



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 308 820**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98954530 .6**

(96) Fecha de presentación : **06.11.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1029059**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2000**

(54)

Título: **Hidroxi-fenil piruvato dioxigenasa mutada, secuencia de ADN y obtención de plantas que contienen tal gen, tolerantes a los herbicidas.**

(30)

Prioridad: **07.11.1997 FR 97 14264**

(73)

Titular/es: **Bayer CropScience S.A.**
16 rue Jean-Marie Leclair
69009 Lyon, FR

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72)

Inventor/es: **Boudec, Philippe;**
Bourdon, Hélène;
Dumas, Florence;
Rodgers, Matthew y
Sailland, Alain

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74)

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 820 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

Hidroxi-fenil piruvato dioxigenasa mutada, secuencia de ADN y obtención de plantas que contienen tal gen, tolerantes a los herbicidas.

La presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una hidroxifenilpiruvato-dioxigenasa (HPPD) mutada, a un gen quimérico que contiene esta secuencia como secuencia codificante y a su utilización para la obtención de plantas resistentes a ciertos herbicidas.

Las hidroxifenilpiruvato-dioxigenasas son enzimas que catalizan la reacción de transformación del para-hidroxifenilpiruvato (HPP) en homogentisato. Esta reacción tiene lugar en presencia de hierro (Fe^{2+}) en presencia de oxígeno (Crouch N.P. *et al.*, Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997). Se puede expresar la hipótesis de que las HPPD contienen un sitio activo apto para catalizar esta reacción en la que están asociados el hierro, el sustrato y la molécula de oxígeno, no habiendo sido descrito nunca hasta la fecha un sitio activo tal.

Se conocen además algunas moléculas inhibitoras de esta enzima, que llegan a fijarse en la enzima de modo competitivo para inhibir la transformación del HPP en homogentisato. Algunas de estas moléculas han encontrado empleo como herbicidas, en la medida en que la inhibición de la reacción en las plantas conduce a un blanqueo de las hojas de las plantas tratadas, y a la muerte de dichas plantas (Pallett K.F. *et al.*, Pestic. Sci, 50 83-84, 1997). Tales herbicidas que tienen por diana la HPPD, descritos en el estado de la técnica, son especialmente los isoxazoles (documentos EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659 y US 5.424 276) y en particular el isoxaflutol, herbicida selectivo del maíz, los dicetonitrilos (documentos EP 496 630 y EP 496 631), en particular la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2- SO_2 CH_3 -4- CF_3 -fenil)propano-1,3-diona y la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2- SO_2 CH_3 -4-2,3- Cl_2 -fenil)propano-1,3-diona, las tricetonas (documentos EP 625 505, EP 625 508 y US 5 506 195), en particular la sulcotriona o también los pirazolinatos.

Para hacer a las plantas tolerantes a los herbicidas, se dispone de tres estrategias principales, (1) la destoxificación del herbicida mediante una enzima que llega a transformar al herbicida, o su metabolito activo, en productos de degradación no tóxicos, tales como, por ejemplo, las enzimas de tolerancia al bromoxinilo o al basta (documentos EP 242 236 y EP 337 899); (2) la mutación de la enzima diana en una enzima funcional menos sensible al herbicida o su metabolito activo, tal como por ejemplo, las enzimas de tolerancia al glifosato (documentos EP 293 356, Padgett S.R. *et al.*, J. Biol. Chem., 266 33, 1991); o (3) la sobreexpresión de la enzima sensible, para producir en la planta cantidades suficientes de enzima diana respecto a las constantes cinéticas de esta enzima frente al herbicida de modo que se tenga suficientemente enzima funcional, a pesar de la presencia de su inhibidor.

Es esta tercera estrategia la que ha sido descrita para obtener con éxito plantas tolerantes a los inhibidores de la HPPD (documento WO 96/38567), entendiéndose que por primera vez una estrategia de simple sobreexpresión de la enzima diana sensible (sin mutar) era empleada con éxito para comunicar a las plantas una tolerancia a un herbicida a nivel agronómico.

A pesar del éxito obtenido con esta estrategia de simple sobreexpresión de la enzima diana, continúa siendo necesario mejorar el sistema de tolerancia a los inhibidores de la HPPD, para obtener una tolerancia cualquiera que sean las condiciones de cultivo de las plantas tolerantes o las dosis comerciales de aplicación de los herbicidas en el campo.

La presente invención se refiere, por tanto, en primer lugar, a una HPPD mutada, que siendo totalmente funcional, es decir, conservando sus propiedades de catálisis de la transformación del HPP en homogentisato, es menos sensible a los inhibidores de la HPPD que la HPPD nativa, antes de la mutación.

En lo que respecta al carácter competitivo de la inhibición, se expresa la hipótesis de que los inhibidores de la HPPD llegan a unirse a la enzima en el sitio activo de esta última, o en su proximidad, bloqueando el acceso del HPP a este sitio activo e impidiendo su transformación en presencia de hierro y oxígeno. Efectuando una mutación que limite el acceso del inhibidor al sitio activo de la enzima, preservando totalmente el acceso del HPP a este último, se pueden obtener enzimas mutadas funcionales, menos sensibles a los inhibidores de la HPPD.

Se ha comprobado ahora que efectuando una mutación de la enzima en su parte C-terminal, era posible obtener HPPD funcionales menos sensibles a los inhibidores de la HPPD, de modo que su expresión en las plantas permite una tolerancia mejorada a los inhibidores de la HPPD.

La presente invención se refiere, por tanto, a una nueva HPPD mutada funcional, menos sensible a los inhibidores de la HPPD, que comprende al menos una mutación en su parte C-terminal.

Por "mutación" se entiende según la invención la sustitución de un aminoácido de la secuencia primaria por otro aminoácido. Se empleará en lo sucesivo la expresión "aminoácido mutado" para designar el aminoácido reemplazado por otro, designando el sitio de la mutación sobre la secuencia primaria de la proteína.

Varias HPPD y su secuencia primaria han sido descritas en el estado de la técnica, en especial las HPPD de bacterias tales como *Pseudomonas* (Rüetschi *et al.*, Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, y documento WO 96/38567), de

plantas tales como las de *Arabidopsis* (documentos WO 96/38567, Genebank AF047834) o de zanahoria (documento WO 96/38567, Genebank 87257), de *Coccicoides* (Genebank COITRP), o de mamíferos tales como el ratón o el cerdo.

La alineación de estas secuencias conocidas, por los medios habituales de la técnica, tales como, por ejemplo, el método descrito por Thompson, J.D. *et al.* (CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680, 1994), y el acceso a estos programas informáticos de alineación de secuencias a las que puede accederse, por ejemplo, vía internet, permiten a los expertos en la técnica poder definir las homologías de secuencia con respecto a una secuencia de referencia, y volver a encontrar los aminoácidos claves, o incluso definir regiones comunes, que permiten especialmente definir una región C-terminal y una región N-terminal a partir de esta secuencia de referencia.

Para la presente invención, la secuencia de referencia es la secuencia de *Pseudomonas*, haciéndose todas las definiciones e indicaciones de las posiciones de los aminoácidos particulares con respecto a la secuencia primaria de la HPPD de *Pseudomonas*. La figura 1 anexa representa una alineación de varias secuencias de HPPD descritas en el estado de la técnica, alineadas con respecto a la secuencia de la HPPD de *Pseudomonas* como referencia, comprendiendo las secuencias de HPPD de *Streptomyces avermitilis* (Genebank SAV11864), de *Daucus carota* (Genebank DCU 87257), de *Arabidopsis thaliana* (Genebank AF047834), de *Zea mais*, de *Hordeum vulgare* (Genebank HVAJ693), de *Mycosphaerella graminicola* (Genebank AF038152), de *Coccicoides immitis* (Genebank COITRP) y de *Mus musculus* (Genebank MU54HD). La numeración de los aminoácidos de la secuencia de *Pseudomonas* se indica sobre esta figura, al igual que los aminoácidos comunes a estas secuencias, designados por un asterisco. Sobre la base de una alineación tal, es fácil identificar a partir de la definición del aminoácido de *Pseudomonas* por su posición y su naturaleza, la posición del aminoácido correspondiente en otra secuencia de HPPD (la alineación de secuencias de diferentes orígenes, plantas, mamíferos, bacterias, mostrando que este método de alineación, bien conocido por los expertos en la técnica, puede ser generalizado a cualquier otra secuencia). Una alineación de diferentes secuencia de HPPD figura igualmente descrita en la solicitud de patente WO 97/49816.

La parte C-terminal de las HPPD, residencia del sitio activo de la enzima, se distingue por un péptido de unión de su parte N-terminal, lo que asegura la estabilidad de la enzima y su oligomerización (la HPPD de *Pseudomonas* es un tetrámero, las de las plantas son dímeros) como muestra la representación esquemática de la estructura ternaria del monómero de la HPPD de *Pseudomonas* representada en la figura 2. Esta estructura ha sido obtenida mediante los métodos habituales de estudio de difracción de rayos X de cristales. El péptido de unión permite definir el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la enzima, situándose dicho péptido entre los aminoácidos 145 y 157 para la *Pseudomonas* (véase la figura 1).

Por consiguiente la parte C-terminal puede definirse como constituida por la secuencia definida por una parte por el péptido de unión y, por otra parte, por el extremo C-terminal de la enzima, estando, por tanto, efectuada la mutación llevada a cabo en la parte C-terminal de la HPPD en la zona así definida. Sobre la alineación de secuencias representada en la figura 1 anexa, se aprecia para todas las secuencias dos aminoácidos en las posiciones 161 y 162 para la secuencia de *Pseudomonas*, (D = Asp161 y H = His162). Por referencia a la HPPD de *Pseudomonas*, se puede definir por tanto, que el péptido de unión que representa el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la HPPD se sitúa entre aproximadamente 5 y 15 aminoácidos más arriba del aminoácido Asp161.

Según un modo preferente de realización de la invención, la mutación se efectúa sobre aminoácidos, que son reemplazados por aminoácidos de impedimento estérico superior o incluso un aminoácido ionizado o ionizable. De preferencia, la mutación se lleva a cabo sobre aminoácidos de pequeño impedimento estérico. Por aminoácido de pequeño impedimento estérico se entiende, de preferencia, según la invención, la glicina o los aminoácidos de impedimento estérico débil como la alanina, cisteína, serina...

Cualquier aminoácido de impedimento estérico superior al del aminoácido reemplazado puede ser empleado para la mutación según la invención. De modo preferente, se reemplazarán los aminoácidos del sitio de mutación por los aminoácidos siguientes: leucina, isoleucina o triptófano.

Por aminoácido ionizado o ionizable se entiende, según la invención, todo aminoácido que presenta además de los grupos que entran en la unión peptídica, un grupo amino, ácido carboxílico (COOH) o incluso amonio o $-\text{COO}^-$. Se trata, de preferencia, de los aminoácidos siguientes: glutamina y ácido glutámico o asparagina o ácido aspártico.

Según un modo preferente de realización de la invención, la mutación será efectuada sobre un aminoácido de la parte C-terminal común a varias secuencias de la HPPD, pudiendo identificarse estos últimos por el método de alineación de secuencia.

Según un modo particular de realización de la invención, la HPPD mutada comprende en su parte C-terminal la secuencia peptídica siguiente:

-Gly-Phe-Xaa-Yaa-Xab-Asn-Phe-Yab-Yac-Leu-Phe-

en la que Xaa y Xab representan independientemente uno del otro, la glicina (Gly) o un aminoácido de impedimento superior a la glicina, entendiéndose que si uno de Xaa o Xab representa Gly, entonces el otro es diferente de Gly.

ES 2 308 820 T3

Yaa representa un aminoácido cualquiera, preferentemente Ala, Lys o Glu*,

Yab representa un aminoácido cualquiera, preferentemente Lys, Ser, Arg o Asn*, y

5 Yac representa un aminoácido cualquiera, preferentemente Ala, Ser, Glu o Gln*.

De modo ventajoso uno al menos de Xaa o Xab representa Leu, Glu, Trp o Ile.

10 Por referencia a la secuencia de HPPD de *Pseudomonas*, los aminoácidos mutados se escogen entre los aminoácidos siguientes: Pro215, Gly298, Gly332, Phe333, Gly334, Gly336 y Asn337, más preferentemente los aminoácidos Pro215 y Gly336.

Entre los ejemplos de mutaciones preferidas, se pueden citar las mutaciones siguientes: Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Trp o Gly336Ile.

15 Se entiende que las mutaciones anteriormente descritas pueden combinarse dos a dos, tal como, por ejemplo, una mutación doble de los aminoácidos Gly334 y Gly336. La presente invención se refiere igualmente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada, anteriormente descrita. Según la presente invención, se entiende por “secuencia de ácido nucleico” una secuencia nucleotídica que puede ser de tipo ADN o ARN, de preferencia de tipo ADN, en especial de doble hebra, tanto de origen natural como sintético, en especial una secuencia de ADN para la que los codones que codifican la HPPD mutada según la invención, habrán sido optimizados en función del organismo hospedante en el que será expresada, siendo estos métodos de optimización bien conocidos de los expertos en la técnica.

