35 SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de una variante de SEQ ID NO: 1 (R2N30). [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NOS:7-12 son las secuencias de aminoácidos de las variantes de SEQ ID NO:2 (R2N40). [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 40 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de R1N473. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de R1N533. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:15 es la secuencia de aminoácidos de R1N171. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 45 SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos de R1N311. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:17 es la secuencia de aminoácidos de R1N333. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 50 SEQ ID NO: 18 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N473. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO: 19 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N533. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:20 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N171. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 55 SEQ ID NO:21 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N333. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- SEQ ID NO:22 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N473. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]
- 60 SEQ ID NO:23 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N533. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NO:24 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N171. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NO:25 es una secuencia de aminoácidos truncada de R1N333. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:26-30 son las secuencias nativas de nucleótidos bacterianos que codifican SEQ ID NOs:1 a SEQ ID NO:5, respectivamente [con SEQ ID NOs: 27-30 no forman parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:31-35 son secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NOs:1-5, respectivamente, codón optimizado para la expresión de dicotiledóneas [con SEQ ID NOs: 32-35 no forman parte de la invención, sólo como referencia]

Las SEQ ID NOs:36-42 son secuencias de nucleótidos que codifican las SEQ ID NOs:6-12, respectivamente, codón optimizado para la expresión en dicotiledóneas. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:43-46 son secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NO:9, codón optimizado para la expresión de dicotiledóneas. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:47-51 son secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NOs:1-5, respectivamente, codón optimizado para la expresión de monocotiledóneas, [con SEQ ID NOs: 48-51 no forman parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:52-56 son las secuencias nativas de nucleótidos bacterianos que codifican SEQ ID NOs:13-17. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:57-62 son las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs:13-17, codón optimizado para la expresión de dicotiledóneas. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:63-67 son las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs:13-17, codón optimizado para la expresión de monocotiledóneas. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:68-75 son las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOs:18-25, respectivamente, codón optimizado para la expresión de dicotiledóneas. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NO:76 es la secuencia de aminoácidos de la enzima HemG de la PPO de *E. coli* (protoporfirinógeno IX deshidrogenasa; GenBank Accession No. WP_021498199). [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NOs:77-79 son las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:76. [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NO:80 es la secuencia de aminoácidos de la protoporfirinógeno oxidasa de tipo salvaje de *Amaranthus tuberculatus* (WH). [No forma parte de la invención, sólo como referencia]

SEQ ID NO:81 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:80, codón optimizado para la expresión bacteriana de *E. coli*. [No forma parte de la invención sólo como referencia]

Descripción detallada

Las siguientes descripciones y definiciones se proporcionan para definir mejor la invención y guiar a los expertos en la materia en la práctica de la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la materia.

La invención proporciona nuevas moléculas de ADN recombinante y proteínas que codifican protoporfirinógeno oxidasas insensibles a herbicidas (iPPOs). Por ejemplo, la invención proporciona en una realización vectores y casetes de expresión que codifican iPPOs derivados microbianamente para su expresión en células y plantas. También se proporcionan procedimientos para producir células y plantas tolerantes a los herbicidas PPO. La invención proporciona además procedimientos y composiciones para utilizar la ingeniería de proteínas y herramientas bioinformáticas para obtener y mejorar iPPOs.

En aspectos específicos, la invención proporciona moléculas de ADN recombinante y proteínas. Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "recombinante" se refiere a un ADN, proteína, célula, semilla u organismo no natural que es el resultado de la ingeniería genética y que, como tal, no se encontraría normalmente en la naturaleza. Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que no se da de forma natural en la naturaleza y que, como tal, es el resultado de la intervención humana, tal como una molécula de ADN compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí. Un ejemplo de molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN proporcionada en la presente memoria descriptiva que codifica una protoporfirinógeno oxidasa insensible a los herbicidas, unida operablemente a un elemento regulador heterólogo o de otro tipo, tal como un promotor heterólogo. Una "proteína recombinante" es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que no se produce de forma natural y que, como tal, es el resultado de la intervención humana, tal como una proteína de ingeniería o una proteína quimérica. Una célula, semilla u organismo recombinante es una célula, semilla u organismo que comprende ADN transgénico, por ejemplo, una célula, semilla, planta o parte de planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante y, por tanto, producida como resultado de la transformación de una planta.

Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "ingeniería genética" se refiere a la creación de un ADN, proteína u organismo no natural que normalmente no se encontraría en la naturaleza y que, por lo tanto, conlleva la aplicación de la intervención humana. La ingeniería genética puede utilizarse para producir un ADN, una proteína o un organismo de ingeniería que se haya concebido y creado en el laboratorio por medio de una o varias de las técnicas de la biotecnología, tal como la biología molecular, la bioquímica de proteínas, la transformación bacteriana y la transformación de plantas. Por ejemplo, la ingeniería genética puede utilizarse para crear un gen quimérico que comprenda al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí mediante el uso de una o más de las técnicas de la biología molecular, tal como la clonación de genes, la ligadura de ADN y la síntesis de ADN. Un gen quimérico puede consistir en dos o más moléculas de ADN heterólogas unidas de forma operable, tal como una secuencia codificadora de proteínas unida de forma operable a un elemento de expresión génica tal como una secuencia codificadora de péptidos de tránsito o un promotor heterólogo. La ingeniería genética puede utilizarse para crear una proteína de ingeniería cuya secuencia de aminoácidos se haya creado por medio de una o varias de las técnicas de ingeniería de proteínas, tal como el diseño de proteínas por medio de mutagénesis dirigida al sitio y la evolución dirigida por medio de mutagénesis aleatoria y barajado del ADN. Una proteína de ingeniería puede tener una o más deleciones, inserciones o sustituciones con respecto a la secuencia codificante de la proteína de tipo salvaje y cada deleción, inserción o sustitución puede consistir en uno o más aminoácidos. En otra realización, una proteína de ingeniería puede consistir en dos péptidos heterólogos unidos de forma operable, tal como una enzima unida de forma operable a un péptido de tránsito.

Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "insensible a herbicidas" o "actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas" significa la capacidad de una protoporfirinógeno oxidasa (PPO, EC 1.3.3.4) de mantener al menos parte de su actividad protoporfirinógeno oxidasa en presencia de uno o más herbicida(s) PPO. Por "actividad protoporfirinógeno oxidasa" se entiende la capacidad de catalizar la oxidación de seis electrones (eliminación de electrones) del protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX, es decir, de catalizar la deshidrogenación del protoporfirinógeno para formar protoporfirina. La actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa puede medirse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por medio de un ensayo enzimático en el que la producción del producto de la protoporfirinógeno oxidasa o el consumo del sustrato de la protoporfirinógeno oxidasa en presencia de uno o más herbicida(s) PPO se mide por medio de fluorescencia, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o espectrometría de masas (EM). Otro ejemplo de ensayo para medir la actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa es un ensayo bacteriano, tal como los ensayos descritos en la presente memoria descriptiva, en el que se expresa una protoporfirinógeno oxidasa recombinante en una célula bacteriana que carece de actividad de PPO y se mide la capacidad de la protoporfirinógeno oxidasa recombinante para complementar este fenotipo de bloqueo. La insensibilidad a los herbicidas puede ser una insensibilidad total o parcial a un herbicida concreto, y puede expresarse como un porcentaje (%) de tolerancia o insensibilidad a un herbicida PPO concreto. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, una "protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas" o "IPPO" muestra insensibilidad a herbicidas en presencia de uno o más herbicidas PPO.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, una "cepa *hemG* de bloqueo" significa un organismo o célula de un organismo, tal como *E. coli*, que carece de actividad HemG hasta el punto de que es incapaz de crecer en un medio de crecimiento libre de hemo, o de forma que su crecimiento se ve perjudicado de forma detectable en ausencia de hemo en relación con una cepa isogénica que comprende una HemG funcional. Se puede preparar una cepa *hemG* de bloqueo, por ejemplo, *E. coli* en vista de los conocimientos en la materia, por ejemplo, en vista de la secuencia *hemG* de *E. coli* (Ecogene Accession No. EG11485; Sasarman et al., "Nucleotide sequence of the hemG gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *E. coli* K12" Can J Microbiol 39:1155-1161, 1993).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "transgén" se refiere a una molécula de ADN incorporada artificialmente al genoma de un organismo debido a la intervención humana, tal como un procedimiento de transformación de plantas. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "transgénico" significa que comprende un transgén, por ejemplo, una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende un transgén en su genoma y un "rasgo transgénico" se refiere a una característica o fenotipo transmitido o conferido por la presencia de un transgén incorporado en el genoma de la planta. Debido a dicha alteración genómica, la planta transgénica es algo claramente diferente de la planta de tipo salvaje relacionada y el rasgo transgénico es un rasgo que no se encuentra de forma natural en la planta de tipo salvaje. Las plantas transgénicas de la invención comprenden las moléculas de ADN recombinante y las proteínas de ingeniería proporcionadas por la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "heterólogo" se refiere a la relación entre dos o más elementos derivados de fuentes diferentes y, por tanto, no asociados normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante codificante de proteínas es heteróloga con respecto a un promotor enlazado operablemente si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. En otro ejemplo, una molécula de ADN codificante de proteínas o un polipéptido puede expresarse heterológicamente en una planta, semilla, célula o parte de una planta si dicha molécula de ADN codificante de proteínas o polipéptido no se expresa normalmente en dicha planta, semilla, célula o parte de una planta en la naturaleza. Una determinada molécula de ADN recombinante puede ser heteróloga con respecto a una célula, semilla u organismo en el que se inserta cuando no se encontraría de forma natural en esa célula, semilla u organismo concreto. Un polipéptido concreto puede ser heterólogo con respecto a una célula, semilla u organismo en el que se expresa cuando no se encontraría de forma natural en esa célula, semilla u organismo concreto.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "aislado" se refiere a la separación, al menos parcial, de una molécula de otras moléculas típicamente asociadas a ella en su estado natural. En una realización, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado natural. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína que está presente de forma natural en una bacteria sería una molécula de ADN aislada si no estuviera dentro del ADN de la bacteria de la que se encuentra de forma natural la molécula de ADN que codifica la proteína. Así, una molécula de ADN fusionada o unida de forma operable a otra u otras moléculas de ADN con las que no estaría asociada en la naturaleza, por ejemplo, como resultado de técnicas de ADN recombinante o de transformación de plantas, se considera aislada en la presente memoria descriptiva. Dichas moléculas se consideran aisladas incluso cuando están integradas en el cromosoma de una célula huésped o presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "molécula de ADN codificante de proteínas" se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. Una "secuencia codificante de proteínas" es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína. Por "secuencia" se entiende una disposición secuencial de nucleótidos o aminoácidos. Los límites de una secuencia codificante de proteínas pueden estar determinados por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de parada de traducción en el extremo 3'. Una molécula codificante de proteínas puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos. Tal y como se utilizan en la presente memoria descriptiva, "expresión de transgenes", "expresión de un transgén", "expresión de proteínas" y "expresión de una proteína" significan la producción de una proteína por medio del procedimiento de transcripción de una molécula de ADN en ARN mensajero (ARNm) y la traducción del ARNm en cadenas polipeptídicas, que finalmente se pliegan en proteínas. Una molécula de ADN codificante de proteínas puede unirse de forma operable a un promotor heterólogo en una construcción de ADN para su uso en la expresión de la proteína en una célula transformada con la molécula de ADN recombinante. Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "enlazados operablemente" significa dos o más moléculas de ADN o dos o más polipéptidos enlazados de manera que uno pueda afectar a la función del otro. Las moléculas de ADN enlazadas de forma operable o los polipéptidos enlazados de forma operable pueden formar parte de una única molécula contigua y pueden o no ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está enlazado de forma operable con una molécula de ADN codificante de proteínas en una construcción de ADN en la que las dos moléculas de ADN están dispuestas de tal forma que el promotor puede afectar a la expresión del transgén.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, una "construcción de ADN" es una molécula de ADN recombinante que comprende dos o más secuencias de ADN heterólogas. Las construcciones de ADN son útiles para la expresión de transgenes y pueden estar comprendidas en vectores y plásmidos. Las construcciones de ADN pueden utilizarse en vectores con fines de transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped, para producir plantas y células transgénicas, y como tales también pueden estar contenidas en el ADN plastidial o el ADN genómico de una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica. Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "vector" es cualquier molécula de ADN recombinante que puede utilizarse con fines de transformación bacteriana o vegetal. Las moléculas de ADN recombinante, tal como se exponen en el listado de secuencias, pueden, por ejemplo, insertarse en un vector como parte de una construcción que tenga la molécula de ADN recombinante enlazada operablemente a un elemento de expresión génica que funcione en una planta para afectar a la expresión de la proteína de ingeniería codificada por la molécula de ADN recombinante. Los procedimientos generales útiles para manipular moléculas de ADN con el fin de fabricar y utilizar construcciones de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas son bien conocidos en la técnica y se describen detalladamente, por ejemplo, en manuales y guías de laboratorio como los siguientes Michael R. Green y Joseph Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cuarta edición) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012). Los componentes para una construcción de ADN, o un vector que comprende una construcción de ADN, incluyen uno o más elementos de expresión génica enlazados de forma operable a una secuencia de ácido nucleico transcribible, tales como los siguientes: un promotor para la expresión de un ADN enlazado de forma operable, una molécula de ADN codificante de proteínas enlazada de forma operable y una región 3' no traducida (UTR) enlazada de forma operable. Los elementos de expresión génica útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes tipos de elementos: promotor, 5' UTR, potenciador, líder, elemento de acción cis, intrón, secuencia diana, 3' UTR, y uno o más transgenes marcadores seleccionables.

