

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1-20, en donde la proteína tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:22-63.
3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-20.
4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en donde el promotor heterólogo es funcional en una célula vegetal.
5. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 4 en donde la secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica una secuencia diana que funciona para localizar una proteína unida operativamente dentro de una célula.
6. Una construcción de ADN que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
7. La construcción de ADN de la reivindicación 6 en donde el ADN recombinante comprende una molécula de ADN unida operativamente que codifica una secuencia diana que funciona para localizar la proteína dentro de una célula.
8. La construcción de ADN de la reivindicación 7 en donde la

proteína confiere tolerancia a herbicidas a dicha célula.

9. La construcción de ADN de la reivindicación 6 en donde la construcción de ADN está presente en el genoma de una planta, semilla o célula transgénica.

10. Un polipéptido recombinante que comprende al menos el 85 % de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de aminoácidos elegida de SEQ ID NO:1-20, en donde el polipéptido tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.

11. Una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

12. La planta, semilla, célula o parte de planta transgénica de la reivindicación 11 en donde la planta, semilla, célula o parte de planta transgénica comprende un rasgo de tolerancia a herbicida transgénico adicional.

13. La planta, semilla, célula o parte de planta transgénica de la reivindicación 11 definida con tolerancia a herbicidas a al menos un herbicida PPO.

14. Una semilla de acuerdo con la reivindicación 11.

15. Una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica que comprende el polipéptido recombinante de la reivindicación 10.

16. Un método para conferir tolerancia a herbicida a una planta, semilla, célula o parte de planta que comprende: expresar heterológamente en dicha planta, semilla, célula o parte de planta el polipéptido recombinante de la reivindicación 10.

17. El método de la reivindicación 16 en donde dicha planta,

semilla, célula o parte de planta comprende actividad de protoporfirinógeno oxidasa conferida por el polipéptido recombinante.

18. El método de la reivindicación 16 en donde la tolerancia a herbicidas es a al menos un herbicida PPO seleccionado del grupo que consiste en: acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin, azafenidin, etilcarfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100.

19. Un método de transformación de plantas que comprende las siguientes etapas:

- a) introducir la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en una célula de planta; y
- b) regenerar una planta de allí que comprende la molécula de ADN recombinante.

20. El método de la reivindicación 19 que además comprende la etapa de seleccionar una planta tolerante a al menos un herbicida PPO.

21. El método de la reivindicación 19 que además comprende la etapa de cruzar la planta regenerada con ella misma o con una segunda planta y recoger semillas del cruce.

22. Un método para controlar malezas en un área de crecimiento vegetal que comprende poner en contacto un área de crecimiento vegetal que comprende la planta o semilla transgénica de la reivindicación 11 con al menos un herbicida PPO, en donde la planta o semilla transgénica es tolerante al herbicida PPO y en donde las malezas son controladas en el área de crecimiento vegetal.

23. Un método para identificar una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa, el cual método comprende:

a) transformar una cepa *E. coli* que tiene una inactivación de gen para la enzima de PPO de *E. coli* natural con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína de tolerancia a herbicidas candidata; y

b) cultivar dicha *E. coli* transformada utilizando un medio bacteriano libre de hemo, en donde el crecimiento utilizando dicho medio bacteriano identifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa.

24. Un método para identificar una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida, el cual método comprende:

a) transformar una cepa *E. coli* que tiene una inactivación de gen para la enzima de PPO de *E. coli* natural con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína recombinante; y

b) cultivar dicha *E. coli* transformada utilizando un medio bacteriano que contiene al menos un herbicida PPO, en donde el crecimiento de bacterias identifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.

25. Un método de selección de un gen de tolerancia a herbicidas que comprende:

a) expresar la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en una célula de planta; y

b) identificar una célula de planta que presenta tolerancia a un herbicida PPO.

26. Un método de selección de un gen de tolerancia a herbicidas que comprende:

a) expresar una molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 en célula bacteriana que carece de HemG, en donde la célula bacteriana se cultiva en un medio libre de hemo en presencia de un herbicida PPO; y

b) identificar una célula bacteriana que presenta tolerancia a un herbicida PPO.

27. Un método de producción de una planta tolerante a un herbicida PPO y al menos un herbicida diferente que comprende:

a) obtener una planta de acuerdo con la reivindicación 11; y

b) cruzar la planta transgénica con una segunda planta que comprende tolerancia a al menos un herbicida diferente, y

c) seleccionar una planta progenie resultante de dicho cruce que comprende tolerancia a un herbicida PPO y el al menos un herbicida diferente.

28. Un método para reducir el desarrollo de malezas tolerantes a herbicidas que comprende:

a) cultivar en un entorno de crecimiento de cultivo una planta de acuerdo con la reivindicación 12; y

b) aplicar un herbicida PPO y al menos otro herbicida diferente al entorno de crecimiento de cultivo, en donde la planta de cultivo es tolerante al herbicida PPO y el al menos otro herbicida.

29. El método de la reivindicación 28 en donde el herbicida PPO se selecciona del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen,

flumioxazin, azafenidin, etilcarfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100.

30. El método de la reivindicación 28 en donde el al menos un herbicida diferente se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de ACCasa, un inhibidor de ALS, un inhibidor de EPSPS, una auxina sintética, un inhibidor de fotosíntesis, un inhibidor de síntesis de glutamina, un inhibidor de HPPD, un inhibidor de PPO, y un inhibidor de ácidos grasos de cadena larga.

31. El método de la reivindicación 30 en donde el inhibidor de ACCasa es un ariloxifenoxi propionato o una ciclohexanodiona; el inhibidor de ALS es una sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina o una triazolinona; el inhibidor de EPSPS es glifosato; la auxina sintética es un herbicida fenoxi, un ácido benzoico, un ácido carboxílico o una semicarbazona; el inhibidor de fotosíntesis es una triazina, una triazinona, un nitrilo, un benzotiadiazol o una urea; el inhibidor de síntesis de glutamina es glufosinato; el inhibidor de HPPD es un isoxazol, una pyrazolona o una tricetona; el inhibidor de PPO es un difeniléter, una N-fenilftalimida, un triazinona de arilo o una pirimidinediona; o el inhibidor de ácidos grasos de cadena larga es una cloroacetamida, un oxiacetamida o un pirazol.