25 La secuencia que codifica una HPPD de origen sin mutar, puede ser de un origen cualquiera. En particular puede ser de origen bacteriano. Como ejemplos interesantes se pueden citar bacterias del tipo *Pseudomonas sp.* por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* o también cianobacterias del tipo *Synechocystis*. La secuencia puede ser también de origen vegetal, en especial procedente de plantas dicotiledóneas tales como el tabaco, *Arabidopsis*, de umbelíferas tales como *Daucus carotta* o también monocotiledóneas tales como *Zea mais* o el trigo o incluso la cebada. Las secuencias codificantes y el medio de aislarlas y clonarlas están descritos en las referencias bibliográficas anteriormente citadas, cuyo contenido se incorpora en esta memoria por referencia.

30 La mutación podrá efectuarse en la secuencia de ácido nucleico que codifica la HPPD de origen sin mutar por cualquier medio apropiado para reemplazar en dicha secuencia el codón que codifica el aminoácido mutado por el codón correspondiente al aminoácido que viene a reemplazarle, estando dichos codones profusamente descritos en la bibliografía y siendo bien conocidos por los expertos en la técnica.

Varios procedimientos de biología molecular permiten realizar esta mutación.

40 Un primer procedimiento consiste en someter cultivos de células a una presión de selección grande con un inhibidor de la HPPD, en presencia o no de un agente mutágeno, mutando entonces espontáneamente el gen de la HPPD bajo el efecto de esta presión de selección, y eventualmente del agente mutágeno, habiendo evolucionado dicho gen de tal suerte que codifica una enzima mutada, lo que permite la expresión de la actividad de HPPD en condiciones en la que la enzima sin modificar es inhibida en parte o en su totalidad. Las células pueden ser células vegetales o bacterias, y en este segundo caso, pueden expresar una HPPD nativa (de origen bacteriano) o una HPPD de otro origen (bacteriano, hongos, algas, plantas), introducida en la bacteria empleada para la mutagénesis bajo una forma apropiada que permite la expresión de esta HPPD, habiendo sido suprimido, de preferencia, si existe, el gen que codifica la HPPD nativa de dicha bacteria. Tales medios de transformación de las bacterias son bien conocidos por los expertos en la técnica, y están ampliamente descritos en la bibliografía, al igual que los medios de mutación (en especial: Sambroadi *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

55 En el caso de que la célula es una célula vegetal que expresa una HPPD nativa, la HPPD mutada puede ser aislada y clonada, o también pueden ser regeneradas plantas a partir de cultivos celulares según los métodos habituales. Las plantas obtenidas de este modo expresan entonces una HPPD mutada funcional, menos sensible a los inhibidores de la HPPD que la HPPD nativa. Los métodos de regeneración están ampliamente descritos en la bibliografía (y están comprendidos en las referencias bibliográficas anteriormente citadas) y son bien conocidos de los expertos en la técnica.

60 La selección de las células que presentan una HPPD mutada menos sensible a los inhibidores de HPPD, se efectúa por medio de un útil de selección adecuado. Con respecto al objeto de la presente invención y de la solución buscada, una HPPD menos sensible a los inhibidores de HPPD, un útil de selección sencillo de emplear consiste en determinar las dosis de inhibidor de HPPD que inhiben al 100% las HPPD de origen sin mutar, letal para las células que expresan esta HPPD sin mutar, someter las células después de mutación a esta dosis determinada, aislar las células mutadas que 65 hayan resistido a esta dosis letal, y después aislar y clonar el gen que codifica la HPPD mutada.

Esta operación de mutagénesis por cultivo celular ha sido efectuada sobre un número muy importante de células de *Pseudomonas* que expresan su HPPD nativa (véanse, en especial, los ejemplos particulares descritos más adelante). En

todos los casos, los mutantes aislados mediante el método de selección antes definido han sido mutantes que presentan una mutación en la parte C-terminal de la HPPD.

Otro procedimiento de preparación de una secuencia de ácido nucleico mutada según la invención, y de la proteína correspondiente, consiste en efectuar una mutagénesis dirigida sobre uno o varios aminoácidos seleccionados por anticipado, por ejemplo identificando los aminoácidos comunes a varias secuencias en la parte C-terminal, o también buscando reproducir en una HPPD de un origen determinado, una mutación obtenida por mutagénesis al azar (cultivo de células) en una HPPD de otro origen. Los medios para obtener estas mutaciones dirigidas son bien conocidos por los expertos en la técnica y están descritos profusamente en la bibliografía (en especial: Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, Compilado por M.J. McPHERSON, IRL PRESS), o para las que se pueden emplear kits comerciales (por ejemplo, el U.S.E. Mutagenesis Kit de la empresa PHARMACIA). En todos los casos, es útil emplear después de esta mutagénesis dirigida el mismo método de selección de las HPPD mutadas menos sensibles que la HPPD sin mutar correspondiente, empleada para la mutagénesis al azar antes descrita.

La presente invención se refiere igualmente, por tanto, a un procedimiento de preparación de una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada según la invención, habiéndose definido dicho procedimiento anteriormente.

La invención tiene también por objeto la utilización de una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada según la invención, en un procedimiento para la transformación de plantas, como gen marcador o como secuencia codificante que permiten conferir a la planta una tolerancia a los herbicidas inhibidores de la HPPD. Esta secuencia, bien entendido, puede ser utilizada igualmente en asociación con otro(s) gen(es) marcador(es) y/o secuencia(s) codificante(s) para una o más propiedades agronómicas.

La presente invención se refiere igualmente a un gen quimérico (o casete de expresión) que comprende una secuencia codificante así como elementos de regulación en posición 5' y 3' heterólogos que pueden funcionar en un organismo hospedante, en particular las células vegetales o las plantas, comprendiendo la secuencia codificante al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada tal como se ha definido precedentemente.

Por organismo hospedante se entiende cualquier organismo mono- o pluricelular, inferior o superior, en el que el gen quimérico según la invención puede ser introducido, para la producción de HPPD mutada. Se trata, en particular, de bacterias, por ejemplo *E. coli*, de levaduras, en particular de los géneros *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, *Pichia*, de hongos, en particular *Aspergillus*, de un baculovirus o, de preferencia, de células vegetales y de plantas.

Por "célula vegetal" se entiende, según la invención, toda célula procedente de una planta y que puede constituir tejidos indiferenciados tales como callos, tejidos diferenciados tales como embriones, partes de plantas, plantas o semillas.

Se entiende por "planta" según la invención, todo organismo multicelular diferenciado capaz de realizar la fotosíntesis, en particular monocotiledóneas o dicotiledóneas, más especialmente plantas de cultivo destinadas o no a la alimentación animal o humana, tales como el maíz, el trigo, la colza, la soja, el arroz, la caña de azúcar, la remolacha, el tabaco, el algodón, etc.

Los elementos de regulación necesarios para la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD son bien conocidos de los expertos en la técnica en función del organismo hospedante. En especial comprenden secuencias promotoras, activadores de la transcripción, secuencias de terminación, que incluyen codones de comienzo y terminación. Los medios y métodos para identificar y seleccionar los elementos de regulación son bien conocidos de los expertos en la técnica y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La invención se refiere más particularmente a la transformación de plantas. Como secuencia de regulación promotora en las plantas, se puede utilizar cualquier secuencia promotora de un gen que se expresa naturalmente en las plantas, en particular un promotor que se expresa especialmente en la hojas de las plantas, tal como, por ejemplo, promotores denominados constitutivos, de origen bacteriano, viral o vegetal, tal como, por ejemplo, un promotor de histona tal como el descrito en la solicitud EP 0 507 698, o un promotor de actina de arroz, de un gen de virus de una planta tal como, por ejemplo, el del mosaico de la coliflor (CAMV 19S o 35S), o también promotores denominados dependientes de la luz tales como el del gen de la pequeña subunidad de ribulosa-bis-carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) de planta, o cualquier promotor conveniente conocido que pueda ser utilizado.

Según la invención, se pueden utilizar igualmente, en asociación con la secuencia de regulación promotora, otras secuencias de regulación, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como activadores de transcripción ("potenciador"), como por ejemplo el activador de traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV) descrito en la solicitud de patente WO 87/07644, o del virus de corrosión del tabaco (TEV) descrito por Carrington & Freed.

Como secuencia de regulación de terminación o de poliadenilación, se puede utilizar cualquier secuencia correspondiente de origen bacteriano, tal como, por ejemplo, el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens*, o también de origen vegetal tal como, por ejemplo, un terminador de histona tal como el descrito en la solicitud EP 0 633 317.

Según un modo particular de realización de la invención, se emplea en 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito, estando dispuesta esta secuencia entre la región promotora y la secuencia que codifica la HPPD mutada, de modo que permite la expresión de una proteína de fusión péptido de tránsito/HPPD mutada, habiéndose definido anteriormente esta última. El péptido de tránsito permite el acceso de la HPPD mutada a los plastos, más particularmente los cloroplastos, estando hendida la proteína de fusión entre el péptido de tránsito y la HPPD mutada al paso de la membrana de los plastos. El péptido de tránsito puede ser simple, tal como un péptido de tránsito de EPSPS (descrito en la patente de US 5 188 642) o un péptido de tránsito del de la pequeña subunidad de ribulosa-bis-carboxilasa/oxigenasa (ssu RuBisCO) de una planta, que comprende eventualmente algunos aminoácidos de la parte N-terminal de la ssu RuBisCO madura (documento EP 189 707) o también un péptido de tránsito múltiples que comprende un primer péptido de tránsito de planta fusionado a una parte de la secuencia N-terminal de una proteína madura de localización plastidial, fusionada a un segundo péptido de tránsito de planta tal como se ha descrito en la patente EP 508 909, y más particularmente el péptido de tránsito optimizado que comprende un péptido de tránsito de la ssu RuBisCO de girasol fusionado con 22 aminoácidos del extremo N-terminal de la ssu RuBisCO de maíz fusionada al péptido de tránsito de la ssu RuBisCO de maíz tal como el descrito con su secuencia codificante en la patente EP 508 909.

La presente invención concierne igualmente a la proteína de fusión péptido de tránsito/HPPD mutada, estando definidos anteriormente los dos elementos de esta proteína de fusión.

La presente invención se refiere igualmente a un vector de clonación y/o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que contiene al menos un gen quimérico tal como se ha definido anteriormente. Este vector comprende además del gen quimérico anterior, al menos un origen de replicación. Este vector puede estar constituido por un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus, transformados por la introducción del gen quimérico según la invención. Tales vectores de transformación en función del organismo hospedante a transformar son bien conocidos de los expertos en la técnica y están descritos profusamente en la bibliografía. Para la transformación de las células vegetales o de las plantas, se tratará en especial de un virus que puede ser empleado para la transformación de las plantas desarrolladas y que contiene además sus propios elementos de replicación y de expresión. De modo preferente, el vector de transformación de las células vegetales o de las plantas según la invención es un plásmido.

La invención tiene todavía por objeto un procedimiento de transformación de los organismos hospedantes, en particular células vegetales, por integración de al menos una secuencia de ácido nucleico o un gen quimérico tales como los definidos anteriormente, transformación que puede ser obtenida por cualquier medio conocido apropiado, ampliamente descrito en la bibliografía especializada y en especial las referencias bibliográficas citadas en la presente solicitud de patente, más particularmente por el vector según la invención.

Una serie de métodos consiste en bombardear células, protoplastos o tejidos con partículas a las que están enlazadas las secuencias de ADN. Otra serie de métodos consiste en utilizar como medio de transferencia a la planta un gen quimérico insertado en un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Otros métodos que pueden ser utilizados son tales como la micro-inyección o la electroporación o también la precipitación directa por medio de PEG. Los expertos en la técnica escogerán el método apropiado en función de la naturaleza del organismo hospedante, en particular de la célula vegetal o de la planta.

La presente invención tiene también por objeto los organismos hospedantes, en particular células vegetales o plantas, transformadas y que contienen un gen quimérico que comprende una secuencia que codifica una HPPD mutada, definida anteriormente en esta memoria.

La presente invención tiene también por objeto las plantas que contienen células transformadas, en particular las plantas regeneradas a partir de las células transformadas. La regeneración se obtiene mediante cualquier procedimiento apropiado que depende de la naturaleza de la especie, tal como, por ejemplo, se ha descrito en las referencias bibliográficas anteriores. Para los procedimientos de transformación de las células vegetales y de regeneración de las plantas, pueden citarse especialmente las patentes y solicitudes de patentes siguientes: US 4 459 355, US 4 536 475, US 5 464 763, US 5 177 010, US 5 187 073, EP 267 159, EP 604 662, EP 672 752, US 4 945 050, US 5 036 006, US 5 100 792, US 5 371 014, US 5 478 744, US 5 179 022, US 5 565 346, US 5 484 956, US 5 508 468, US 5 538 877, US 5 554 798, US 5 489 520, US 5 510 318, US 5 204 253, US 5 405 765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 775, WO 91/02071 y WO 05/06128.