Las construcciones de ADN de la invención pueden incluir un promotor enlazado operablemente a una molécula de ADN codificante de proteínas proporcionada por la invención, por lo que el promotor dirige la expresión de la molécula de proteína recombinante. Los promotores útiles en la práctica de la presente invención incluyen aquellos que funcionan en una célula para la expresión de un polinucleótido operablemente ligado, tal como un promotor bacteriano o vegetal. Los promotores vegetales son variados y bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos, regulados temporalmente, regulados espacialmente y/o regulados espaciotemporalmente.

En una realización de la invención, una construcción de ADN proporcionada en la presente memoria descriptiva incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia diana que está operablemente unida a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una molécula polipeptídica que tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas, por lo que la secuencia diana facilita la localización de la molécula polipeptídica dentro de la célula. Las secuencias diana son conocidas en la técnica como secuencias señal, péptidos diana, secuencias de

localización y péptidos de tránsito. Un ejemplo de secuencia de orientación es un péptido de tránsito cloroplástico (CTP), una secuencia de orientación mitocondrial (MTS) o un péptido de doble orientación cloroplástica y mitocondrial. Al facilitar la localización de la proteína dentro de la célula, la secuencia diana puede aumentar la acumulación de la proteína recombinante, proteger a la proteína de la degradación proteolítica y/o potenciar el nivel de tolerancia al herbicida, y reducir de este modo los niveles de lesión en la célula, semilla u organismo transgénico tras la aplicación del herbicida.

Los CTP y otras moléculas diana que pueden utilizarse en relación con la presente invención son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, el CTP EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee et al., Mol Gen Genet. 210:437-442, 1987), el EPSPS CTP de *Petunia hybrida* (della-Cioppa et al., PNAS 83:6873-6877, 1986), la secuencia señal cab-m7 del maíz (Becker et al., Plant Mol Biol. 20:49-60, 1992; PCT WO 97/41228), una presecuencia mitocondrial (e.g. Silva Filho et al., Plant Mol Biol 30:769-780, 1996), y la secuencia señal de la glutatión reductasa del guisante (Creissen et al., Plant J. 8:167-175, 1995; PCT WO 97/41228).

Las moléculas de ADN recombinante de la presente invención pueden sintetizarse y modificarse por medio de procedimientos conocidos en la técnica, ya sea en su totalidad o en parte, cuando sea deseable proporcionar secuencias útiles para la manipulación del ADN (tales como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o sitios de clonación basados en recombinación), secuencias preferidas por las plantas (tales como uso de codones vegetales o secuencias consenso de Kozak), o secuencias útiles para el diseño de construcciones de ADN (tales como secuencias espaciadoras o enlazadoras). La presente invención incluye moléculas de ADN recombinante y proteínas de ingeniería que tienen al menos un 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las moléculas de ADN recombinante o secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria descriptiva, y que tienen actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos en una secuencia lineal de polinucleótidos o aminoácidos de una secuencia de referencia ("consulta") (o su cadena complementaria) en comparación con una secuencia de prueba ("individuo") (o su cadena complementaria) cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima (con inserciones, supresiones o huecos de nucleótidos o aminoácidos apropiados que suman menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia en la ventana de comparación). La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación es bien conocida por los expertos en la materia y puede realizarse por medio de herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineación homológica de Needleman y Wunsch, el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, y por medio de implementaciones informáticas de estos algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA disponibles como parte del paquete de software de análisis de secuencias del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715) y MUSCLE (versión 3.6) (RC Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput" Nucleic Acids Research 32(5):1792-7 (2004)) por ejemplo con parámetros por defecto. Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que comparten las dos secuencias alineadas dividido por el número total de componentes en la porción del segmento de la secuencia de referencia que se está alineando, es decir, toda la secuencia de referencia o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias puede realizarse con una secuencia de longitud completa o una parte de la misma, o con una secuencia más larga. Las proteínas de ingeniería pueden producirse cambiando (es decir, modificando) una proteína de tipo salvaje para producir una nueva proteína con características modificadas, por ejemplo, un patrón de localización celular particular, tal como dirigido al cloroplasto o a la mitocondria, o una combinación novedosa de características útiles de la proteína, tales como V_{max} , K_m , K_i , IC_{50} , alterados, especificidad de sustrato, especificidad de inhibidor/herbicida, selectividad de sustrato, la capacidad de interactuar con otros componentes de la célula, tales como proteínas asociadas o membranas, y la estabilidad de la proteína, entre otras. Las modificaciones pueden realizarse en posiciones específicas de aminoácidos en una proteína y pueden consistir en una sustitución del aminoácido que se encuentra en esa posición en la naturaleza (es decir, en la proteína de tipo salvaje) por un aminoácido diferente. Las proteínas de ingeniería proporcionadas por la invención proporcionan así una nueva proteína con una o más características proteicas alteradas en relación con una proteína similar encontrada en la naturaleza. En una realización de la invención, una proteína de ingeniería tiene características proteicas alteradas, tales como las que dan lugar a una sensibilidad disminuida a uno o más herbicidas en comparación con una proteína de tipo salvaje similar o una capacidad mejorada para conferir tolerancia a los herbicidas en una planta transgénica que expresa la proteína de ingeniería a uno o más herbicidas. En una realización, la invención proporciona una proteína de ingeniería, y la molécula de ADN recombinante que la codifica, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de la Tabla 1 y que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Las mutaciones de aminoácidos pueden realizarse como una única sustitución de aminoácidos en la proteína o en combinación con otra(s) mutación(es), tal como otra(s) sustitución(es) de aminoácidos, delecciones o adiciones. Las mutaciones pueden realizarse por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos.