La presente invención se refiere igualmente a las plantas transformadas que provienen del cultivo y/o del crecimiento de las plantas regeneradas anteriores, así como las semillas de las plantas transformadas que contienen células transformadas.

Las plantas transformadas que pueden ser obtenidas según la invención pueden ser del tipo monocotiledóneas, tales como, por ejemplo, los cereales, la caña de azúcar, el arroz y el maíz, o dicotiledóneas como, por ejemplo, el tabaco, la soja, la colza, el algodón, la remolacha, el trébol, etc.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de eliminación de hierbas selectivo de plantas, en especial de cultivos, con ayuda de un inhibidor de la HPPD, en especial un herbicida de los anteriormente definido, caracterizado porque se aplica este herbicida sobre plantas transformadas según la invención, tanto antes de la siembra, como antes del brote o después del brote del cultivo.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de control de las malas hierbas en la superficie de un campo que comprende semillas o plantas transformadas, con el gen quimérico según la invención, procedimiento que consiste en aplicar en la citada superficie del campo una dosis tóxica para dichas malas hierbas de un herbicida inhibidor de la HPPD, sin afectar de modo sustancial, sin embargo, a las semillas o plantas transformadas con dicho gen quimérico según la invención.

La presente invención concierne igualmente a un procedimiento de cultivo de las plantas transformadas según la invención con un gen quimérico según la invención, procedimiento que consiste en plantar las semillas de dichas plantas transformadas en la superficie de un campo apropiado para el cultivo de dichas plantas, aplicar sobre dicha superficie de dicho campo una dosis tóxica para las malas hierbas de un herbicida que tiene por diana la HPPD anteriormente definida en el caso de la presencia de malas hierbas sin afectar de modo sustancial a dichas semillas o a dichas plantas transformadas, y recolectar después las plantas cultivadas cuando alcanzan la madurez deseada y, eventualmente, en separar las semillas de las plantas recolectadas.

En los dos procedimientos anteriores la aplicación del herbicida que tiene por diana la HPPD puede llevarse a cabo según la invención, tanto antes de la siembra, como antes del brote o como después del brote del cultivo.

Por herbicida, en el sentido de la presente invención, se entiende una materia activa herbicida, sola o asociada a un aditivo que modifica su eficacia tal como, por ejemplo, un agente que aumenta la actividad (sinérgico) o que limita la actividad (en inglés safener). Los herbicidas inhibidores de la HPPD han sido definidos, en particular, anteriormente. Ha de quedar claro, para su aplicación práctica, que los herbicidas anteriores se asocian de modo conocido por sí mismo a los coadyuvantes de formulaciones utilizados habitualmente en agroquímica.

Cuando la planta transformada según la invención comprende otro gen de tolerancia a otro herbicida (como por ejemplo un gen que codifica una EPSPS mutada o no, que comunica a la planta tolerancia al glifosato), o cuando la planta transformada es de modo natural insensible a otro herbicida, el procedimiento según la invención puede comprender la aplicación simultánea o escalonada en el tiempo, de un inhibidor de la HPPD en asociación con dicho herbicida, por ejemplo el glifosato.

La invención tiene todavía por objeto la utilización del gen quimérico que codifica una HPPD mutada como gen marcador en el curso del ciclo "transformación-regeneración" de una especie vegetal y selección sobre el herbicida anterior.

Los diferentes aspectos de la invención serán mejor comprendido con ayuda de los ejemplos experimentales que figuran seguidamente.

Todos los métodos u operaciones descritas seguidamente en estos ejemplos se proporcionan a título de ejemplo y corresponden a una elección, efectuada entre los diferentes métodos de que se dispone para llegar a alcanzar el mismo resultado. Esta elección no tiene incidencia alguna sobre la calidad del resultado y, por consiguiente, cualquier método adaptado puede ser utilizado por los expertos en la materia para llegar a alcanzar el mismo resultado. La mayor parte de los métodos de ingeniería de los fragmentos de ADN están descritos en "Current Protocols in Molecular Biology", Volúmenes 1 y 2, Ausubel F.M. *et al.*, publicados por Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (1989) o en Molecular cloning, T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 1982.

Ejemplo 1

Ensayo de selección colorimétrica de mutantes que presentan tolerancia a la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)propano-1,3-diona

pRP C: El vector pRP A (descrito en la solicitud de patente WO 96/38567) que contiene un fragmento de ADN genómico y la región codificante del gen de la HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 fue digerido con NcoI, purificado y después ligado en el vector de expresión pKK233-2 (Clontech) el mismo digerido con NcoI, sitio de clonación único de este vector. Ha sido verificada la orientación del gen en el vector pRP C obtenido de este modo, que permite la expresión bajo el control del promotor *trc*.

Un medio de cultivo de tipo caldo YT con agarosa al 1% (ultra puro, Gibco BRL) y con L-Tirosina 5 mM (Sigma) y que contenía el agente de selección del vector pRP C anterior, fue dispensado en una placa de 96 pocillos a razón de 100 μ l por pocillo. 10 μ l de un cultivo de *E. Coli* en fase exponencial de crecimiento que contenía el vector pRP C fue dispensado en cada pocillo. Al cabo de 16 horas a 37°C, los pocillos que no contenían más que el medio de cultivo o los sembrados con un cultivo de *E. Coli* que contenían el vector pKK233-2 eran translúcidos mientras que los pocillos sembrados con un cultivo de *E. Coli* que contenía el vector pRP C eran de color pardo.

Se ha llevado a cabo una serie de ensayos con un medio de cultivo idéntico que contenía concentraciones variables (0 mM a 14 mM) de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona (documento EP0 496 631) solubilizada en agua y llevada a pH 7,5. Esta molécula es un dicetonitrilo, reconocido como un inhibidor eficaz de la actividad de la HPPD (Pallett, K.E. *et al*, Pestic. Sci. 50, 83-84, 1997). Se observa una ausencia total de coloración para el cultivo bacteriano que contiene el vector pRP C a 7 mM del compuesto anterior.

Mutantes de HPPD obtenidos por mutagénesis dirigida así como por mutagénesis al azar, fueron seleccionados por oscurecimiento del medio que contenía la 2-ciano-3-ciclopropil-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona a la concentración de 7 mM como se pondrá de manifiesto después.

Resultados idénticos fueron obtenidos sustituyendo a la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona por la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-(metiltio)fenil)propano-1,3-diona, y la 2-(2-cloro-3-etoxi-4-(etilsulfonyl)benzoil)-5-metil-1,3-ciclohexadiona (documento WO 93/03009), utilizados respectivamente a 3,5 mM y 7 mM.

Estos resultados confirman que un ensayo basado en la actividad de HPPD cualquiera que sea el origen de esta actividad, permite identificar actividades de HPPD que presentan una tolerancia a inhibidores de actividad de la HPPD de la familia de los isoxazoles, así como también de las tricetonas.

Ejemplo 2

Mutagénesis al azar del gen de la HPPD de Pseudomonas fluorescens A32 por medio de la hidroxilamina

El ADN plasmídico de un cultivo de *E. Coli* que contenía el vector pRP C anteriormente descrito, se extrajo utilizando el protocolo estándar. Este ADN fue puesto en presencia de hidroxilamina, agente químico mutágeno que provoca la sustitución de la citosina por timidina, durante una hora a 80°C, utilizando un protocolo estándar de la referencia anterior. La cepa DH10B de *E. Coli* K12 fue transformada con el ADN plasmídico potencialmente mutado obtenido de este modo. La utilización del ensayo de selección colorimétrica descrito en el ejemplo 1 permitió identificar después del rastreo de varios miles de clones potencialmente mutados, varias colonias capaces de oscurecer el medio, es decir, transformar el HPP en homogentisato incluso en presencia de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona 7 mM.

Después de secuenciación de estos diversos mutantes se reveló que la utilización de este útil de mutagénesis/selección había permitido aislar 4 mutantes distintos correspondientes a tres sitios de mutaciones distintos:

- *Primer sitio*: la prolina 215 reemplazada por una leucina, mutante denominado Pfl215.

- *Segundo sitio*:

- la glicina 334 reemplazada por una serina, mutante denominado Pfs334;

- la glicina 334 reemplazada por un ácido aspártico, mutante denominado Pfd334.

- *Tercer sitio*: la glicina 336 reemplazada por un ácido serina, mutante denominado Pfs336.

Estos tres sitios mutados que permiten obtener una tolerancia mejorada con respecto a la HPPD sin mutar, están situados en la parte C-terminal de la proteína.

Los clones derivados del clon pRP C que contiene las región que codifica el gen de la PD de *Pseudomonas Fluorescens* A32 que contiene una o varias mutaciones se denominan pRP C seguido del nombre de la o de las mutaciones efectuadas, como por ejemplo pRP C Pfl215 o pRP C Pfs336 (o también simplemente por la sola designación del aminoácido mutado, como por ejemplo Pfl215 o Pfs336, salvo indicación contraria en cuanto al origen de la PD mutada).

La o las modificaciones por mutagénesis al azar pueden ser efectuadas sobre cualquier proteína que tenga una actividad del tipo de la HPPD, es decir, que transforme el 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato, cuya región codificante es o pueda ser clonada. Las HPPD descritas en este texto son, entre otras, las de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* y *Synechocystis*, pero bien seguro, es evidente para los expertos en la materia que todas estas modificaciones son aplicables a las otras HPPD.

Ejemplo 3

Mutagénesis dirigida del gen de la HPPD de Pseudomonas fluorescens por analogía de secuencia

Por alineación de las secuencias protéicas de las HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32, *Arabidopsis thaliana*, del ratón, del cerdo y de *Coccicoides*, es posible escoger entre los aminoácidos que se han encontrado conservados en diferentes secuencias un cierto número entre ellos para mutageneizarlos y obtener HPPD tolerantes; se habrían podido añadir a la alineación, presentada en la figura 1, secuencias de otras HPPD descritas en la bibliografía.

La alineación de estas diferentes secuencias pone claramente en evidencia que una de las regiones mejor conservadas está situada entre la glicina 332 y la fenilalanina 342. No solamente esta región está muy conservada sino que además engloba las dos glicinas en las posiciones 334 y 336 identificadas por mutagénesis al azar (en grueso sobre la

ES 2 308 820 T3

alineación de secuencias y marcadas con una estrella). Se ha llevado a cabo la mutagénesis sobre el vector pRP C utilizando el U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia. Los oligonucleótidos Mont han sido utilizados para las mutagénesis de la fenilalanina 333, de la glicina 334, de la glicina 336 y de la asparagina 337, así como también para las de los dobles mutantes de las glicinas 334 y 336, como está indicado en los esquemas que figuran seguidamente (identificadores de secuencias anexos, SEQ ID NO 1 a 12):

Mutagénesis de PHE333, reemplazada únicamente por Trp

Oligo 1: GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT

Mutagénesis de PHE333, reemplazada únicamente por LEU & ILE

Oligo 2: GAAGTTGCCC TCGCCRA**K**CC CATCGTCGCC CTT

Mutagénesis de GLY334 reemplazada únicamente por TRP

Oligo 3: CTTGAAGTTG CCCTCCCAA ACCCATCGTC GCC

Mutagénesis de GLY334, reemplazada únicamente por ASP

Oligo 4: CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC

Mutagénesis de GLY334, reemplazada únicamente por SER

Oligo 5: CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC

Mutagénesis de GLY334, reemplazada únicamente por LEU & ILE

Oligo 6: CTTGAAGTTG CCCT**CRAK**AA ACCCATCGTC GCC

Mutagénesis de GLY336, reemplazada únicamente por ASP

Oligo 7: CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC

Mutagénesis de GLY336, reemplazada únicamente por GLU

Oligo 8: CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC

Mutagénesis de GLY336, reemplazada únicamente por TRP

Oligo 9; CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC

1 Mutagénesis de GLY336, reemplazada únicamente por Ile

Oligo 10: CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA TC

Mutagénesis de GLY334 y GLY336, reemplazadas por todos los otros aminoácidos, con posibilidad, por tanto, de obtener un mutante doble

Oligo 11: CGCTTGAAGT TNNNCTC**NNN** AAACCCATCG TC

Mutagénesis de ASN337, reemplazada únicamente por LEU e ILE

Oligo 12: GAACAGCGCC TTGAATA**KGC** CCTCGCCAAA CCC

ES 2 308 820 T3

Después de la selección con la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona de varios cientos de mutantes potenciales, se han identificado 15 nuevos mutantes, de ellos 12 son mutantes simples y 3 mutantes dobles (Véase la tabla de recapitulación), que presentan tolerancia al inhibidor 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona en el ensayo de detección colorimétrica. Es preciso añadir que algunos de los mutantes identificados durante el curso de estas mutagénesis dirigidas son idénticos, bien cierto, a los mutantes identificados en el ejemplo 2 (este es el caso de PfS334 y de PfD334).

Ha sido posible combinar mutaciones, no solamente en las regiones próximas, como es el caso para obtener mutantes dobles en posición 334 y 336, sino también en regiones lejanas como es el caso para obtener mutantes dobles en posición 215 et 336, como se indica a continuación.

pRPC Pfl215 Delta: El ADN plasmídico del clon pRPC Pfl21 se ha digerido con PstI, purificado y a continuación religado. El primer sitio PstI se sitúa a nivel de la Leucina 289, y el último sitio PstI se sitúa en el sitio de clonación múltiple de PKK233.2, el clon obtenido pRPC Pfl215 Delta, contiene la parte de la secuencia codificadora de la HPPD Pf L215 que incluye la mutación Pro215Leu, pero no la parte terminal ni la parte genómica.

PRP C Pfl215 W336. PRP C Pfl215 E336, PRP C Pfl215 I336:

Los ADN plasmídicos de los clones pRPC CPfW336, pRPC CPfE336, pRPC CPfI336, han sido digeridos por MluI y HindIII, MluI se sitúan en la parte codificadora de la HPPD de Pseudomonas fluorescens, a nivel del ácido aspártico 254, HindIII se sitúa en el sitio de clonación múltiple de PKK223.3. Los fragmentos que contienen las partes C-terminales de las HPPD mutadas, así como la parte genómica, se han purificado, a continuación ligado en el plásmido pRPC Pfl215 Delta, digerido con MluI y HindIII. Los tres clones así obtenidos son equivalentes al clon pRPC Pfl215, pero contienen respectivamente también la mutación W336, E336 y I336.

Los mutantes obtenidos se han identificado como sigue:

Mutantes simples

30	Fenilalanina 333 reemplazada por triptófano	llamado PfW333
	Fenilalanina 333 reemplazada por leucina	llamado Pfl333
	Glicina334 reemplazada por triptófano	llamado PfW334
35	Glicina334 reemplazada por prolina	llamado PfP334
	Glicina334 reemplazada por leucina	llamado Pfl334
40	Glicina334 reemplazada por isoleucina	llamado Pfl334
	Glicina336 reemplazada por ácido aspártico	llamado PfD336
	Glicina336 reemplazada por glutamina	llamado PfQ336
45	Glicina336 reemplazada por ácido glutámico	llamado PFE336
	Glicina336 reemplazada por triptófano	llamado PfW336
50	Glicina336 reemplazada por isoleucina	llamado Pfl336
	Asparagina337 reemplazada por leucina	llamado Pfl337

Mutantes dobles obtenidos por mutagénesis dirigida

55	Glicina334 reemplazada por alanina y	
	Glicina336 reemplazada por alanina	llamado PfA334-A336
60	Glicina334 reemplazada por alanina y	
	Glicina336 reemplazada por arginina	llamado PfA334-R336
65	Glicina334 reemplazada por serina y	
	cGlicina336 reemplazada por histidina	llamado PfS334-H336

Mutantes dobles obtenidos por clonación

Prolina 215 remplazada por leucina y

5 Glicina 336 remplazada por triptófanoe llamado Pfl215-W336

Prolina 215 remplazada por Leucina y

Glicina 336 remplazada por ácido glutámico llamado PtL215-E336

Prolina 215 remplazada por Leucina y

Gliclina 336 remplazada por Isoleucina llamado PfL215-I336

15 Este resultado muestra que es posible, por mutagénesis de los aminoácidos conservados entre las secuencias pro-
téicas de diferentes HPPD situadas en la parte C-terminal de la proteína, obtener HPPD que presentan tolerancia a los
inhibidores de actividad de HPPD. Por consiguiente, toda región conservada entre diferentes secuencias de amino-
ácidos de HPPD es una buena diana para obtener mutantes que es interesante analizar para determinar su tolerancia.
20 No es preciso decir, que forma parte de la invención cualquier mutación o mutación múltiple que permita obtener una
HPPD tolerante, incluso si esta proteína no está puesta de ejemplo en este texto.

Está demostrado también que el dominio C-terminal es el objetivo privilegiado de la mutagénesis de una HPPD con vista a una buena tolerancia de la enzima a estos diferentes inhibidores. En efecto, en el dominio N-terminal definido como el que va desde el aminoácido nº1 al péptido de unión definido anteriormente en *Pseudomonas fluorescens* A32 25 o los correspondientes en las HPPD de otras especies, es muy difícil definir una región conservada.

La o las modificaciones, por mutagénesis dirigida a partir de informaciones deducidas de una alineación de secuen-
cia, pueden ser hechas sobre todas las proteínas que poseen actividad de tipo HPPD, es decir, que transforman el 4-
30 hidroxifenilpiruvato en homogentisato, cuya región codificante está clonada o podría ser clonada. Las HPPD descritas
en este texto son entre otras las de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* y *Synechocystis*, pero
bien cierto, es evidente que todas estas modificaciones son aplicables a las otras HPPD.

Ejemplo 4

35 *Mutagénesis dirigida del gen de la HPPD de Pseudomonas fluorescens A32*

Los resultados obtenidos por mutagénesis al azar como se ha descrito en el Ejemplo 2, así como de los obtenidos de la alineación de las diferentes secuencias de HPPD, muestran claramente que el péptido que va de Fn°333 a Fn°338 (numeración sobre la HPPD de *P. fluorescens*) es una región especialmente interesante en términos de mutagénesis para obtener tolerancia.

Paralelamente a esta información, se ha descubierto, mediante un análisis de la estructura tridimensional de la enzima de *Pseudomonas fluorescens* cepa A32 por ejemplo (figura 1), que la parte C-terminal de la proteína, de su monómero, contiene el sitio catalítico de la enzima. Estos son, por tanto, los aminoácidos de este dominio C-terminal que es preciso mutagenizar con prioridad para esperar modificar la interacción proteína-inhibidor y obtener de este modo una enzima más tolerante.

Se han investigado, por consiguiente, mediante análisis de la estructura tridimensional de la proteína de HPPD de *P. fluorescens*, mutaciones puntuales que pudieran implicar un cambio de conformación del hexapéptido Phe333 a Phe338 sin mutar directamente este péptido. La idea directriz es que la mutación de un aminoácido bastante alejado del sitio activo, un aminoácido no conservado, puede influir en el posicionamiento en el espacio de este péptido de Phe333 a Phe338 y por tanto inducir tolerancia a los inhibidores de la HPPD por efecto “rebote”.

55 Por consiguiente, se ha buscado en la estructura de los aminoácidos próximos de este hexapéptido, un pequeño número de aminoácidos que responden a este criterio, tales como el ácido aspártico 287 y la glicina 298 [para información, el átomo de carbono alfa de la glicina 334 del hexapéptido está a 9,61 angstrom del del hierro situado en el sitio catalítico y el carbono alfa de la glicina 298 está a 5,75 angstrom del de la glicina 334]. Esta glicina 298 ha parecido ser de lo dos aminoácidos, el mejor candidato, porque cualquier mutagénesis conducirá a un aminoácido con una cadena lateral más abultada y se ha reemplazado esta glicina por un ácido glutámico (cuya cadena lateral está, 60 además, cargada negativamente) con vista a una modificación suficientemente sensible para que el efecto sea visible.

Además, cuando se muta la glicina 298 por un ácido glutámico, la cadena lateral de este ácido glutámico que está muy impedida “se hinca” sobre la estructura secundaria en hoja, Beta, en la que se encuentra el motivo conservado LLOIF. La fenilalanina 312 de este motivo se encuentra, ella misma, muy próxima al hierro.

Se ha ensayado la mutación Gly298 a Glu298.

ES 2 308 820 T3

Estas mutaciones Gly298 a Glu298 fue creada por mutagénesis dirigida (U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia) del vector pRP C utilizando el oligonucleótido nº13 (identificador de secuencia anexa = SEQ ID NO 13):

GLY298 reemplazada por ácido glutámico

Oligo 13: GCCTTCCACGGAAGATTCGTCCAGCAGGATACC

Este mutante, denominado Pfe298, provoca el oscurecimiento del medio de selección que contiene RPA202248 7 mM (Véase tabla de recapitulación).

Esto confirma que con el conocimiento de la estructura tridimensional de la HPPD se puede determinar un cierto número de mutaciones eficaces en términos de tolerancia a los inhibidores de la HPPD, tanto si es de origen bacteriano, como si es de origen vegetal u otros. En efecto es totalmente posible modelar la estructura de no importa que HPPD de cuya secuencia protéica se dispone, puesto que se conoce la estructura precisa en el caso de la HPPD de *P. fluorescens*. Este modelado será sobre todo interesante en el caso del modelado del dominio C-terminal, el mejor conservado en términos de secuencia primaria y sobre todo el más prometedor en términos de tolerancia a los inhibidores de la HPPD.

La modificación o modificaciones por mutagénesis dirigida a partir de informaciones deducidas de la estructura tridimensional de una HPPD modelada o determinada por análisis de cristales obtenidos en presencia o ausencia de un inhibidor, pueden realizarse sobre cualquier proteína que posea actividad del tipo de la de la HPPD, es decir, que transforme el 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato, cuya región codificante esté o pueda ser clonada. Las HPPD descritas en la presente solicitud de patente son, entre otras, las de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* y *Synechocystis*, pero, bien seguro, es evidente para los expertos en la materia que todas estas modificaciones pueden aplicarse a las otras HPPD.

Ejemplo 5

Expresión de HPPD mutantes de Pseudomonas fluorescens en el tabaco

A) Construcción de genes quiméricos

pRP-VB3: El ADN del vector binario pBI121 (Clontech) se sometió a digestión con HindIII y XbaI, y los extremos fueron completados con dNTP por medio de la pfu polimerasa (Stratagène) y el vector purificado. El ADN del clon pRP-S descrito en el ejemplo 2 de la solicitud de patente en la solicitud PCT 96/38567 y que comprendía el encadenamiento "promotor doble histona-TEV-OTP-gen HPPD-terminador Nos" fue sometido a digestión con HindIII y SacI, los extremos completados con dNTP por medio de la pfu polimerasa (Stratagène) y la inserción fue purificada y luego ligada en el vector purificado anteriormente descrito. La orientación se verificó por digestión con Sall. El clon pRP-VB3 tiene, por tanto, la estructura del gen quimérico siguiente:

RB/promotor Nos/NPTII/terminador Nos/promotor doble histona/tev/otp/HPPD/terminador Nos/LB

RB LB=margen derecho e izquierdo respectivamente del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*

promotor Nos = promotor de la nopalina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*

NPTII = secuencia codificante de la neomicina-fosfotransferasa de tipo II (que confiere resistencia a la kanamicina)

terminador Nos = secuencia terminadora de la nopalina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*

promotor doble histona = descrito en el documento EP 507 689

tev = intensificador TEV (Carrington y Freed)

otp = péptido de tránsito optimizado (documento EP 508 909)

pRP-VB3-b: El ADN del clon pRP-VB3 se sometió a digestión con BamHI purificado y después se ligó en el vector pZERO-1 (Invitrogen) que no contiene los sitios de restricción BstEII y SalI, se sometió a digestión con BamHI y se purificó. Una parte del OTP, el gen de la HPPD y el terminador Nos son transferidos de este modo al pZERO-1.

5 *pRP-VB3-c*: El ADN del clon pRPVB3-b se sometió a digestión con SalI y después se ligó en presencia del adaptador que se indica a continuación (oligonucleótidos 14 y 15-SEQ ID NO 14 y 15 anexas), para reemplazar el sitio de restricción SalI por el sitio BstEII.

5' TCGAGAGAGAGGTGACCGAGAGA 3'

10

3' CTCTCTCCACTGGCTCTCTAGCT 5'

pRP-VB3-d: El ADN del clon pRP-VB3-c fue digerido con BamHI, se purificó la inserción y después fue clonado en el vector PUC19 (Biolabs) digerido con BamHI, Una parte del OTP, el gen de la HPPD y el terminador Nos son transferidos de este modo a PUC19.

pRP-VB3-e: El vector PUC19 que no posee los sitios de restricción PmlI y StuI, el ADN del clon pRP-VB3-d, fue digerido con PmlI y StuI, purificado y ligado después sobre el mismo permitiendo así suprimir el sitio Not en el gen de la HPPD y trancar la parte codificante de la HPPD de 500 pares de bases aproximadamente, con el fin de facilitar después la selección de colonias transformadas que tienen integrada las HPPD mutantes.

pRP-VB3-f: El vector pRP-VB3-e fue digerido con NotI, los extremos fueron completados con dNTP con ayuda de la pfu polimerasa (Stratagène), se purificó, se sometió a digestión con BamHI, se purificó y después se clonó en el vector PUC19 digerido con KpnI, los extremos fueron completados con dNTP con ayuda de la Pfu polimerasa (Stratagène), purificado, digerido con BamHI, purificado.

pRP-VB83-g: El ADN del clon pRP-VB3 se sometió a digestión con BstEII, los extremos fueron completados con dNTP con ayuda de la pfu polimerasa (Stratagène), el vector fue purificado y después ligado sobre sí mismo, permitiendo de este modo la desaparición del sitio único BstEII de este vector.