Residuos	Sustituciones conservadoras	Residuos	Sustituciones conservadoras
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
Su	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Isla	Leu; Val		

Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "tipo salvaje" significa una versión similar pero no idéntica que se produce de forma natural. Una "molécula de ADN de tipo salvaje" o una "proteína de tipo salvaje" es una versión natural de la molécula de ADN o de la proteína, es decir, una versión de la molécula de ADN o de la proteína preexistente en la naturaleza. Un ejemplo de proteína de tipo salvaje útil para la comparación con las proteínas de ingeniería proporcionadas por la invención es la protoporfirinógeno oxidasa de *Arabidopsis thaliana*. Una "planta de tipo salvaje" es una planta no transgénica del mismo tipo que la planta transgénica, y como tal es genéticamente distinta de la planta transgénica que contiene el rasgo de tolerancia al herbicida. Ejemplos de plantas de tipo salvaje útiles para la comparación con plantas de maíz transgénico son el maíz no transgénico LH244 (número de depósito ATCC PTA-1173) y el maíz endogámico 01DKD2 (I294213) (número de depósito ATCC PTA-7859). Para las plantas de haba de soja transgénica, una línea comparativa ejemplar sería el haba de soja A3555 no transgénica (número de depósito ATCC PTA-10207), y para las plantas de algodón transgénico, una línea comparativa ejemplar sería la Coker 130 no transgénica (número de protección de variedades vegetales 8900252).

Plantas transgénicas y herbicidas

Un aspecto de la invención incluye células vegetales transgénicas, tejidos vegetales transgénicos, plantas transgénicas y semillas transgénicas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y las proteínas de ingeniería proporcionadas por la invención. Estas células, tejidos, plantas y semillas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y las proteínas de ingeniería muestran tolerancia a herbicidas a uno o más herbicidas PPO y, opcionalmente, tolerancia a uno o más herbicidas adicionales.

Los procedimientos adecuados para la transformación de células de plantas huésped para su uso con la presente invención incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que se pueda introducir ADN en una célula (por ejemplo, cuando una construcción de ADN recombinante se integra de forma estable en un cromosoma de la planta) y son bien conocidos en la técnica. Un procedimiento ejemplar y ampliamente utilizado para introducir una construcción de ADN recombinante en plantas es el sistema de transformación *Agrobacterium*, bien conocido por los expertos en la materia. Otro procedimiento ejemplar para introducir una construcción de ADN recombinante en plantas es la inserción de una construcción de ADN recombinante en el genoma de una planta en un sitio predeterminado por medio de procedimientos de integración dirigida al sitio. La integración dirigida al sitio puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por medio del uso de nucleasas de dedos de zinc, meganucleasas nativas o de ingeniería, endonucleasas TALE o una endonucleasa guiada por ARN (por ejemplo, un sistema CRISPR/Cas9). Las plantas transgénicas pueden regenerarse a partir de una célula vegetal transformada por medio de los procedimientos de cultivo de células vegetales. Una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgén (es decir, dos copias alélicas del transgén) puede obtenerse por medio de autopolinización (autofecundación) de una planta transgénica que contiene un único alelo transgénico consigo misma, por ejemplo, una planta R0, para producir semillas R1. Una cuarta parte de las semillas R1 producidas serán homocigóticas con respecto al transgén. Las plantas cultivadas a partir de semillas R1 germinadas pueden someterse a pruebas de zigosis, mediante el uso de un ensayo SNP, secuenciación de ADN o un ensayo de amplificación térmica que permita distinguir entre heterocigotos y homocigotos, denominado ensayo de zigosis.

Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "herbicida inhibidor de PPO" o "herbicida PPO" es un producto químico que se dirige e inhibe la actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa (PPO), que cataliza

la deshidrogenación del protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX, que es el precursor del hemo y la clorofila. La inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa provoca la formación de especies reactivas del oxígeno, lo que da lugar a la alteración de la membrana celular y, en última instancia, a la muerte de las células susceptibles. Los herbicidas PPO son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Algunos ejemplos de herbicidas PPO son, entre otros, los difeniléteres (tales como acifluorfen, sus sales y ésteres, aclonifeno, bifenox, sus sales y ésteres, etoxifeno, sus sales y ésteres, fluoronitrofen, furiloxifeno, halosafen, clometoxifeno, fluoroglicofeno, sus sales y ésteres, lactofeno, sus sales y ésteres, oxifluorfen y fomesafen, sus sales y ésteres); tiadiazoles (tales como fluciacet-metil y tiadiazimina); pirimidinedionas o feniluracilos (tales como benzfendizona, butafenacil, [3-2-cloro-4-fluoro-5-(1-metil-6-trifluorometil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-3-il)fenoxi]-2-piridiloxi]acetato de etilo (Número de registro CAS 353292-31-6 y denominado en la presente memoria descriptiva S-3100), flupropacilo, saflufenacilo y tiafenacilo); fenilpirazoles (tales como fluazolato, piraflufeno y piraflufeno-etilo); oxadiazoles (tales como oxadiargilo y oxadiazón); triazolinonas (tales como azafenidina, bencarbazona, carfentrazona, sus sales y ésteres, y sulfentrazona); oxazolidinedionas (tal como pentoxazona); N-fenilftalimidas (tales como cinidón-etilo, flumiclorac, flumiclorac-pentilo y flumioxazina); derivados de benzoxazinona (tales como 1,5-dimetil-6-tioxo-3-(2,2,7-trifluoro-3,4-dihidro-3-oxo-4-prop-2-quinil-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-1,3,5-triazinano-2,4-diona); flufenpir y flufenpir-etilo; piraclonil; y profluazol. Las protoporfirinógeno oxidasas y las células, semillas, plantas y partes de plantas proporcionadas por la invención exhiben tolerancia a herbicidas a uno o más herbicida(s) PPO.

Se pueden aplicar herbicidas a un área de crecimiento vegetal que comprenda las plantas y semillas proporcionadas por la invención como procedimiento para controlar las malas hierbas. Las plantas y semillas proporcionadas por la invención comprenden un rasgo de tolerancia a herbicidas y como tales son tolerantes a la aplicación de uno o más herbicidas PPO. La aplicación del herbicida puede ser la dosis comercial recomendada (1X) o cualquier fracción o múltiplo de la misma, tal como el doble de la dosis comercial recomendada (2X). Las dosis de herbicida pueden expresarse como equivalente ácido por libra por acre (lb ae/acre) o equivalente ácido por gramo por hectárea (g ae/ha) o como libras de ingrediente activo por acre (lb ai/acre) o gramos de ingrediente activo por hectárea (g ai/ha), dependiendo del herbicida y de la formulación. La aplicación herbicida comprende al menos un herbicida PPO. La zona de crecimiento de la planta puede o no incluir plantas de malas hierbas en el momento de la aplicación del herbicida. Una dosis herbicida eficaz de herbicida(s) PPO para su uso en una zona para el control de las malas hierbas puede consistir en un intervalo de aproximadamente 0,1X a aproximadamente 30X tasa(s) de la etiqueta durante una temporada de crecimiento. En la Tabla 2 se muestra la dosis 1X indicada en la etiqueta para algunos herbicidas PPO ejemplares. Un (1) acre equivale a 2,47105 hectáreas y una (1) libra equivale a 453,592 gramos. Las dosis de herbicida se pueden convertir entre el sistema inglés y el métrico como: (lb ai/ac) multiplicado por 1,12 = (kg ai/ha) y (kg ai/ha) multiplicado por 0,89 = (lb ai/ac).

Tabla 2: Herbicidas PPO ejemplares

Herbicida PPO	Familia química	tasa 1X
acifluorfen	Difeniléteres	420 g ai/ha
fomesafen	Difeniléteres	420 g ai/ha
lactofen	Difeniléteres	7-220 g ai/ha
fluoroglicofeno-etilo	Difeniléteres	15- 40 g ai/ha
oxifluorfen	Difeniléteres	0.28-2,24 kg ai/ha
flumioxazina	N-fenilftalimida	70 g ai/ha
azafenidina	Triazolinona	240 g ai/ha
carfentrazona-etilo	Triazolinona	4-36 g ai/ha
sulfentrazona	Triazolinona	0.1-0,42 kg ai/ha
flutiacet-metil	Tiadiazol	3-15 g ai/ha
oxadiargilo	Oxadiazol	50-150 g ai/ha
oxadiazon	Oxadiazol	2.24-4,48 kg ai/ha
piraflufeno-etilo	Fenilpirazol	6-12 g ai/ha
saflufenacil	Pirimidina diona	25- 50 g/ha
S-3100	Pirimidina diona	5- 80 g/ha

Las aplicaciones herbicidas pueden ser secuenciales, o mezcladas en tanque con uno, dos, o una combinación de varios herbicidas PPO o cualquier otro herbicida compatible. Se pueden utilizar aplicaciones múltiples de un herbicida o de dos o más herbicidas, en combinación o solos, durante una temporada de crecimiento en áreas que comprenden plantas transgénicas de la invención para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas, monocotiledóneas, o ambas, por ejemplo, dos aplicaciones (tal como una aplicación previa a la plantación y una aplicación posterior a la emergencia o una aplicación previa a la emergencia y una aplicación posterior a la emergencia) o tres aplicaciones (tal como una aplicación previa a la plantación, una aplicación previa a la emergencia y una aplicación posterior a la emergencia o una aplicación previa a la emergencia y dos aplicaciones posteriores a la emergencia).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "tolerancia" o "tolerancia a herbicidas" significa la capacidad de una planta, semilla o célula para resistir los efectos tóxicos de un herbicida cuando se aplica. Los cultivos tolerantes a herbicidas pueden seguir creciendo y no se ven afectados o se ven mínimamente afectados por la presencia del producto químico aplicado. Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "rasgo de tolerancia a herbicidas" es un rasgo transgénico que confiere a una planta una tolerancia mejorada a herbicidas en comparación con la planta de tipo salvaje. Las plantas contempladas que podrían producirse con un rasgo de tolerancia a herbicidas de la presente invención podrían incluir, por ejemplo, cualquier planta, incluidas plantas de cultivo tales como el haba de soja (*por ejemplo, Glycine max*), el maíz, el algodón (*Gossypium sp.*) y la colza, entre otras.

Las plantas transgénicas, la progenie, las semillas, las células vegetales y las partes de plantas de la invención también pueden contener uno o más rasgos transgénicos adicionales. Pueden introducirse rasgos transgénicos adicionales cruzando una planta que contenga un transgén que comprenda las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención con otra planta que contenga uno o más rasgo(s) transgénico(s) adicional(es). En la presente memoria descriptiva, por "cruce" se entiende la reproducción de dos plantas individuales para producir una planta progenitora. Así, dos plantas transgénicas pueden cruzarse para producir una progenie que contenga los rasgos transgénicos de cada progenitor. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "progenie" significa la descendencia de cualquier generación de una planta madre, y la progenie transgénica comprende una construcción de ADN proporcionada por la invención y heredada de al menos una planta madre. Alternativamente, el rasgo o rasgos transgénicos adicionales pueden introducirse por medio de la cotransformación de una construcción de ADN para ese rasgo o rasgos transgénicos adicionales con una construcción de ADN que comprenda las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención (por ejemplo, con todas las construcciones de ADN presentes como parte del mismo vector utilizado para la transformación de la planta) o insertando el rasgo o rasgos adicionales en una planta transgénica que comprenda una construcción de ADN proporcionada por la invención o *viceversa* (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los procedimientos de transformación de plantas o edición de genes en una planta o célula vegetal transgénica). Dichos rasgos transgénicos adicionales incluyen, entre otros, una mayor resistencia a los insectos, una mayor eficiencia en el uso del agua, un mayor rendimiento, una mayor resistencia a la sequía, una mayor calidad de las semillas, una mejor calidad nutricional, la producción de semillas híbridas y la tolerancia a los herbicidas, en los que el rasgo se mide con respecto a una planta de tipo salvaje. Los rasgos adicionales ejemplares de tolerancia a herbicidas pueden incluir tolerancia transgénica o no transgénica a uno o más herbicidas tales como inhibidores de ACCasa (por ejemplo ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanediones), Inhibidores de la ALS (por ejemplo sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopyrimidinas y triazolinonas) inhibidores de la EPSPS (por ejemplo glifosato), auxinas sintéticas (por ejemplo fenoxis, ácidos benzoicos, ácidos carboxílicos, semicarbazonas) inhibidores de la fotosíntesis (por ejemplo triazinas, triazinonas, nitrilos, benzotiadiazoles y ureas), inhibidores de la síntesis de glutamina (por ejemplo glufosinato), inhibidores de la HPPD (por ejemplo isoxazoles, pirazolonas y triketonas), Inhibidores de la PPO (por ejemplo, difeniléteres, N-fenilftalimida, aril triazinonas y pirimidinedionas) e inhibidores de ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo, cloroacetamidas, oxiacetamidas y pirazoles), entre otros. Los rasgos ejemplares de resistencia a insectos pueden incluir la resistencia a uno o más insectos de uno o más de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera y Homoptera, entre otros. Tales rasgos transgénicos adicionales son conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo, el Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proporciona una lista de tales rasgos.

Una célula transformada con un polinucleótido de la presente invención, tal como una construcción de expresión, puede seleccionarse para la presencia del polinucleótido o su actividad enzimática codificada antes o después de regenerar dicha célula en una planta transgénica. Las plantas transgénicas que comprenden dicho polinucleótido pueden así seleccionarse, por ejemplo, identificando una planta transgénica que comprenda el polinucleótido o la actividad enzimática codificada, y/o muestre un rasgo alterado en relación con una planta de control isogénica. Dicho rasgo puede ser, por ejemplo, la tolerancia a un herbicida PPO.

Las plantas transgénicas y la progenie que contienen un rasgo transgénico proporcionado por la invención pueden utilizarse con cualquier procedimiento de mejora conocido en la técnica. En las líneas de plantas que comprenden dos o más rasgos transgénicos, los rasgos transgénicos pueden segregarse independientemente, estar ligados, o una combinación de ambos en líneas de plantas que comprenden tres o más rasgos transgénicos. También se contempla el retrocruzamiento con una planta parental y el retrocruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Las descripciones de los procedimientos de mejora que se utilizan para diferentes rasgos y cultivos son bien conocidas por los expertos en la materia. Para confirmar la presencia del transgén o transgenes en una planta o semilla concreta, pueden realizarse diversos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de biología molecular, tales como Southern y northern blotting, PCR y secuenciación de ADN; ensayos bioquímicos,

tales como la detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISAs y manchas occidentales) o por función enzimática; ensayos de partes de la planta, tales como ensayos de hojas o raíces; y también, analizando el fenotipo de toda la planta.

5 La introgresión de un rasgo transgénico en un genotipo vegetal se consigue como resultado del procedimiento de retroconversión. Un genotipo vegetal en el que se ha introgresado un rasgo transgénico puede denominarse genotipo retrocruzado, línea, endogamia o híbrido. Del mismo modo, un genotipo vegetal que carece del rasgo transgénico deseado puede denominarse genotipo no transgénico, línea, endogamia o híbrido.

10 Habiendo descrito la invención en detalle, será evidente que son posibles modificaciones, variaciones y realizaciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas. Además, debe apreciarse que los ejemplos de la presente divulgación se proporcionan como ejemplos no limitativos.

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar realizaciones de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún así obtener un resultado igual o similar. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden ser sustituidos por los agentes descritos en la presente memoria descriptiva con el mismo o similar resultado logrado.

Ejemplo 1: Descubrimiento de la protoporfirinógeno oxidasa microbiana

20 Se identificaron nuevas protoporfirinógeno oxidasas a partir de bases de datos de secuencias microbianas mediante el uso de procedimientos bioinformáticos y un nuevo sistema de cribado bacteriano de protoporfirinógeno oxidasa. Se utilizaron tres secuencias que representan una gama diversa de protoporfirinógeno oxidasas microbianas HemY y la secuencia de la protoporfirinógeno oxidasa HemY sensible a herbicidas PPO de *Arabidopsis thaliana* para identificar
25 nuevas secuencias putativas de protoporfirinógeno oxidasas a partir de bases de datos de secuencias microbianas. El uso de estas cuatro secuencias diversas con herramientas bioinformáticas permitió sesgar los resultados de la búsqueda hacia secuencias más similares a las protoporfirinógeno oxidasas microbianas que a las protoporfirinógeno oxidasas vegetales, a fin de aumentar la probabilidad de identificar protoporfirinógeno oxidasas tolerantes a herbicidas PPO.

30 Noventa y nueve protoporfirinógeno oxidasas putativas de la familia HemY PPO fueron identificadas mediante el uso de este procedimiento. Las secuencias que codifican estas enzimas putativas HemY PPO se compararon por medio del mapeo de árboles filogenéticos. Se seleccionaron 44 enzimas putativas HemY PPO para su posterior análisis debido a su representación de miembros individuales únicos agrupados en el árbol filogenético. Las secuencias de codificación de las cuarenta y cuatro enzimas PPO HemY putativas seleccionadas se clonaron en vectores de
35 expresión bacteriana para su análisis en un cribado de hemG de bloqueo en *E. coli* que se describe a continuación.

Se creó un sistema de cribado bacteriano de protoporfirinógeno oxidasa para probar la actividad protoporfirinógeno oxidasa de proteínas recombinantes. Este sistema de cribado utilizó un ensayo de rescate funcional en una cepa de *E. coli* que contenía un gen de bloqueo para la enzima PPO de *E. coli* (HemG; SEQ ID NO: 76. La cepa *E. coli hemG* de bloqueo mostró un crecimiento mínimo en medios bacterianos clásicos (por ejemplo, medio LB), pero las tasas de crecimiento se recuperaron cuando el medio bacteriano se suplementó con hemo libre o cuando se
40 expresó una protoporfirinógeno oxidasa recombinante en la *E. coli*. Así pues, la cepa *E. coli hemG* de bloqueo podría utilizarse con la expresión de proteínas recombinantes para ensayar de forma rápida y sencilla la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa en proteínas.

La cepa *E. coli hemG* de bloqueo se transformó con los vectores de expresión bacteriana que contenían las
45 protoporfirinógeno oxidasas putativas y se sembró en medio LB. Las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* y se midieron las tasas de crecimiento. El crecimiento de la cepa *E. coli* transformada con *hemG* de bloqueo en medio LB indicó una secuencia de aminoácidos que confirmó que se trataba de una protoporfirinógeno oxidasa funcional. Gracias a este ensayo, es posible analizar un gran número de proteínas nuevas o de ingeniería para confirmar y medir la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa. Diez de las cuarenta y cuatro nuevas enzimas PPO
50 putativas rescataron la cepa *E. coli hemG* de bloqueo, confirmando su actividad como protoporfirinógeno oxidasas, y fueron seleccionadas para su posterior caracterización. La Tabla 3 proporciona los SEQ ID NOs correspondientes a las diez variantes de PPO HemY seleccionadas, la HemG de *E. coli* y la PPO de *A. tuberculatus*.

55

Tabla 3. SEQ ID NOs correspondientes a variantes de HemY PPO

PPO	Proteína	ADN bacteriano	Codón optimizado para dicotiledóneas	Codón optimizado para monocotiledóneas
R2N30	1,6	26	31,36	47
R2N40	2, 7, 8, 9,10,11, 12	27	32, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46	48
R2N70	3	28	33	49
R2N90	4	29	34	50
R2N100	5	30	35	51
R1N473	13, 18, 22	52	57, 68, 72	63
R1N533	14, 19, 23	53	58, 69, 73	64
R1N171	15, 20, 24	54	59, 70, 74	65
R1N311	16	55	60	66
R1N333	17, 21, 25	56	61, 62, 71, 75	67
<i>E. coli</i> HemG	76	77	78	79
<i>A. tuberculatus</i>	80	81	n/a	n/a

[con R2N40, R2N70, R2N90, R2N100, R1N473, R1N533, R1N171, R1N311, R1N333, *E. coli* HemG, *A. tuberculatus*, que no forman parte de la invención, sólo como referencia]

Ejemplo 2: Insensibilidad al inhibidor de la protoporfirinógeno oxidasa

- 5 Se identificaron nuevas protoporfirinógeno oxidasas tolerantes a herbicidas PPO mediante el uso de un sistema de cribado bacteriano de herbicidas. Este sistema de cribado utilizó un ensayo de crecimiento de la cepa *E. coli* hemG de bloqueo en medio líquido LB suplementado con un herbicida PPO para identificar protoporfirinógeno oxidasas que no fueran sensibles al herbicida PPO.