30

pRP-RD224: El ADN del clon pRP-VB3-f fue digerido con BamHI y SacI, purificado, ligado después en el vector pRP-VB3-g, digerido con BamHI y SacI y purificado. El clon pRP-RD224 por tanto, tiene la estructura siguiente:

35

RB / promotor Nos / NPTII/terminador Nos / promotor doble histona / tev / otp / HPPD
truncada / terminador Nos / LB

40

pRP-RD224 mutantes: Los ADN de los vectores que llevan las HPPD mutadas así como la HPPD sin mutar, contenidos en el vector PKK233-2, fueron digeridos con KpnI y BstEII, purificados y después ligados en el vector pRP-RD224, digerido con KpnI y BstEII y purificado. Los transformantes que tenían integrado el gen de la HPPD mutada fueron seleccionados por el tamaño de la inserción por digestión con KpnI y BstEII. Los clones obtenidos fueron designados como pRP RD224, a lo que se añade el tipo de mutación efectuada sobre la HPPD, creándose así, por ejemplo, pRP RD224 Pf (para la enzima sin mutar), pRP RD224 PfD336 (para la enzima con un ácido aspártico en 336), pRP RD224 PfQ336 (para la enzima con una glutamina en 336), pRP RD224 PfL333 (para la enzima con una leucina en 333), pRP RD224 PfA334-A336 (para la enzima con una alanina en 334 y en 336, mutante doble).

45

50 B) Transformación del Tabaco "Petit havana"

Los genes quiméricos descritos anteriormente fueron transferidos a tabaco "Petit havana" según los procedimientos operatorios de transformación y regeneración ya descritos en la solicitud de patente europea EP nº 0 508 909.

55 1) Transformación

El vector se introduce en la cepa no oncógena de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

60 2) Regeneración

La regeneración del tabaco "Petit havana" a partir de explantes foliares, se realiza sobre un medio de base Murashige y Skoog (MS) que comprende 30 g/l de sacarosa así como 350 mg/l de cefotaxima y dosis variables de la 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-diona (documento EP 496630), 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, que es un análogo de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona o directamente dosis de 2 ó 4 u 8 ppm de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona. Los explantes foliares son obtenidos de plantas en invernadero y transformados según la técnica de los discos foliares (Science, vol. 227, páginas 1229-1231, 1985) en tres etapas sucesivas:

65

ES 2 308 820 T3

- la primera comprende la inducción de brotes sobre un medio MS adicionado con 30 g/l de sacarosa conteniendo 0,05 mg/l de ácido naftilacético (ANA) y 2 mg/l de bencilaminopurina (BAP) durante 15 días, y dosis variables de herbicida, la 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-diona (documento EP 496630) o la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona.

- los brotes verdes formados durante el transcurso de esta etapa son desarrollados seguidamente por cultivo sobre un medio MS adicionado con 30 g/l de sacarosa y dosis variables de herbicida, pero sin contener hormona, durante 10 días.

- Después se retiran los brotes desarrollados y se los cultiva sobre un medio de enraizamiento MS con contenido mitad de sales, vitaminas y azúcares y dosis variables de isoxaflutol y sin contener hormona. Al cabo de 15 días aproximadamente, los brotes enraizados se hacen pasar a tierra.

C) Medida de la tolerancia al herbicida de las plántulas *in vitro*

Las experiencias se llevan a cabo por acción de un agente de selección con los mutantes indicados en la tabla siguiente y muestran que si no se obtienen brotes/plántulas a las dosis más elevadas de herbicida en los ensayos de transformación/regeneración con una HPPD sin mutar, por el contrario los mutantes permiten gracias a una mejor tolerancia de la enzima, obtener plántulas incluso a dosis elevadas de la 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-diona (documento EP 496 630) o de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona de las plántulas (véase la tabla recapitulativa). Estas plántulas obtenidas con fuerte concentración del agente de selección con una HPPD mutada y que no se pueden obtener con la HPPD nativa son completamente normales.

Durante la selección *in-vitro* sobre la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil) propan-1,3-diona a 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm y 8 ppm, se muestra que un cierto número de mutantes no permiten la regeneración fácil de plántulas de tabaco transformadas, sea cual sea la dosis de herbicida empleada. Se apreciará sin embargo que los transformantes se podrán obtener con un número más grande de ensayos de transformación y/o determinando las concentraciones de agente de selección.

Por el contrario, con otros mutantes es fácil obtener plántulas verdes y por tanto completamente normales. Los mutantes que proporcionan más plántulas son los mutantes Pfl215, Pfd336 y PfQ336 (para los mutantes estudiados según este procedimiento).

Durante la transformación con Pfd336,

se ha obtenido 25% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 1 ppm
se ha obtenido 25% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 2 ppm,
se ha obtenido 35% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 4 ppm,
se ha obtenido 15% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 8 ppm.

Durante la transformación con Pfl215,

se ha obtenido 8% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 1 ppm,
se ha obtenido 60% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 2 ppm,
se ha obtenido 8% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 4 ppm,
se ha obtenido 24% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 8 ppm.

Durante la transformación con PfQ336,

se ha obtenido 35% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 1 ppm.
se ha obtenido 25% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 2 ppm.
se ha obtenido 40% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 4 ppm.
se ha obtenido 0% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 8 ppm.

ES 2 308 820 T3

Durante la transformación con la HPPD no mutada,

se ha obtenido 15% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 1 ppm.

se ha obtenido 70% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 2 ppm.

se ha obtenido 15% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 4 ppm.

se ha obtenido 0% de los sucesos de transformación que toleran la selección hecha a 8 ppm.

Estos resultados vienen por tanto a confirmar que las HPPD mutadas son estadísticamente más eficaces que la HPPD nativa, con los dos mutantes PfD336 y PfL215 es posible obtener transformantes a la dosis más alta de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil) propan-1,3-diona, mientras que esto no es posible con la HPPD no mutada.

Además, con el mutante PfQ336, se obtienen numerosos elementos de transformación a 4 ppm de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil) propan-1,3-diona, 40% de las plántulas, mientras que con la HPPD nativa se obtiene un porcentaje bajo de la plántulas a 4ppM de este herbicida.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla recapitulativa de mutantes de la HPPD de *P. fluorescens*

	Tipo de HPPD	Actividad en ensayo de detección con una dosis de agente de selección de		% de plántulas verdes obtenidas a la dosis de x ppm de herbicida
		0 mM	7mM	
5				
10	Nativa	10	0	15% a 4ppm
	Mutada			
	PfL215	10	7	24% a 8ppm
15	PfE298	8	3	No plántulas verdes
	PfL333	5	4	-
	PfW333	-	-	No plántulas verdes
20	Pf5334	7	7	No plántulas verdes
	PfD334	1	1	-
	PfW334	6	6	-
25	PfP334	5	5	No plántulas verdes
	PfL334	5	4	No plántulas verdes
30	Pf1334	5	4	No plántulas verdes
	PfS336	-	-	-
	PfD336	2	1	15% a 8ppm
35	PfQ336	8	8	40% a 8ppm
	PfE336	10	8	-
	PfW336	10	9	-
40	PfI336	10	8	-
	PfL337	8	8	No plántulas verdes
	PfA334-A336	8	8	-
45	PfA334-R336	8	7	No plántulas verdes
	PfS334-R336	5	5	No plántulas verdes

* : ensayo de detección descrito en el ejemplo 1.

'-' datos no disponibles.

La cifra 10 corresponde a una actividad fuerte del mismo nivel que la de la HPPD sin mutar y sin inhibidor; la cifra 0 corresponde a una actividad nula, o bien debida a una inhibición completa por la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona, o bien debida a una mutación que implica la no actividad de la enzima; las cifras 1 a 9 corresponden a actividades intermedias más fuertes cuando la cifra aumenta en el ensayo de evaluación descrito en el ejemplo 1.

Estos resultados confirman que la introducción de una HPPD que presenta tolerancia a los inhibidores de actividad de HPPD en las plantas, las comunica una tolerancia a estos mismos inhibidores, tolerancia que parece, por tanto, mejor que la obtenida con una HPPD sin mutar.

D) *Tolerancia in-vivo*

Todas las plantas, después de arraigo, se han aclimatado en invernadero y se llevan a semillas.

Las semillas de varias cápsulas se mezclan, a continuación se siembran en una mezcla de tierra y de arena, a razón de 100 semillas aproximadamente por barqueta de semillas. El genotipo nativo Petit Havana se incluye como testigo. Los tratamientos se efectúan a razón de 600 g/ha de isoxaflutol formulado. Las anotaciones de aspecto de la semilla se realizan después de 12 días de tratamiento, siendo la nota 5 para el mejor aspecto, la nota 1 para el peor. Los valores medios de las observaciones de varios sucesos de transformación (10-20 sucesos de transformación por HPPD evaluada) son representativos de los valores de tolerancia de pre-emergencia de la HPPD nativa y de las HPPD mutadas.

Estas medidas efectuadas para varios mutantes de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* sobre las posiciones 336 y 215 permiten establecer los valores medios de tolerancia en la tabla a continuación.

Ensayo	1	2
Pf no mutada	2,06	2,2
PfW336	-	2,8
PfD336	3,35	-
PfQ336	2,94	-
PfL215	3	-

Estos resultados muestran que las HPPD mutadas según la invención presentan en la plantas transformadas una tolerancia a los herbicidas inhibidores de la HPPD superior a la tolerancia obtenida con la HPPD nativa correspondiente.

Ejemplo 6

Mutagénesis dirigida del gen de la HPPD de Synechocystis

Se escogió un sitio de mutación eficaz sobre la HPPD de *Pseudomonas fluorescens* en términos de tolerancia a los inhibidores de la HPPD y los transposones a otra HPPD.

Esta transposición se hace en una HPPD lo más divergente posible de la HPPD de *Pseudomonas fluorescens* y de las otras HPPD conocidas. Para llevar esto a cabo se trabaja con el gen que codifica la HPPD de *Synechocystis* conocido gracias a la secuenciación sistemática del genoma de esta cianobacteria nunca clonada tal cual. Por consiguiente, se aisló en primer lugar el gen y después se le hizo expresarse en *E. coli*.

1) *Obtención del gen*

El ADN genómico de la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 se extrajo y se purificó utilizando los protocolos estándar. 200 µg de este ADN genómico se amplificaron mediante reacción de polimerización en cadena (PCR) utilizando 1,25U de polimerasa (Böhringer) en su tampón, en un volumen de reacción de 50 µl con dNTP (desoxirribonucleótido-trifosfato) 200 µM. Las secuencias de los oligonucleótidos sintéticos 16 y 17 (SEQ ID NO 16 y 17 que figuran anexas) utilizadas como cebadores fueron deducidas de la secuencia publicada en Genbank de la HPPD de *Synechocystis*.

Oligo 16 ATTATGGAAT TCGACTATCT T

Oligo 17 CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

El programa de amplificación, 5 minutos a 94°C y después 50 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto 49°C, 1 minuto 72°C y después 5 minutos a 72°C, fue realizado en un aparato Perkin-Elmer 9600.

2) Clonación del gen y expresión

El fragmento amplificado obtenido por PCR fue purificado, digerido con EcoRI, vuelto a purificar y después clonado en el vector pcr-99A (Pharmacia) previamente digerido con EcoRI y SmaI. La bacteria JM105 fue transformada por el plásmido recombinante. La secuenciación permitió verificar la conformidad del fragmento clonado con la secuencia de la HPPD de *Synechocystis* publicada.

La actividad de dioxigenasa de la HPPD de *Synechocystis* así obtenida fue observada mediante el oscurecimiento del medio, utilizando el ensayo colorimétrico anteriormente descrito (véase el ejemplo 1) con adición de IPTG (isopropil- β -D-tio-galactopirazonida) a la concentración de 1 mM con el fin de inducir la expresión de la proteína. En las mismas condiciones, sobre un medio que contiene 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona 7 mM, no hubo oscurecimiento del medio, lo que confirma la inhibición de la actividad de HPPD de *Synechocystis* por la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona.

3) Mutagénesis dirigida

Por alineación de las secuencias protéicas de la HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 y de la HPPD de *Synechocystis* PCC6803, se ha estimado que las Glicinas en las posiciones 334 y 336 de la HPPD de *Pseudomonas* (glicinas indicadas por estrellas en la figura del ejemplo 3 y que están fuertemente conservadas) están en las posiciones 318 y 320 sobre la HPPD de *Synechocystis* (en grueso sobre la alineación de las secuencias proteicas de la figura 3).

Habiéndose obtenido varios mutantes de la posición 334 en la *Pseudomonas fluorescens*, se llevaron a cabo dos experiencias de mutagénesis dirigida (U.S.E., Pharmacia), utilizando los oligonucleótidos MUGLYA y MUGLYB, destinadas a reemplazar la Glicina en posición 318 (de *Synechocystis* correspondiente a la glicina en posición 334 de *P. fluorescens*) o bien por Asparagina o Serina, o bien por Prolina o Alanina (SEQ ID NO 18 y 19).

GLY318, reemplazo posible por SER & ASN

Oligo 18 CGGGCAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

GLY318, reemplazo posible por PRO & ALA

Oligo 19 CGGGCAAAG GATTSCNCA AGGAACTTT CAAG

En las dos experiencias, clones obtenidos con la mutagénesis provocaron el oscurecimiento del medio de selección de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,2-diona 7 mM (ensayo descrito en el ejemplo 1). Fue secuenciado un mutante de cada experiencia.