- 10 La cepa *E. coli* hemG de bloqueo se transformó con los vectores de expresión bacteriana que contenían las protoporfirinógeno oxidasas confirmadas y se cultivó en medio líquido LB. Se añadió al medio una cantidad saturante de la forma cristalina purificada de uno de los cinco herbicidas PPO diferentes (acifluorfen, flumioxazina, lactofeno, fomesafeno y S-3100), que representan tres subclases químicas de PPO diferentes. Se expresaron las proteínas recombinantes y se midieron las tasas de crecimiento de *E. coli*. Se midieron las curvas de crecimiento (OD600) de las diferentes variantes en presencia y ausencia de los herbicidas PPO en puntos temporales seleccionados (*por ejemplo*, ocho horas). El crecimiento de una cepa *E. coli* hemG de bloqueo transformada en medio LB en presencia de un herbicida PPO indica una protoporfirinógeno oxidasa que es una protoporfirinógeno oxidasa insensible a los herbicidas (iPPO).

- 15 Las nuevas protoporfirinógeno oxidasas putativas se utilizaron con este ensayo para comprobar la insensibilidad a los herbicidas PPO. Expresión de *E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76), HemY PPO R1N473 (SEQ ID NO: 13), HemY PPO R1N533 (SEQ ID NO: 14); o HemY PPO R1N171 (SEQ ID NO: 15) confirieron tasas de crecimiento normales a la cepa *E. coli* hemG de bloqueo en medios mínimos en presencia de los herbicidas PPO acifluorfen, flumioxazina, lactofeno o fomesafeno, indicando por tanto que estas proteínas eran protoporfirinógeno oxidasas (iPPO) altamente insensibles a los herbicidas. Los datos figuran en la figura 1. Las bacterias transformadas con construcciones que codifican HemY PPO R1 N311 (SEQ ID NO:16) o HemY PPO R1 N333 (SEQ ID NO:17) no crecieron en presencia de acifluorfen, flumioxazina, lactofeno o fomesafeno, lo que indica que estas proteínas no conferían tolerancia a ninguno de estos cuatro herbicidas PPO. La expresión de HemY R2N30 (SEQ ID NO:1) o Hem Y R2N40 (SEQ ID NO:2; no forma parte de la invención) confirió tasas de crecimiento normales a la cepa *E. coli* hemG de bloqueo en medios mínimos en presencia de acifluorfen y S-3100, pero a niveles más altos estas dos enzimas mostraron sensibilidad a ambos herbicidas. La tasa de crecimiento fue más lenta para la cepa de *E. coli* hemG de bloqueo que contenía HemY R2N70 (SEQ ID NO:3; no forma parte de la invención), HemY R2N90 (SEQ ID NO:4; no forma parte de la invención), o HemY R2N100 (SEQ ID NO:5; no forma parte de la invención), pero la tolerancia al acifluorfen y S-3100 fue mucho mejor que para la cepa de *E. coli* hemG de bloqueo que contenía el R2N30 (SEQ ID NO:1) y el R2N40 (SEQ ID NO:2; no forma parte de la invención) *E. coli* que contenía R2N30 (SEQ ID NO:1) y R2N40 (SEQ ID NO:2; no forma parte de

la invención). Los datos figuran en la figura 2. La cepa *E. coli* hemG de bloqueo que expresa la PPO de *A. tuberculatus* (SEQ ID NO:80) se utilizó como control negativo y fue sensible a todos los herbicidas PPO. Por medio de este ensayo, se puede analizar un gran número de proteínas nuevas o de ingeniería para confirmar la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa en presencia de herbicida(s) PPO.

5 **Ejemplo 3: Ensayo enzimático de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)**

Las nuevas protoporfirinógeno oxidasas se caracterizaron por medio de un ensayo enzimático. Este ensayo utilizó proteínas PPO HemY recombinantes con extracto de plastidios de plantas y sustrato PPO para identificar protoporfirinógeno oxidasas que tuvieran actividad en presencia de un herbicida PPO.

El extracto de plástidos vegetales se produjo mediante el uso de etioplastos y cloroplastos que se prepararon a partir de cotiledones etiolados (haba de soja, *Glycine max*), hojas/coleoptilos etiolados (maíz, *Zea mays*) y hojas apicales desplegadas (*A. tuberculatus*) generalmente por medio del procedimiento descrito por Grossmann (2010). Las semillas de haba de soja (A3555) y maíz (LH244) se colocaron entre dos hojas de papel de germinación húmedo (Anchor Paper Company, Saint Paul, Minnesota) en un vaso de precipitados con agua en oscuridad continua durante ocho a diez días. Las plantas de *A. tuberculatus* se cultivaron durante 30 días en el invernadero. Se recogieron los tejidos, se colocaron entre hojas húmedas de toallas de papel y se trituraron hasta obtener un polvo fino con un mortero en nitrógeno líquido. Se añadió tampón de homogeneización (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 1 mM de cloruro de magnesio y 2 g/litro de albúmina de suero bovino) al polvo congelado en una proporción de 4:1 (ml de tampón de homogeneización por g de tejido en peso fresco), se mezcló enérgicamente y se filtró a través de cuatro capas de Miracloth previamente humedecido. El filtrado se centrifugó a 9299g durante cinco minutos. El pellet se resuspendió en tampón de homogeneización y se centrifugó a 150 g durante dos minutos. La solución sobrenadante se centrifugó a 4000 g durante quince minutos. Todas las etapas de centrifugación se realizaron a 4°C. El precipitado (fracción plastidial intacta) se resuspendió en 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA y 20% (v/v) de glicerina y se almacenó en alícuotas a -80°C. La proteína total en las preparaciones de plástidos se midió por el procedimiento de Bradford (1976) con albúmina sérica bovina como patrón.

Las enzimas PPO recombinantes se expresaron en la línea celular *E. coli* HemG de bloqueo y se extrajeron para el ensayo enzimático. Las células bacterianas de un cultivo de una noche se utilizaron para inocular 20 ml de medio fresco. Estos cultivos se dejaron crecer durante aproximadamente 48 h a 20 °C hasta obtener un cultivo denso. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación y los pellets celulares se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron los ensayos enzimáticos. Los gránulos bacterianos congelados se resuspendieron en tampón de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA y 1 mM MgCl₂) y se sometieron a sonicación (Sonics VibraCell™) durante 30 segundos en un baño de hielo con un minuto de descanso entre ciclos. Para *E. coli* transformada con una construcción que codifica *E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76) las células rotas se centrifugaron a 200g durante 2 minutos a 4°C y la solución sobrenadante se utilizó para los ensayos de la enzima PPO tras diluirla con tampón de extracción. Los sedimentos celulares congelados preparados a partir de bacterias transformadas con una construcción que codifica R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N30 (SEQ ID NO:1), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) se centrifugaron a 9400g durante 10 minutos a 4°C, [sin que R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) formaran parte de la invención]. La fracción de pellets de esta solución sobrenadante se preparó por medio de ultracentrifugación a 100.000 g durante una hora a una temperatura comprendida entre 4 °C y 7 °C y se resuspendió en tampón de extracción para los ensayos de PPO. La proteína total se midió por el procedimiento de Bradford (1976) con albúmina sérica bovina como patrón.

El sustrato de la PPO protoporfirinógeno IX (protógeno) se preparó por medio de la reducción de protoporfirina disponible comercialmente con amalgama de mercurio sódico de acuerdo con lo descrito por Jacobs y Jacobs (1999). Se añadió protoporfirina (proto) a hidróxido potásico 0,01N en etanol al 20% y se agitó en la oscuridad hasta que se disolvió (unos 40 minutos). Se colocó un volumen de 0,8 ml de proto en un vial de polipropileno de 2 ml con tapón de rosca y junta tórica, y se añadió aproximadamente 1 g (una punta de espátula, escurrido el aceite) de amalgama sódica de mercurio (número de producto 451908, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, almacenada en aceite). Se tapó el tubo, se mezcló enérgicamente con un mezclador vorticial y se purgó cada 30 segundos aflojando el tapón hasta que la solución dejó de presentar fluorescencia roja bajo una luz ultravioleta (unos cinco minutos). El vial de reacción se enjuagó con argón y se centrifugó brevemente para precipitar la amalgama de sodio restante. La solución sobrenadante se diluyó 1:1 (v/v) con una solución de DTT 0,1M y Tris-HCl 0,5M, pH 7,5 y se enjuagó el vial con argón. La solución protogénica se dividió en alícuotas más pequeñas en tubos con tapón de polipropileno de 0,5 ml que se lavaron con argón inmediatamente después de añadir la alícuota. Los tubos tapados se cubrieron con papel de aluminio y se almacenaron a -80°C. Para el ensayo enzimático, las alícuotas de protógeno descongeladas se almacenaron cubiertas en hielo y se utilizaron el mismo día. La concentración de protógeno en la preparación se calculó restando la concentración de protógeno, medida por HPLC de fluorescencia (procedimiento descrito por Matsumoto, 1994), en la solución final de protógeno (normalmente alrededor del 1% del material de partida) de la concentración de protógeno en el material de partida y asumiendo que no hay impurezas significativas en ninguna de las muestras. El protógeno preparado y almacenado en estas condiciones era estable al menos seis meses.

Se realizó un ensayo enzimático de PPO para medir la actividad de PPO mediante el uso de las preparaciones de extracto plastidial vegetal y extracto bacteriano con el sustrato de PPO. La actividad de la PPO se midió en general de acuerdo con lo descrito por Grossmann (2010). Diez microlitros de extracto de plástidos (40 µg de proteína total) o de extracto bacteriano (1,1 µg de proteína total para *E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76); o 45 a 70 µg de proteína total para R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N30 (SEQ ID NO:1), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) [con R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) no forman parte de la invención]) se añadió al tampón de ensayo (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM DTT, 1 mM EDTA y 0,085% (v/v) Tween 80) con tampón o con S-3100 (añadido en un volumen de dos microlitros a partir de una solución madre 100X preparada en acetona). El S-3100 de calidad analítica fue suministrado por Sumitomo Chemical Company. Todos los ensayos se realizaron en una concentración final de acetona al 1% (v/v). Los extractos (plastidial o bacteriano), el tampón y el S-3100 se incubaron a 30°C (extractos vegetales) o 37°C (extractos bacterianos) durante cinco minutos antes de añadir dos microlitros de protógeno para iniciar el ensayo. Todos los ensayos se realizaron en una placa de microtitulación de poliestireno negro de 96 pocillos (Costar® 3925, Corning, Inc., Corning, Nueva York) a un volumen final de 200 microlitros. Tras añadir el antígeno (3 µM para las mediciones de IC₅₀; variable para las mediciones de K_m) a todos los pocillos, la placa se incubó a 30°C (extractos vegetales) o 37°C (extractos bacterianos) antes de iniciar la recogida de datos. La fluorescencia a lo largo del tiempo se midió a 30 °C (extractos vegetales) o 37 °C (extractos bacterianos) con longitudes de onda de excitación y emisión de 405 nm y 630 nm, respectivamente, en un lector de microplacas multimodo SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, California). Se realizó un ensayo en blanco añadiendo extracto inactivado por calor (cinco minutos a 100°C) a la mezcla de ensayo. Los valores K_m aparentes de la PPO se calcularon por medio del ajuste de curvas rectangulares de hipérbola mediante el uso del paquete de software de cinética SoftPro® (Molecular Devices, Sunnyvale, California). Los valores IC₅₀ de S-3100 se determinaron gráficamente a partir del diagrama semilogarítmico de la concentración de S-3100 frente a la actividad de PPO.

La afinidad de unión del sustrato (protoporfirinógeno) se midió como la K_m. La sensibilidad de la actividad enzimática al herbicida PPO S-3100 se midió como la concentración que da una inhibición del 50% de la actividad de control (IC₅₀). La K_m para las enzimas PPO vegetales (*A. tuberculatus*, haba de soja o maíz) y las enzimas PPO bacterianas (*E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76), R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N30 (SEQ ID NO:1), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) [con *E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76), R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N40 (SEQ ID NO:2), R2N90 (SEQ ID NO:4), o R2N100 (SEQ ID NO:5) que no forman parte de la invención]) fueron similares, oscilando entre 0,7 µM y 2,0 µM. Cada una de las tres enzimas PPO de la planta fue sensible a S-3100 con un IC₅₀ de 0,003 a 0,009 µM. Las enzimas PPO bacterianas R2N30 (SEQ ID NO:1) y R2N40 (SEQ ID NO:2) tenían un IC₅₀ de 0,02 µM y 0,04 µM, respectivamente, y eran 10 veces menos sensibles al herbicida que las enzimas PPO vegetales. Las enzimas PPO bacterianas *E. coli* HemG (SEQ ID NO: 76), R1N473 (SEQ ID NO:13), R1N171 (SEQ ID NO:15), R1N533 (SEQ ID NO:14), R2N90 (SEQ ID NO:4), y R2N100 (SEQ ID NO:5) [sin que todos los anteriores formen parte de la invención] tuvieron un IC₅₀ superior a 100 µM y se midieron como insensibles al herbicida. Los datos están provistos en la Tabla 4.

Tabla 4: Actividad enzimática de la PPO

Fuente	K _m , µM	S-3100 IC ₅₀ , µM
<i>A. tuberculatus</i>	0,7	0,009
Haba de soja	1,8	0,004
Maíz	2,0	0,003
<i>E. coli</i> HemG	1,6	>100
R1N473	1,2	>100
R1N171	0,2	>100
R1N533	0,4	>100
R2N30	0,8	0,02
R2N40	0,8	0,04
R2N90	2,8	>100
R2N100	0,4	>100

Ejemplo 4: Optimización enzimática de las protoporfirinógeno oxidasas

La optimización de proteínas puede utilizarse para mejorar o alterar las propiedades enzimáticas de las protoporfirinógeno oxidasas. Pueden utilizarse uno o varios procedimientos de ingeniería de proteínas para optimizar las enzimas. Ejemplos no limitativos de enfoques de ingeniería de proteínas incluyen mutaciones de exploración de alanina; mutaciones de exploración de homología; mutaciones de exploración Pro/Gly; intercambios o mutaciones de regiones; y combinaciones de estas diversas técnicas (véase, M Lehmann y M Wyss, *Current Opinion in Biotechnology* 12(4):371-375 (2001); B Van den Burg y VGH Eijnsink, *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):333-337 (2002); y Weiss et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97(16):8950-8954 (2000)). Las secuencias de ácido nucleico de protoporfirinógeno oxidasa de ingeniería pueden sintetizarse y clonarse en un vector de expresión bacteriano y utilizarse para transformar la cepa *E. coli hemG* de bloqueo para el cribado inicial de rescate bacteriano de alto rendimiento, como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de ingeniería que rescatan la cepa *E. coli hemG* de bloqueo pueden someterse a un cribado de sensibilidad a uno o más herbicidas PPO mediante el uso del ensayo de crecimiento bacteriano descrito en el Ejemplo 2. Las proteínas de ingeniería que muestren tolerancia a los herbicidas PPO en el segundo cribado pueden expresarse entonces como proteína recombinante en un sistema de expresión bacteriana, y la caracterización enzimática puede realizarse mediante el uso de la proteína purificada como se describe en el Ejemplo 3. Las proteínas de ingeniería que son insensibles a los herbicidas PPO pueden seleccionarse para su clonación en vectores de transformación de plantas y esto puede utilizarse para producir plantas transgénicas para pruebas *in planta*.

Ejemplo 5: Expresión y ensayo de enzimas PPO en plantas de haba de soja

Las enzimas PPO HemY microbianas se expresaron en plantas de haba de soja transgénicas, y se analizó la tolerancia de las plantas transgénicas al herbicida PPO. Se produjo un conjunto de construcciones para el cribado de alto rendimiento con el mismo elemento promotor y 3' UTR enlazados operablemente a uno de los diez casetes diferentes que codifican las enzimas HemY PPO R1N171 (SEQ ID NO: 20); R1N473 (SEQ ID NO: 18); R1N533 (SEQ ID NO: 19); R2N30 (SEQ ID NO: 1, 6); R2N40 (SEQ ID NO: 2, 7); R2N40opt (SEQ ID NO: 9, 10-12); R2N70 (SEQ ID NO: 3); R2N90 (SEQ ID NO: 4); R2N100 (SEQ ID NO: 5); y R1N333 (SEQ ID NO: 21) [con R1N171 (SEQ ID NO: 20); R1N473 (SEQ ID NO: 18); R1N533 (SEQ ID NO: 19); R2N30 (SEQ ID NO: 6); R2N40 (SEQ ID NO: 2, 7); R2N40opt (SEQ ID NO: 9, 10-12); R2N70 (SEQ ID NO: 3); R2N90 (SEQ ID NO: 4); R2N100 (SEQ ID NO: 5); y R1N333 (SEQ ID NO: 21) que no forman parte de la invención] enlazados operablemente a uno de 39 péptidos de tránsito diferentes. Para la transformación en plantas, las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas HemY PPO se optimizaron en codones para la expresión en dicotiledóneas. Esto permitió comparar las siete enzimas HemY PPO con treinta y nueve péptidos diana diferentes, mediante el uso de el mismo promotor y los mismos elementos 3'UTR para la expresión génica.

Las construcciones de transformación vegetal se utilizaron para transformar embriones extirpados de haba de soja (germoplasma A3555) mediante el uso de *A. tumefaciens* y procedimientos estándar conocidos en la técnica. Se inocularon 400 explantes para cada construcción, lo que dio lugar a doce contenedores por construcción. Para las pruebas de tolerancia a herbicidas se utilizó una solución estéril de herbicida PPO. La solución herbicida consistió en 0,3 g de S-3100 en concentrado de aceite de cultivo (5,0 mL) y 495 mL de agua desionizada. Se filtró a través de una unidad de filtro de cultivo de tejidos Nalgene® Rapid-Flow™ de 0,45 micras y una unidad de filtro de membrana de acetato de celulosa sin tensioactivos (VWR, Radnor, PA, EE.UU.). La solución estéril resultante se agitó antes de su aplicación.

A las cinco semanas post-transformación, cuatro de los doce contenedores de plantas por construcción se rociaron con dos pasadas de la solución herbicida PPO estéril. A continuación, las plántulas tratadas se encerraron en el contenedor y recibieron al menos 15 horas diarias de exposición a la luz tras la pulverización durante cuatro días. Al final del cuarto día tras la aplicación de S-3100, se fotografiaron las plántulas tratadas y se puntuaron de acuerdo con una escala visual de coloración verde (la coloración verde era representativa del tejido fotosintético sano de la planta en comparación con el tejido fotoblanqueado) frente a los daños. Los valores de puntuación fueron 0 para mala tolerancia, alto daño, baja coloración verde; 1 para cierta tolerancia, daño medio, coloración verde moderada; y 2 para buena tolerancia, bajo daño, alta coloración verde. Los resultados de la aplicación del herbicida S-3100 a las cinco semanas se presentan en la Tabla 5, donde s.f. indica que no se realizó el análisis. Los resultados indicaron que en este cribado de alto rendimiento se obtuvieron varias construcciones que comprendían las enzimas HemY PPO R1N473 (SEQ ID NO: 18); R1N533 (SEQ ID NO: 19); R2N30 (SEQ ID NO: 1, 6); R2N40 (SEQ ID NO: 2, 7); R2N40opt (SEQ ID NO: 9, 10-12); y R2N70 (SEQ ID NO: 3) [con R1N473 (SEQ ID NO: 18); R1N533 (SEQ ID NO: 19); R2N30 (SEQ ID NO: 6); R2N40 (SEQ ID NO: 2, 7); R2N40opt (SEQ ID NO: 9, 10-12); y R2N70 (SEQ ID NO: 3) que no forman parte de la invención] proporcionaron tolerancia al herbicida PPO. Los resultados indicaron que en este cribado de alto rendimiento las enzimas HemY PPO R1N171 (SEQ ID NO: 20); R2N90 (SEQ ID NO: 4); R2N100 (SEQ ID NO: 5); y R1N333 (SEQ ID NO: 21) [sin que todas las anteriores formen parte de la invención] no proporcionaron tolerancia al herbicida PPO.