Glicina 318 reemplazada por asparagina, denominado SyN318 similar al PfD334 (en el ejemplo 3).

Glicina 318 reemplazada por alanina, denominada SyA318 similar al PfA334 (en el ejemplo 3).

Estos resultados confirman que las mutaciones que conducen a una tolerancia puesta de manifiesto por una HPPD dada, son transportables a otra HPPD de otra especie, de otro reino.

Estos resultados confirman, asimismo, que las modificaciones de la secuencia protéica en la parte C-terminal de una HPPD cualquiera que sea su origen (bacteriano u otro) pueden llevar consigo una tolerancia mejorada a los inhibidores de HPPD.

Ejemplo 7

Estudio bioquímico de una HPPD mutada, mutantes de *Synechocystis*

Han sido estudiado los mutantes SyN318 y SyA318 obtenidos en el ejemplo anterior, en comparación con la HPPD sin mutar de *Synechocystis* por las características bioquímicas Km e I50 frente a un inhibidor de la HPPD que es la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona. Este análisis fue llevado a cabo utilizando el protocolo siguiente:

a) Medida de la actividad

La actividad de HPPD se mide determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la cantidad de producto formado, es decir, de homogentisato, después de incubación de la enzima con su sustrato, el HPP. La inyección de diferentes dosis de homogentisato que varían de 12 a 48 nmoles en la columna, permite determinar el tiempo de retención del homogentisato y correlacionar el área del pico con la cantidad de producto inyectado.

ES 2 308 820 T3

Las medidas de actividad se realizan en un volumen final de 200 μ l que contiene: ascorbato a 12,6 mM, hierro ($\text{FeH}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 178 μ M (preparado con anterioridad en tampón Tris-acetato 0,1 M, pH 6), 50 μ g de extracto crudo conteniendo la HPPD, el HPP a 352 μ M y tampón Tris-acetato 0,1 M, pH 7,5. La enzima se incuba 1 minutos a 30°C con, en un primer momento, el hierro y después de 5 minutos a 30°C con el ascorbato antes del comienzo de la reacción por adición del sustrato, el HPP. La incubación se prosigue durante 1,5 minutos a 30°C y después se detiene la reacción por adición de 70 μ l de ácido perclórico al 20%. Seguidamente se eliminan las proteínas por centrifugación durante 5 minutos a 15300 rpm a 20°C. Se recupera el sobrenadante. La cantidad de homogenisato formado se analiza entonces por inyección de 75 μ l del ensayo en una columna Pico Tag C18 conectada al sistema HPLC. La elución se lleva a cabo con un caudal de 1 ml/min. La elución isocrática realizada es la siguiente: 1-0% de tampón B (o sea 100% de tampón A: agua, acetonitrilo 3% (v/v), ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) durante 6 minutos; 2-100% de tampón B (acetonitrilo 100%) hasta el minuto 11; 3-0% de tampón B hasta el minuto 19. A la salida de la columna, el homogenisato se detecta por medida de la absorbancia a 288 nm. La cantidad de producto formado viene definida por el área del pico sobre el cromatograma.

b) Determinación de la K_M

La K_M de la HPPD para el HPP se determina midiendo la velocidad inicial de la reacción con diferentes concentraciones de HPP. Las reacciones se llevan a cabo en las condiciones anteriormente descritas con concentraciones de HPP que van desde 5,5 μ M a 1400 μ M.

c) Determinación de la IC_{50}

La IC_{50} se determina por medida de la velocidad inicial de la reacción en las condiciones anteriormente descritas, después de incubación de la enzima durante 10 minutos a 30°C con el hierro, el ascorbato, el sustrato a concentración 1056 micromolar y concentraciones variables de inhibidor. Las concentraciones de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona utilizadas varían desde 10^{-10} a 10^{-4} M.

Los valores de K_m estimados de la enzima para su sustrato, es decir, el 4-hidroxifenilpiruvato, y los valores de I_{50} estimados a actividades comparables, se indican en la Tabla siguiente:

	HPPD nativa	SyN318	SyA318
Km	60 μ M	470 μ M	320 μ M
I50	80nM	80 μ M	40 μ M

Estos resultados confirman que las mutaciones realizadas en la parte C-terminal de la proteína, si influyen disminuyendo la afinidad de la enzima para el sustrato (K_m), influyen todavía más fuertemente en la disminución de la enzima para el inhibidor (I_{50}). En efecto, la relación I_{50} de una HPPD mutante sobre la I_{50} de la HPPD no mutante (que es la imagen de la pérdida de afinidad para el inhibidor) es de 1000 y 500 para SyN 318 y SyA 318, respectivamente, mientras que la relación K_m de una HPPD mutante sobre K_m de la HPPD sin mutar (que es la imagen de la pérdida de afinidad para el sustrato) es de 8 y 5 para SyN 318 y SyA 318, respectivamente. Esta es la ejemplificación de que estos dos mutantes poseen una afinidad un poco menor para el sustrato de la enzima, pero sobre todo una afinidad muy claramente más pequeña para los inhibidores de la enzima de la cual, la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona es un ejemplo.

Estos resultados confirman que el ensayo de selección colorimétrica descrito en el ejemplo 1, permite detectar HPPD mutadas que presentan una tolerancia a los inhibidores de actividad de la HPPD. Los resultados validan el útil que se utiliza para seleccionar e identificar mutantes de la HPPD tolerantes a los inhibidores de la HPPD. Este útil de selección es rápido y sencillo de utilizar y es por esto por lo que se le utiliza, pero queda claro que cualquier otro útil puede ser utilizado para realizar una análisis similar; sería posible utilizar:

- un útil de selección que mida la actividad y su inhibición basado en la desaparición de HPP (valoración radiactiva, valoración espectrofotométrica u otra) o basado en el consumo de oxígeno o basado en la aparición de homogenisato (con acoplamiento de otra actividad enzimática);

- un útil de selección vivo, tal como, por ejemplo, el crecimiento de bacterias sobre HPP como única fuente de carbono, en presencia de inhibidores de la HPPD, que permita seleccionar los clones aislados con una HPPD tolerante;

- es, incluso, totalmente considerable utilizar una selección viva en las plantas utilizando vectores de transformación de plantas, sistemas de transformación, sistemas de regeneración y de selección con un inhibidor de la HPPD, como los descritos en los ejemplos 5 y 8.

Ejemplo 8

Evaluación de la HPPD de Synechocystis sin mutar y mutada, SyN318 y mutada SyA318, en el tabaco

A) Construcción de genes quiméricos

El vector utilizado para realizar la construcción que permite la expresión de la HPPD de *Synechocystis* (nativa o mutante) en las plantas de tabaco del tipo PBD6 se llama pRD224 (descrito en el ejemplo 5). Este vector fue concebido inicialmente para clonar todos los mutantes de la HPPD de *Pseudomonas* por simple reemplazo del gen de la HPPD truncada de este vector al nivel de los sitios KpnI y BstEII. Igualmente puede servir para la clonación del gen de la HPPD de *Synechocystis* con vistas a la creación de una planta transgénica.

B) Estrategia de la clonación

La secuencia que codifica la HPPD de *Synechocystis* es clonada en el vector pRD224 por reemplazo de la secuencia que codifica la HPPD de *Pseudomonas fluorescens* truncada. No obstante, no puede clonarse directamente entre los sitios Kpn I y BstE II, porque las secuencias N-terminales de los genes de HPPD de *Synechocystis* y de *Pseudomonas* son muy diferentes. Pero la clonación entre el sitio BamHI de la OTP y el sitio BstEII es posible. Por ello, es necesario recrear desde el lado 5', aguas arriba de la secuencia HPPD, el sitio BamHI seguido de la parte codificante para la OTP situado aguas abajo de BamHI.

El gen de la HPPD de *Synechocystis* contenido en el vector pTRC 99A es amplificado por reacción de polimerización en cadena (PCR) con ayuda de los cebadores A y B. El oligonucleótido A permite añadir el sitio BamHI aguas arriba del gen de la HPPD así como una parte de la secuencia de la OTP entre el sitio BamHI y el comienzo del gen. El oligonucleótido B permite añadir el sitio BstE II aguas abajo del gen. Los cebadores A y B están indicados en las SEQ ID NO 20 y 21:

oligonucleótido A: 5' NNNNNNNNNN **GGATCC**GGTG CATGGAATTC GACTATCTTC^{3'}

oligonucleótido B: 5' NNNNNNNNNN **GGTCA**CCAGT ATTCATAATG TTAATTATG^{3'}

La reacción de amplificación se lleva a cabo a una temperatura de hibridación de 52°C. Los productos de la PCR se separan seguidamente sobre gel de agarosa. La banda de ADN que corresponde al gen HPPD se corta y luego se purifica.

Los fragmentos amplificados de este modo se someten a digestión con BamIII durante 1 hora a 37°C y después con BstE II durante 1 hora, a 60°C. Esta inserción se aísla seguidamente sobre gel de agarosa. La banda de ADN correspondiente al gen de HPPD se corta y luego se purifica.

Este fragmento se clona seguidamente en el vector binario. Este es digerido previamente con BamHI y BstE II, y después se separa del fragmento correspondiente de la HPPD truncada sobre gel de agarosa. Este vector se purifica entonces del mismo modo que el gen de la HPPD.

La ligación entre el vector binario y la inserción se realiza durante la noche a 16°C mediante la T4 DNA-ligasa. La mezcla de ligación se utiliza para transformar células de *E. coli* DH10B electrocompetentes. Los clones positivos son seleccionados sobre el medio LB que contiene kanamicina a 50 µg/ml. La presencia de la inserción de interés en el vector binario se controla sobre gel de agarosa después de minipreparación y digestión del ADN plasmídico con BamHI y SacI durante 1 hora a 37°C. El vector recombinante se utiliza entonces para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 electrocompetentes. La selección se lleva a cabo sobre medio LB que contiene kanamicina a 50 µg/ml. Este vector recombinante es, por tanto, portador de un TDNA que contiene el gen de resistencia a la kanamicina, y una secuencia codificante para un conjunto OTP-HPPD de *Synechocystis* bajo el control del promotor doble histona y un terminador Nos.

C) Transformación/Regeneración del tabaco, variedad PBD6

La transformación se efectúa como ha sido presentado en el ejemplo 5, salvo que la selección se lleva a cabo primeramente con 200 mg/ml de kanamicina.

Por el contrario, los brotes jóvenes obtenidos sobre kanamicina fueron escindidos y hechos pasar individualmente a un medio desprovisto de hormonas para favorecer su enraizamiento, y que contenía 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona para seleccionar las plántulas transgénicas tolerantes a este herbicida. Se trata del medio MS (SIGMA M-5519 4,4 g/l) conteniendo 350 mg/l de cefotaxina, sacarosa al 1% (p/v) y 0 u 8 ppm de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona. La superproducción de la HPPD en las células transformadas permite el desarrollo de plántulas clorofilicas tolerantes a la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona, mientras que las plántulas que proceden de células no transformadas, sensibles al herbicida, aparecen totalmente blancas.

ES 2 308 820 T3

Después de dos semanas, las raíces están lo suficientemente desarrolladas para que las plántulas puedan ser transferidas a tierra y cultivadas en invernadero.

D) Resultados

A partir de 60 discos foliares por término medio, son regenerados alrededor de 40 brotes para cada construcción. Al cabo de 2 días de cultivo en medio en presencia de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona, algunas plántulas comienzan a blanquear. Después de 8 días de enraizamiento, este blanqueo es bastante significativo para ser interpretable. A 8 ppm de la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona, se comprueba que solo el 40% de las plantas que contienen la enzima nativa habían sobrevivido, contra el 72% para las plantas que contienen la enzima SyA318 y el 88% para las que contienen la enzima SyN318. Las plantas que contienen las enzimas mutadas presentan, por tanto, una mejor tolerancia que las que contienen la enzima nativa.

Al cabo de más de un mes sobre 8 ppm de 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propano-1,3-diona, el número de plántulas verdes para la transformación con la HPPD nativa es 0%, para el SyN318 este porcentaje es 17% y para el mutante SyA318 es 19%.

Paralelamente si la regeneración se lleva a cabo sobre la 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-diona (documento EP 496630), a dosis de 5 a 10 ppm (un inhibidor menos fuerte de las HPPD), los tres genes permiten obtener plantas morfológicamente conformes del todo. Esto confirma si es necesario que la sobreexpresión de una HPPD mutada o sin mutar permita obtener una tolerancia en el laboratorio.

Estos resultados parecen estar de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* por cinéticas enzimáticas y parece posible establecer una correlación entre las medidas bioquímicas *in vitro* y los resultados *in vivo*.