ES 2 979 026 T3

Tabla 5. Puntuación de tolerancia a S-3100 a las 5 semanas para HemY PPO

Péptido diana	R1N 171	R1N 473	R1N 533	R2N 30	R2N 40	R2N 40 opt	R2N 70	R2N 90	R2N 100	R1N 333
TP1	0	2	0	2	s.f.	1	s.f.	s.f.	0	s.f.
TP2	0	0	2	s.f.	s.f.	s.f.	2	0	0	0
TP3	0	1	0	1	s.f.	s.f.	1	s.f.	0	0
TP4	s.f.	1	0	2	s.f.	0	0	s.f.	0	0
TP5	1	s.f.	s.f.	s.f.	1	1	s.f.	0	0	s.f.
TP6	s.f.	1	1	s.f.	s.f.	1	0	s.f.	0	0
TP7	0	1	0	1	s.f.	2	s.f.	s.f.	s.f.	0
TP8	1	1	s.f.	2	0	1	0	1	1	0
TP9	1	1	s.f.	2	0	0	s.f.	1	s.f.	1
TP10	1	1	1	2	s.f.	s.f.	s.f.	0	1	s.f.
TP11	0	0	0	2	s.f.	1	s.f.	s.f.	s.f.	0
TP12	0	1	0	1	s.f.	2	s.f.	1	0	1
TP13	0	0	0	s.f.	s.f.	0	s.f.	0	s.f.	0
TP14	s.f.	1	1	1	s.f.	s.f.	s.f.	0	1	0
TP15	1	1	1	2	s.f.	1	s.f.	s.f.	0	0
TP16	1	1	2	2	s.f.	1	0	0	s.f.	0
TP17	0	1	s.f.	1	s.f.	1	s.f.	s.f.	0	0
TP18	0	0	0	1	s.f.	0	s.f.	1	1	0
TP19	1	0	1	s.f.	2	1	s.f.	1	1	0
TP20	0	1	1	2	s.f.	1	s.f.	0	s.f.	s.f.
TP21	0	0	s.f.	1	s.f.	s.f.	0	1	0	0
TP22	s.f.	1	2	1	s.f.	s.f.	s.f.	0	0	0
TP23	1	1	1	1	s.f.	s.f.	s.f.	1	0	1
TP24	s.f.	0	2	2	s.f.	s.f.	s.f.	0	0	0
TP25	0	1	0	2	s.f.	1	s.f.	s.f.	0	0
TP26	1	0	1	1	s.f.	1	s.f.	s.f.	1	0
TP27	0	1	0	s.f.	s.f.	2	s.f.	0	0	1
TP28	0	2	0	2	s.f.	s.f.	s.f.	0	1	0
TP29	0	0	1	1	s.f.	0	s.f.	0	0	1
TP30	1	1	s.f.	1	s.f.	0	s.f.	0	0	0
TP31	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
TP32	0	1	1	1	s.f.	0	s.f.	0	0	0
TP33	0	2	0	s.f.	2	1	0	0	0	0

TP34	s.f.	s.f.	s.f.	0	1	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	1
TP35	0	0	1	1	1	1	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP36	s.f.	s.f.	0	1	1	s.f.	s.f.	s.f.	0	1
TP37	0	0	0	1	1	2	s.f.	s.f.	0	s.f.
TP38	s.f.	s.f.	2	s.f.	2	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP39	1	1	2	1	2	1	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.

Las plantas de los contenedores no rociados correspondientes a las construcciones con una puntuación de aprobación alta de 2 y algunos fallos como controles negativos se trasplantaron aproximadamente a las 7 semanas tras la transformación. Las plantas R0 se cultivaron en un invernadero en condiciones de vivero de día largo (18 h de luz a 27 °C y 6 h de oscuridad a 24 °C) durante aproximadamente cuatro semanas. A las once semanas, las plantas R0 se rociaron con dos pasadas de la misma solución herbicida (0,3 g de S-3100) descrita anteriormente. Los índices de daños por herbicidas se recogieron siete días después del tratamiento. Cualquier índice de daño igual o superior al 30% era equivalente a los índices de daño del haba de soja no transgénica. Los resultados de la aplicación de tolerancia al herbicida a las once semanas a las plantas R0 se presentan en la Tabla 6, donde s.f. indica que no se realizó el análisis. Los resultados indicaron que las plantas que expresan una serie de construcciones que comprenden las enzimas HemY PPO R2N30 (SEQ ID NO:1, 6); R2N40 (SEQ ID NO:2, 7); y R2N40opt (SEQ ID NO:9, 10-12) [con R2N30 (SEQ ID NO: 6); R2N40 (SEQ ID NO:2, 7); y R2N40opt (SEQ ID NO:9, 10-12) que no forman parte de la invención] proporcionaron tolerancia al herbicida PPO con un índice de daño inferior al control no transgénico. Plantas que expresan la enzima HemY PPO R2N30 (SEQ ID NO:1, 6) [con R2N30 (SEQ ID NO: 6) que no forma parte de la invención] proporcionó tolerancia a herbicidas en 16 de las 19 construcciones ensayadas, con índices de daño para estas construcciones del 7% al 25%. Las plantas que expresan las enzimas HemY PPO R2N40 (SEQ ID NO:2, 7) y R2N40opt (SEQ ID NO:9, 10-12) [todas las anteriores no forman parte de la invención] proporcionaron tolerancia a herbicidas en 8 de las 11 construcciones ensayadas, con índices de daño para estas construcciones del 20% al 25%. Los resultados indicaron que en este cribado de alto rendimiento las plantas que expresaban las enzimas HemY PPO R1N171 (SEQ ID NO:20); R1N473 (SEQ ID NO:18); R1N533 (SEQ ID NO:19); R2N70 (SEQ ID NO:3); y R1N333 (SEQ ID NO:21) tenían un índice de daño del 30% o superior equivalente a los índices de daño de los controles no transgénicos y, por tanto, no proporcionaban tolerancia al herbicida PPO.

Tabla 6. Puntuación de tolerancia a S-3100 a las 11 semanas para HemY PPO

Péptido diana	R1N 171	R1N 473	R1N 533	R2 N30	R2 N40	R2 N40opt	R2 N70	R1N 333
TP1	s.f.	30	s.f.	17	s.f.	20	s.f.	s.f.
TP2	s.f.	s.f.	40	s.f.	s.f.	s.f.	30	s.f.
TP3	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP4	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP5	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP6	s.f.	35	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP7	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	30	s.f.	s.f.
TP8	s.f.	s.f.	s.f.	35	s.f.	30	s.f.	35
TP9	s.f.	s.f.	s.f.	20	s.f.	25	s.f.	35
TP10	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP11	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP12	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	35	s.f.	s.f.
TP13	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP14	s.f.	s.f.	s.f.	20	s.f.	s.f.	s.f.	35

ES 2 979 026 T3

TP15	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP16	30	40	35	35	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP17	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP18	s.f.	s.f.	s.f.	15	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP19	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	20	s.f.	s.f.	s.f.
TP20	s.f.	s.f.	s.f.	15	s.f.	20	s.f.	s.f.
TP21	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP22	s.f.	s.f.	35	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP23	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP24	s.f.	s.f.	35	15	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP25	s.f.	s.f.	s.f.	7	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP26	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP27	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.
TP28	s.f.	35	s.f.	35	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP29	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP30	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP31	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP32	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP33	s.f.	40	s.f.	s.f.	20	s.f.	s.f.	s.f.
TP34	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP35	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP36	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.
TP37	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	25	s.f.	s.f.
TP38	s.f.	s.f.	35	s.f.	25	s.f.	s.f.	s.f.
TP39	s.f.	30	35	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.	s.f.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal unido operablemente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con la longitud completa de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y en el que la proteína tiene actividad protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que:
 - (a) la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 26, 31, y 47.
 - (b) la proteína comprende SEQ ID NO: 1; o
 - (c) la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una molécula de ADN que codifica una secuencia diana que funciona para localizar una proteína operativamente unida dentro de una célula.
3. Una construcción de ADN que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 o 2.
4. Un polipéptido recombinante que comprende al menos un 99% de identidad de secuencia con la longitud completa de SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido recombinante mantiene al menos parte de su actividad protoporfirinógeno oxidasa en presencia de uno o más herbicida(s) PPO mostrando la capacidad de catalizar la oxidación de seis electrones del protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX y (i) es 10 veces menos sensible al herbicida que las enzimas PPO de las plantas, o (ii) muestra una tasa de lesión del 7%-25% en comparación con las plantas que no contienen el polipéptido recombinante.
5. Una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 o 2 o el polipéptido recombinante de la reivindicación 4.
6. La planta, semilla, célula o parte de planta transgénica de la reivindicación 5, en la que la planta, semilla, célula o parte de planta transgénica comprende un rasgo transgénico adicional de tolerancia a herbicidas.
7. Un procedimiento para conferir tolerancia al herbicida PPO a una planta, semilla, célula o parte de planta que comprende: expresar heterológicamente en dicha planta, semilla, célula o parte de planta el polipéptido recombinante de la reivindicación 4.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha planta, semilla, célula o parte de planta comprende actividad protoporfirinógeno oxidasa conferida por el polipéptido recombinante o en el que la tolerancia a herbicidas es a al menos un herbicida PPO seleccionado del grupo que consiste en: acifluorfenol a una tasa de aplicación de 420 g ai/ha, fomesafenol a una tasa de aplicación de 420 g ai/ha, lactofenol a una tasa de aplicación entre 7-220 g ai/ha, fluoroglicofenol-etilo a una tasa de aplicación de 15-40 g ai/ha, oxifluorfenol a una tasa de aplicación de 0.28 g - 2.24 kg ai/ha, flumioxazina en una dosis de 70 g ai/ha, azafenidina en una dosis de 240 g ai/ha, carfentrazona-etilo en una dosis de 4-36 g ai/ha, sulfentrazona en una dosis de 0,1-0.42 kg ai/ha, fluciacet-metilo a una dosis de 3-15 g ai/ha, oxadiargilo a una dosis de 50-150 g ai/ha, oxadiazón a una dosis de 2,24-4,48 kg ai/ha, piraflufeno-etilo a una dosis de 6-12 g ai/ha, saflufenacil a una dosis de 25-50 g ai/ha y S-3100 a una dosis de 5-80 g ai/ha.
9. Un procedimiento de transformación de plantas, que comprende las etapas de:
 - (a) introducir la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en una célula vegetal; y
 - (b) regenerar a partir de ella una planta que contenga la molécula de ADN recombinante.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además el etapa de seleccionar una planta tolerante al menos a un herbicida PPO.
11. Un procedimiento para controlar las malas hierbas en un área de crecimiento vegetal, que comprende poner en contacto un área de crecimiento vegetal que comprende la planta o semilla transgénica de la reivindicación 5 con al menos un herbicida PPO, en el que la planta o semilla transgénica es tolerante al herbicida PPO y en el que al menos una primera mala hierba es controlada en el área de crecimiento vegetal por el herbicida PPO.
12. Un procedimiento de cribado para un gen de tolerancia a herbicidas que comprende:
 - (a) expresar la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en una célula vegetal; y
 - (b) identificar una célula vegetal que muestre tolerancia a un herbicida PPO.
13. Un procedimiento para reducir el desarrollo de malas hierbas tolerantes a herbicidas que comprende:
 - (a) cultivar en un medio de cultivo una planta de acuerdo con la reivindicación 5 que comprenda un rasgo transgénico adicional de tolerancia a herbicidas; y
 - (b) aplicar un herbicida PPO y al menos otro herbicida al entorno de crecimiento del cultivo, en el que la planta de cultivo es tolerante al herbicida PPO y al menos a otro herbicida.

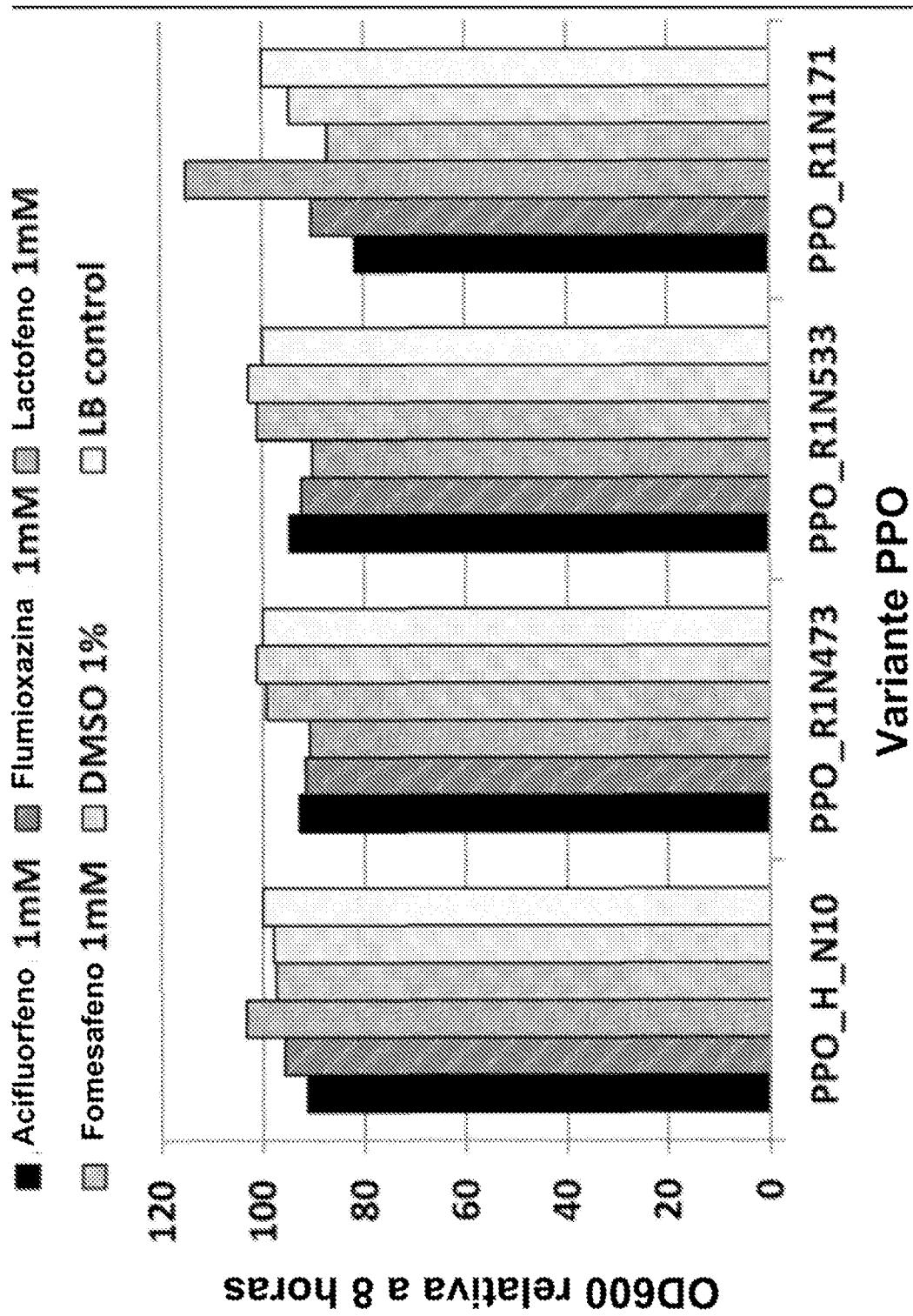


Figura 1

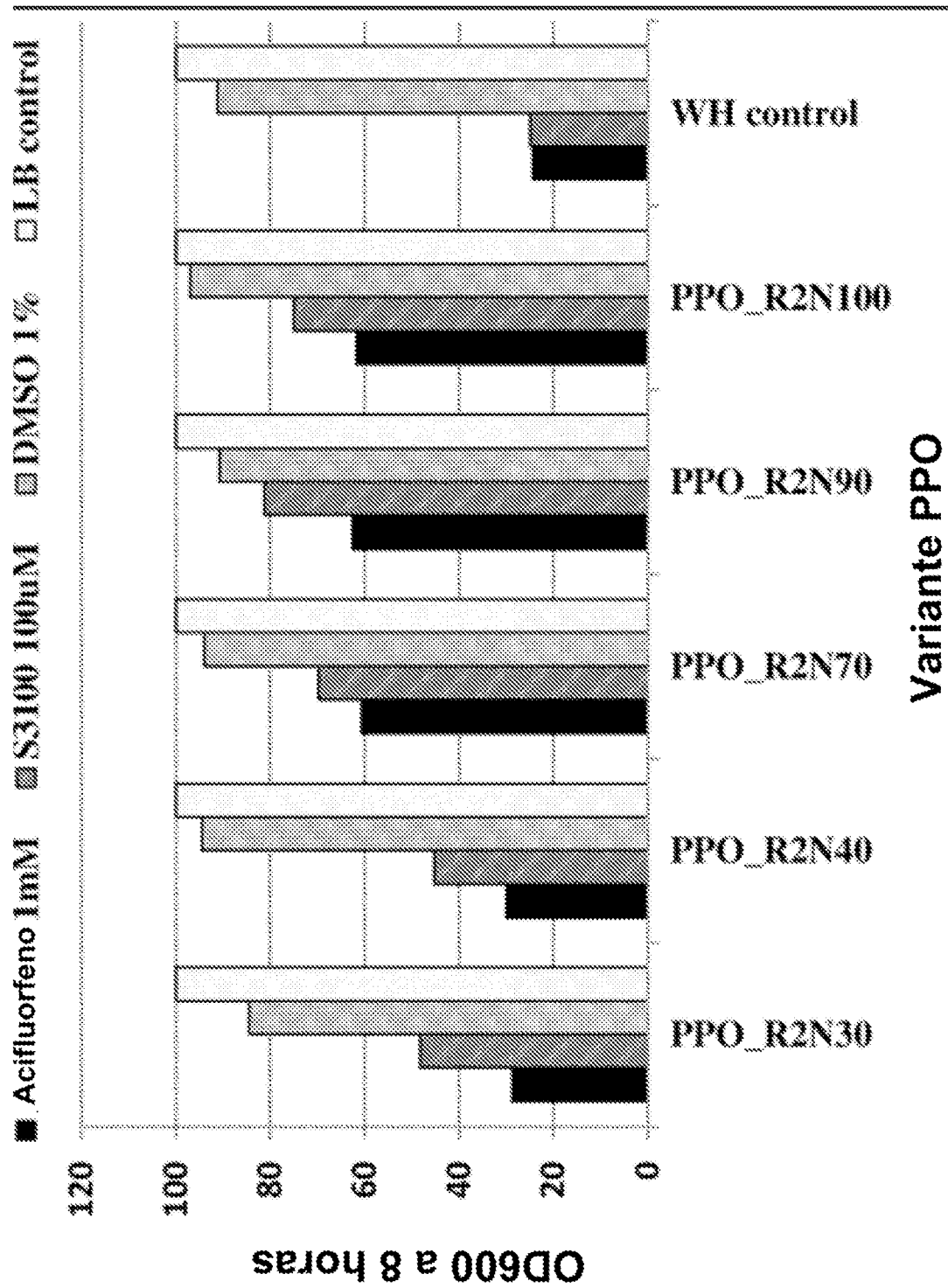


Figura 2