Este último ejemplo confirma la coherencia al menos parcial entre selección *in vitro* (ejemplo 1), análisis bioquímico (ejemplo 6) y tolerancia de una planta.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Hidroxi-fenil piruvato deshidrogenasa (HPPD) mutada, que conserva sus propiedades de catálisis del para-hidroxi-fenil-piruvato (HPP) en homogenisato, menos sensible a los inhibidores de la HPPD que la RHPPD de origen no mutada, **caracterizada** porque comprende al menos una mutación en su parte C-terminal, estando constituida dicha parte C-terminal por la secuencia proteica comprendida entre por una parte el péptido de unión y por otra parte el extremo C-terminal de la enzima.
- 10 2. HPPD mutada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el péptido de unión que representa el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la HPPD se sitúa entre 5 y 15 aminoácidos más arriba del aminoácido Asp161, por referencia a la LHPPD de *Pseudomonas*.
- 15 3. HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada** porque la mutación se efectúa sobre aminoácidos, que son reemplazados por aminoácidos de impedimento estérico superior.
- 20 4. HPPD mutada según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el aminoácido de pequeño impedimento estérico es la glicina (Gly).
- 5 5. HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el aminoácido del sitio de mutación es reemplazado por uno de los aminoácidos siguientes: glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), leucina (Leu), isoleucina (Ile) o triptófano (Trp).
- 25 6. HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque la mutación se efectúa sobre un aminoácido de la parte C-terminal común a varias secuencias de HPPD.
7. HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque comprende en su parte C-terminal, la secuencia peptídica siguiente:
30 -Gly-Phe-Xaa-Yaa-Xab-Asn-Phe-Yab-Yac-Leu-Phe-+
en la que
Xaa y Xab representan independientemente uno del otro, la glicina (Gly) o un aminoácido de impedimento estérico superior a la glicina, entendiéndose que si uno de Xaa o Xab representa Gly, entonces el otro es diferente de Gly,
35 Yaa representa Ala, Lys o Glu,
Yab representa Lys, Ser, Arg o Asn, y
40 Yac representa Ala, Ser, Glu o Gln.
8. HPPD mutada según la reivindicación 7, **caracterizada** porque uno al menos de Xaa o Xab representa Leu, Glu, Trp o Ile.
- 45 9. HPPD mutada según la reivindicación 8, **caracterizada** porque Xab representa Glu, Trp o Ile, de preferencia Trp.
- 50 10. HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada** porque con referencia a la secuencia de HPPD de *Pseudomonas*, los aminoácidos mutados se escogen entre los aminoácidos siguientes: Pro215, Gly298, Gly332, Phe333, Gly334, Gly336 y Asn 337, preferentemente los aminoácidos Pro215 y Gly336.
- 55 11. HPPD mutada según la reivindicación 10, **caracterizada** porque comprende una mutación escogida entre las mutaciones siguientes: Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Trp o Gly336Ile.
12. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada que conserva sus propiedades de catálisis de la HPP en homogenisato según una de las reivindicaciones 1 a 11.
- 60 13. Un gen quimérico que comprende una secuencia codificante así como elementos de regulación en las posiciones 5' y 3' heterólogos que pueden actuar en un organismo hospedante, en particular las células vegetales o las plantas, **caracterizado** porque la secuencia codificante comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada que conserva sus propiedades de catálisis de la HPP en homogenisato tal como se ha definido anteriormente.
- 65 14. Un gen quimérico según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el organismo hospedante se escoge entre las bacterias, por ejemplo *E. coli*, las levaduras, en particular de los géneros *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, *Pichia*, los hongos, en particular *Aspergillus*, los baculovirus o las células vegetales y las plantas.

15. Un gen quimérico según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el organismo hospedante es una célula vegetal o una planta.

5 16. Un gen quimérico según la reivindicación 15, **caracterizado** porque comprende en 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica una HPPD mutada, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito de planta, estando situada esta secuencia entre la región promotora y la secuencia que codifica la HPPD mutada, de modo que permite la expresión de una proteína de fusión péptido de tránsito/HPPD mutada.

10 17. Una proteína de fusión péptido de tránsito/HPPD mutada, estando definida la HPPD mutada según una de las reivindicaciones 1 a 11.

18. Un vector de clonación y/o de expresión para la transformación de un organismo hospedante, **caracterizado** porque contiene al menos un gen quimérico según una de las reivindicaciones 13 a 16.

15 19. Un procedimiento de transformación de un organismo hospedante, **caracterizado** porque se integra de modo estable en dicho organismo hospedante al menos una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 12 o un gen quimérico según una de las reivindicaciones 13 a 16.

20 20. Un procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque el organismo hospedante es una célula vegetal.

21. Un procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado** porque se regenera una planta a partir de la célula vegetal transformada.

25 22. Un organismo hospedante transformado, en particular una célula vegetal o planta, **caracterizado** porque contiene una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 12 o un gen quimérico según una de las reivindicaciones 13 a 16.

30 23. Una célula vegetal, **caracterizada** porque contiene una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 12 o un gen quimérico según una de las reivindicaciones 13 a 16.

24. Una planta transformada, **caracterizada** porque contiene células transformadas según la reivindicación 23.

35 25. Una planta según la reivindicación 24, **caracterizada** porque es regenerada a partir de células transformadas según la reivindicación 23.

26. Una planta transformada, **caracterizada** porque procede del cultivo y/o del crecimiento de plantas regeneradas según la reivindicación 25.

40 27. Plantas transformadas según una de las reivindicaciones 24 a 26, **caracterizadas** porque se escogen entre las monocotiledóneas, en especial los cereales, la caña de azúcar el arroz y el maíz, o las dicotiledóneas, en especial el tabaco, la soja, la colza, el algodón, la remolacha y el trébol.

45 28. Semilla transformada, **caracterizada** porque contiene células transformadas según la reivindicación 23 y porque proviene de una planta transformada según una de las reivindicaciones 24 a 27.

50 29. Un procedimiento de control de las malas hierbas en la superficie de un campo que comprende semillas según la reivindicación 28, o plantas transformadas según una de las reivindicaciones 24 a 27, procedimiento que consiste en aplicar a dicha superficie del campo una dosis tóxica para dichas malas hierbas de un herbicida inhibidor de la HPPD, sin afectar, sin embargo, de modo sustancial a las semillas o a las plantas transformadas con dicho gen quimérico según la invención.

55 30. Un procedimiento de cultivo de las plantas transformadas según una de las reivindicaciones 24 a 27, procedimiento que consiste en plantar las semillas de dichas plantas transformadas según la reivindicación 28, en la superficie de un campo apropiado para el cultivo de dichas plantas, aplicar sobre dicha superficie de dicho campo una dosis tóxica para las malas hierbas de un herbicida que tiene por diana la HPPD en el caso de la presencia de malas hierbas, sin afectar de un modo sustancial a dichas semillas o a dichas plantas transformadas, y recolectar después las plantas cultivadas cuando llegan a la madurez deseada y, eventualmente, separar las semillas de las plantas recolectadas.

60 31. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 29 a 30, **caracterizado** porque el inhibidor de HPPD se escoge entre los isoxazoles, en particular el isoxaflutol, los dicetonitrilos, en particular la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)propano-1,3-diona y la 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3-Cl₂fenil)propano-1,3-diona, las tricetonas, en particular la sulcotriona, o los pirazolinatos.

65

<i>Mus musculus</i>	-----MTTYNN--KGPKPERG-----RFLHFHS
<i>Coccidioides immitis</i>	MAPAADSPTLQ-----PAQPSD-----LN-----QYRGYDH
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	MAPGALLVTSQNGRTSPLYDSDGYVP--APAALVVGGE--VNVRGYHH
<i>Hordeum vulgare</i>	MPPTPTTAA--TGAARAVTPEHARP--HR-MVRFNPRSDRFHTLSFHH
<i>Zea mais</i>	MPPTPTAAAGAAVAAAASAAEQAFRLVGHFNFRNPRSDRFHTLAFHH
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MGHQAAVSE--NQHDDGAASSPGFKLVGFSKFVRKNPKSDKPKVKRFHH
<i>Daucus carota</i>	MGKK-QSEAE--ILSSNSNTSPATFKLVGFNFVRANPKSDFAVKRFHH
<i>Streptomyces avermitilis</i>	-----WTQTTHT-----PDTARQADP-----FPVKGMDA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-----MADLYEN-----PMG-----LMGFSE
Numeración de P. fluorescens	1 1 10
<i>Mus musculus</i>	VTFWVGNAKQAASFYCNKMGFEPLAYKLETGSRREVSVHVKRGIIVFL
<i>Coccidioides immitis</i>	VHNYVGNAKQAATYYVTRMGFERVAYRGLGTGSKAVASHVVRNGNITPIL
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	ASWVGNAKQVAGFYITRMGFEPVAKGLGTGSRFFASHVQNNGVRFVF
<i>Hordeum vulgare</i>	VEFWCADAASAARGFAPALGAPLAARSDLTGNSAHASQLRSGSLFLF
<i>Zea mais</i>	VELWCADAASAARGFSGGLGAPLAARSDLTGNSAHASQLRSGSLFLF
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IEFWCGDATNVARRFSWGLGMRFSAKSDLTGNNMVHASYLLTSGDLRFLF
<i>Daucus carota</i>	IEFWCGDATNTSRFRSNGLGMPLVAKSDLTGNSVHASVLSANLSFVF
<i>Streptomyces avermitilis</i>	VVFAVGNAKQAA-HYSTAFQMQLVAYSGPENGSEHTASYVLTNGSABEVL
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IKLASPTPTLEPFIEMGFTKVATHR-----SKD--VHLYRQGAINLIL
Numeración de P. fluorescens	20 30 40 50
<i>Mus musculus</i>	CSALN-----PWN-----KEMGDHLVKHGQGVKDIAFEVEDC
<i>Coccidioides immitis</i>	TSPLR-SVEQA---SRFP--EDEALLKRIHAHLERHGDGVKDVAFEDCV
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	TSPVRSAROT---LKAAPLADQARLDKMDYDHLDKHGDEVDVAFEDDV
<i>Hordeum vulgare</i>	TAPYANGCDA-----TASLPSFSADAARRFSADHGLAVRSVALRVADA
<i>Zea mais</i>	TAPYANGCDA-----TAAALPSFSADAARRFAADHGLAVRAVALRVADA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TAPYSPSLSAGEIKPTTTASIPSPDHGSCRSFSSHGLGVRAVAIEVEDA
<i>Daucus carota</i>	TAPYSPSTTTSEGS---AAIPSPSASGPFBSFAKHGLAVRALALEVADV
<i>Streptomyces avermitilis</i>	TSVIK--P--A---TPWG-----HFLADHVAEHGCGVVDLAIKVPDA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NNEPH-----S-----VASYFAAEHGPSVCGMAFRVKDS
Numeración de P. fluorescens	60 70 80

FIG 1

Mus musculus	DHIVQKARERGAIVREPWVEQDKFKVKEPAVLQTYGDTTHTLVEKINYT
Coccidioides immitis	ESVFSAAVRNGAEVSEVTVTEDEGQIKMATIRTYGETTHTLIERSGYR
Mycosphaerella graminicola	LAVYENAVANGAESVSSPHSDSCDEGDVISAARKTYGDTTHTFIQRTTYT
Hordeum vulgare	AAAFRRARRGARPAFAPVDLGRG---FAFAEVELYGDVVLRFVSHPDGT
Zea mais	EDAFRASVARGARPAFAPVDLGRG---PRLAEVELYGDVVLRYVSPDGA
Arabidopsis thaliana	ESAFSISVANGAIPSSPPVILNKA---VTIAEVKLYGDVVLRYVSKAED
Daucus carota	AAAFASVARGARPAFAPVELDDQ---AWLADEVLYGDVVLRFVFSFOREE
Streptomyces avermitilis	RAAHAYAIHSGARSVAHPYELKDEHGTGVVLAATATYKTRHTLVDRGTGD
Pseudomonas fluorescens	QKAYKRALSLGAQPTHTIETGPMELN---LPAIKGIGGAPLYLIDRFEGG
	: ** : : : * : :
Numeración de P. fluorescens	90 100 110 120 130
Mus musculus	G---RFLPGFEAPTYKDTLLPKLPCRNLEITIDHIVGNQPDQEMQSASEWY
Coccidioides immitis	G---GFMPGYRMSNADATSKFLPKVVLERIDHCVCNQNDDEMERVCDDYY
Mycosphaerella graminicola	G---PFLPGYRSCITVDSANKFLPPVNLEAIDHCVCNQDWDMSDACDFY
Hordeum vulgare	D---VPFLPGFEGVTNPDADV-----YGLTRFDHVVGNVP---ELAPAAAYI
Zea mais	AG-HFPLPGFEGVASFGAAD-----YGLSRFDHIVGNVP---ELAPAAAYF
Arabidopsis thaliana	TEKSEFLPGFERVEDAS9FP-LD---YGIRLDHAVGNVP---ELGPALTYV
Daucus carota	G---JFLPGFEAVEGTASFDDLD---YGIRLDHAVGNVT---ELGPVVEYI
Streptomyces avermitilis	G---PYLPGYVAAA---PIVEPPAHRFTFOAIDHCVCNVELGRMNEVGFY
Pseudomonas fluorescens	S---SIYDIDFVLESGVDRHP-VG---AGLKIIDLTHNVYGRMAYMANFY
	: .: : : * : : :
Numeración de P. fluorescens	140 150 160 170
Mus musculus	LKNLQFHRFWSVDDTYHTYESSLSIVVTYTES IKMP INEPAPG-RKK
Coccidioides immitis	EKILGFHRFWSVDDKDICTEFSALKSTVNASPNDIVKMP INEPAKG-KKQ
Mycosphaerella graminicola	ERCLGFHRFWSVDDKDICTEFSALKSTVMSPPNQVVKMP INEPAHG-KKK
Hordeum vulgare	AGFTGFHEFAEFTADVDGTTESGLNSVVLANNSEGVLLPLNEPVHGTKRR
Zea mais	AGFTGFHEFAEFTEDVDGTAESGLNSVVLANNSENVLLPLNEPVHGTKRR
Arabidopsis thaliana	AGFTGFHQFAEFTADDVGTAEGLNSAVLASNDEMVLPL INEPVHGTKRR
Daucus carota	KGFTGFHEFAEFTADDVGTAEGLNSVVLANNEMVLLPLNEPVYGTAKK
Streptomyces avermitilis	NKVMGFTNMKEFVGDDIATEYSALMSKVVDAGTLAKVKKF INEPALA-KKK
Pseudomonas fluorescens	KKLFNFREIRYF---DIKGEYTGLTSKAMTAPDGMIRIPLNESSK--GA
	* .: .: : : * * .: : : *
Numeración de P. fluorescens	180 190 200 210 220

FIG 1 (siguiente)

<i>Mus musculus</i>	SQIQBYVDYNGAGVQVHIAKTEDIITAIRHLRR-----GTFFLAAP-SS
<i>Coccidioides immitis</i>	SQIESYVDFYNGAGVQVHIALRTNNIIDAITNLKAR-----GTEFIKVP-ET
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	SQIESYVDFYNGPGVQVHIALRTPNIIIEAVNLSR-----GVEFISVP-DT
<i>Hordeum vulgare</i>	SQIQTFLEHHGGPGVQVHIAVASSDVLRTLRNKRARSAMGGDFLPPPLPK
<i>Zea mays</i>	SQIQTFLEHHGGPGVQVHMALASDDVLETLRDMQARSAMGGFEFMAPPTSD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SQIQTYLHNHAGAGLOHLALMSHDI FRTLNRNKRSSIGGDFMPSPPPT
<i>Daucus carota</i>	SQIQTYLHNHAGAGVQHLALVSEDI FRTLNRNKRSSICGGFEFMPSPPT
<i>Streptomyces avermitilis</i>	SQIDRYLFFYGGAGVQVHIALNTGDI VETVTRMAA-----GVQFLDTP-DS
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GQIESFLMQFNGEGIQHVAFSLDDDLIKTMDHLKSI-----GMRPMTAPPDT
	.*.*: : : * : * : * : : : : : : : : * : * : *
Numeración de P. Fluorescens	230 240 250 260 270
<i>Mus musculus</i>	YYKLIRENLKSAKIQKESMDVLEELHILVD-YDEKG---YLLQIFTKPM
<i>Coccidioides immitis</i>	YYEDNKKIRLKKQGLVLDHDPETLKSILID-IDENG---YLLQLFTKHL
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	YYENNRRLKRAAGMKLERSFDIQLNIIID-FDEGG---YLLQLFTKPL
<i>Hordeum vulgare</i>	YYGVRRLAG--DVLSEAQIKSQELGLVD--RDDQG---VLLQIFTKPV
<i>Zea mays</i>	YYDGVRRAG--DVLTEAQIKSQELGLVD--RDDQG---VLLQIFTKPV
<i>Arabidopsis thaliana</i>	YYQNLKRVG--DVLSDQIKKCEHILGLVD--RDDQG---TLLQIFTKPL
<i>Daucus carota</i>	YYQLKNRVG--DVLSDQIKKCEHILGLVD--RDDQG---TLLQIFTKPV
<i>Streptomyces avermitilis</i>	YYDTLGEHWG---DTEVPVDTLRKLILAS--RDEHG---YLLQIFTKPV
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	YYEMLEGRLP---NHGEFVGLQARGILLGSSSESGDKRLILQIPSETL
	***: : : * : * : * : : : * : * : * : : :
Numeración de P. fluorescens	280 290 300 310
<i>Mus musculus</i>	QDRPTLFLEVIQR-----H-----NHQQFGAGNFSLFKAFEE-E
<i>Coccidioides immitis</i>	MDRPTVFIEIQR-----N-----NESGFGAGNFRALFEAIER-E
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	MDRPTVFIEIQR-----N-----NEDGFGAGNFKSLFEAIER-E
<i>Hordeum vulgare</i>	GDRPTLFLEMIQRI GCTBKDERGEYQKGGGFGKGNFSELFKSIEDYE
<i>Zea mays</i>	GDRPTLFLEMIQRI GCTBKDERGEYQKGGGFGKGNFSELFKSIEDYE
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GDRPTFPIHIIQRVGCNKDEGKAYQSGCGGFGKGNFSELFKSIEYE
<i>Daucus carota</i>	GDRPTFPIHIIQRVGCNKDDAGQMYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEYE
<i>Streptomyces avermitilis</i>	QDRPTVPFPIIER-----H-----GSMGFGKGNFKALFEAIER-H
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MG--PVFFPIQR-----K-----GDDGFGEGNFKALFESIER-D
	. . : : * : * : *
Numeración de P. fluorescens	320 330 340

FIG 1 (siguiente)

Mus musculus	QALRGNLTDLPPNGVRSGM
Coccidioides immitis	QALRGTLI-----
Mycosphaerella graminicola	QDLRGNI-----
Hordeum vulgare	KSLEAKQS----AAVQGS--
Zea mays	KSLEAKQAAAAAAQAQGS--
Arabidopsis thaliana	KTLEAKQLVG-----
Daucus carota	KTLEAKQITGSAAA-----
Streptomyces avermitilis	QEKRGNI-----
Pseudomonas fluorescens	QVRRGVLSVD-----
	: ..
	!
Numeración de P. fluorescens	350

FIG 1 (fin)

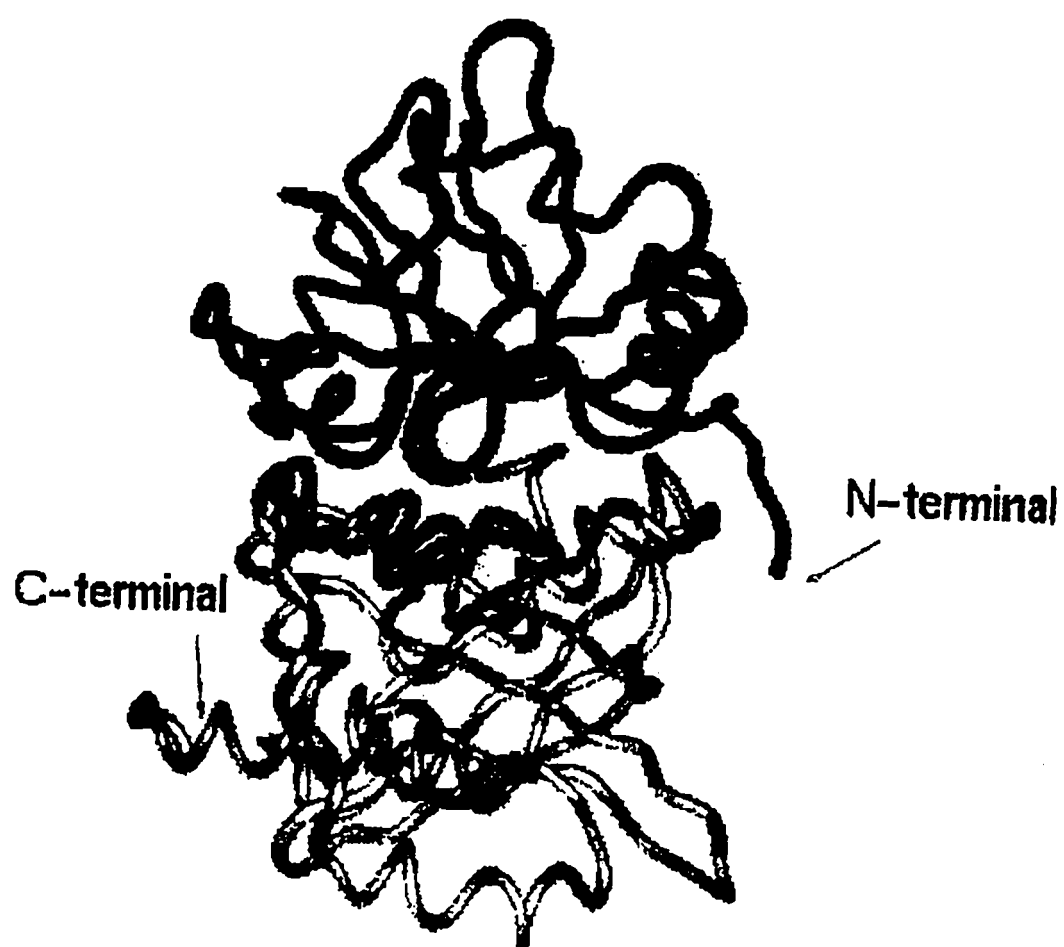


FIG 2

ES 2 308 820 T3

Seq_1: HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (Bacteria) 357 aa

Seq_2: HPPD de *Synechocystis* (Cyanobacteria) 339 aa

Seq_1 MADLYENPMGL MGFEFIELAS PTPNTLEPIF E.IMGFTKVA THRSKD..VH

Seq_2 MEFDYLHLYV DDYQSAHRCY QRQWGFTCVN KIITDQGITG

Seq_1 LYRQGAINLI LMNEPHSVAS Y..FAAEHGP SVCGMAFRVK DSQKAYKRAL

Seq_2 IYQOGQILLI ISASESSLR YADYLQKHPG GVGEVAVQVA NWQKIQHQLS

Seq_1 ELGAQPIHIE TGPMEINLPA IKGIGGAPLY LIDRFGEBS IDIDEVFLE

Seq_2 EL...Q.IE TTPVIH..PL TKAEGLTFL WGDVH...HS IYPVRSELNQ

Seq_1 GVDRHPVGAG LKIIDLHLEN VYGRMAYWA NFYEKLEFNR EIRYFDIKGE

Seq_2 NKTILH..GVG LTTIDHVVLN IADQFTQAS QWYQQVFGWS VQQSFTVNTF

Seq_1 YTGLTSKAMT APDGMIRIPL NESSSKGAGQ IEEFLMQFNG EGIQHVAFLS

Seq_2 HSGLYSEALA SANGKVQFNL NCPTNN..SSQ IQTFLANNHG AGIQHVAFST

Seq_1 DDLIKTWDL KSGMRFMTA PPDYYEMLE GRLPNHG.RP VGELQARGIL

Seq_2 TSITRTVAHL RERGVNFKI PTGYYQQRN SSYFNYSLD WDTLQCLBIL

Seq_1 LDGSSESGDK RLLQIFSET LMGP..VFFE PIQRKG.DDG FGEGNFKALF

Seq_2 LDDQDNTG.E RLLQIFSQP CYGVGTLFWE IERRHRKAG FGQGNFQALY

* *

Seq_1 ESIERDQVRR GVLSTD

Seq_2 EAVETLEKQL EVP..

FIG 3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: RHONE-POULENC AGROCHIMIE

(B) CALLE: 14-20 Rue Pierre BAIZET

(C) CIUDAD: LYON

(E) PAIS: Francia

(F) CÓDIGO POSTAL: 69009

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Hidroxi-fenil piruvato dioxigenasa mutada, secuencia de ADN y obtención de plantas que contiene tal gen, tolerantes a los herbicidas

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 21

(iv) FORMA DESCIFRABLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA DE EXPLOTACIÓN: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (OEB)

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT 33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

GAAGTTGCCC TCGCCRAKCC CATCGTCGCC CTT 33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

ES 2 308 820 T3

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

CTTGAAGTTG CCCTCCCAA ACCCATCGTC GCC 33

10 (2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

15 (B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

25 **CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC 33**

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

35 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC 33

45 (2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

50 (B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

60 **CTTGAAGTTG CCCTCRAKAA ACCCATCGTC GCC 33**

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

ES 2 308 820 T3

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC 33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC 33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC 33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA TC 32

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

ES 2 308 820 T3

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

CGCTTGAAGT TNNNCTCNNN AAACCCATCG TC

32

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

GAACAGCGCC TTGAARAKGC CCTCGCCAAA CCC

33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

GCCTTCCACG GAAGATTCGT CCAGCAGGAT ACC

33

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

TCGAGAGAGA GGTGACCGAG AGA

23

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

ES 2 308 820 T3

- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

TCGATCTCTC GGTCACCTCT CTC

23

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

ATTATGGAAT TCGACTATCT T

21

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

23

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

CGGGCAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 308 820 T3

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

CGGGCAAAG GATTSCNCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

rf2J1Nrf2JNtJNNN GGATCCGGTG CATGGAATTC GACTATCTTC

40

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURATION: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

NNNNNNNNNN GGTCACCAGT ATTCATAATG TTAATTATG

39