

【DESCRIPCIÓN】

【Título de la invención】

Métodos y composiciones para conferir y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando protoporfirinógeno oxidasa o variantes de la misma

5

【Campo técnico】

La presente invención proporciona protoporfirinógeno oxidasas derivadas de procariotas, o sus variantes, y la tecnología para conferir y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas y/o algas utilizándolas.

10

【Antecedentes en la técnica】

Una vía para la biosíntesis de porfirina sirve para la síntesis de clorofila y hemo los cuales desempeñan un papel esencial en el metabolismo de las plantas y tiene lugar en el cloroplasto. En esta vía, la protoporfirinógeno IX oxidasa (denominada en la presente PPO; EC:1.3.3.4) cataliza la oxidación de protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX. Tras la oxidación de protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX, la protoporfirina IX se une con magnesio mediante Mg-quelatasa para sintetizar clorofila o se une con hierro mediante Fe-quelatasa para sintetizar hemo.

Por lo tanto, cuando se inhibe la actividad de PPO, se inhibe la síntesis de clorofila y hemo y el sustrato protoporfirinógeno IX abandona la vía biosintética de porfirina normal, lo que tiene como resultado la exportación rápida de protoporfirinógeno IX del cloroplasto al citoplasma y la acumulación citoplasmática de protoporfirina IX causada por la oxidación. La protoporfirina IX acumulada genera oxígeno singlete altamente reactivo ($^1\text{O}_2$) en presencia de luz y moléculas de oxígeno, que destruyen la membrana celular y llevan rápidamente a la muerte de la célula vegetal. En función de este principio, se han desarrollado herbicidas que inhiben la actividad de PPO. Hasta ahora, ha habido 9 familias de herbicidas inhibidores de PPO, entre ellos, pirimidindionas, difeniléteres, fenilpirazolos, N-fenilftalimidias, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidindionas y otros herbicidas, que se clasifican según sus estructuras químicas.

Además, con el fin de evitar los efectos de estos herbicidas en el crecimiento de los cultivos al usar los herbicidas, existe una necesidad de proporcionar a los cultivos tolerancia a los herbicidas.

Por otro lado, las algas son organismos fotosintéticos que pueden convertir
5 energía de luz en energía química que puede usarse para sintetizar varios compuestos
útiles. Por ejemplo, las algas pueden fijar el carbono mediante la fotosíntesis y convertir
el dióxido de carbono en azúcar, almidón, lípidos, grasas y otras biomoléculas, por lo
tanto retirando los gases de efecto invernadero de la atmósfera. Además, el cultivo a
gran escala de algas puede producir una variedad de sustancias tales como enzimas
10 industriales, compuestos terapéuticos y proteínas, nutrientes, materiales comerciales y
materiales combustibles.

Sin embargo, en el caso del cultivo a gran escala de algas en un biorreactor o en
un estanque abierto o cerrado, organismos competitivos indeseados pueden
contaminarlas, por ejemplo, algas, hongos, rotíferos o zooplancton indeseados.

15 Por lo tanto, se necesita una tecnología para obtener plantas y/o algas deseadas
a gran escala tratándolas con herbicidas en una concentración que inhibiría el
crecimiento de los organismos competitivos sin tolerancia a los herbicidas, tras conferir
a las plantas y/o algas deseadas tolerancia a los herbicidas.

20 **【Referencias】**

(Documento de patente 1) Publicación del registro de solicitud de patente
estadounidense US 6,308,458 (2001.10.30)

(Documento de patente 2) Publicación del registro de solicitud de patente
estadounidense US 6,808,904 (2004.10.26)

25 (Documento de patente 3) Publicación del registro de solicitud de patente
estadounidense US 7,563,950 (2009.07.21)

(Documento de patente 4) Publicación abierta de solicitud de patente
internacional WO2011/085221 (2011.07.14)

(Documento no patente 1) Li X, Volrath SL., Chilcott CE, Johnson MA, Ward
30 ER, Law MD, Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection

marker for agrobacterium tumefaciens- mediated transformation of maize. Plant physiology 133:736-747, 2003

【Divulgación】

5 【Problema técnico】

En la presente memoria descriptiva, se halló que los genes de PPO de tipo hemY derivados de procariotas y mutantes de estos exhiben una amplia tolerancia a los herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (PPO) y por lo tanto se propone que si se proporcionan dichos genes a las plantas y/o algas, entonces puede conferirse
10 y/o mejorarse la tolerancia a herbicidas.

Una modalidad proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en:

(1) una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en
15 los sitios de unión de SEQ ID NO: 2 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO) son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con un aminoácido que es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente, o

(2) una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de
20 homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos (1).

Uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 2, pueden ser uno o más seleccionados del grupo formado por los N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360 y I408, de la secuencia
25 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Otra modalidad proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en:

(1) una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en
30

los sitios de unión de SEQ ID NO: 4 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO) son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con un aminoácido que es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente, o

(2) una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos (1).

Uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 4, pueden ser uno o más seleccionados del grupo formado por los R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353 y F373, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Otra modalidad proporciona un polinucleótido que codifica la variante de polipéptido o el polipéptido.

Otra modalidad proporciona un vector recombinante que comprende el polinucleótido.

Otra modalidad proporciona una célula recombinante que comprende el vector recombinante.

Otra modalidad proporciona una composición para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas, que comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

el polipéptido de SEQ ID NO: 2, el polipéptido de SEQ ID NO: 4, una variante de polipéptido de esta como se describe anteriormente, y un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más o 99% o más de homología de secuencia con el polipéptido o las variantes del polipéptido;

un polinucleótido que codifica el polipéptido, las variantes del polipéptido y un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más o 99% o más de homología de secuencia con el polipéptido o las variantes;

un vector recombinante que comprende el polinucleótido; y

una célula recombinante que comprende el vector recombinante.

Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2 puede comprender la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1, y el polipéptido

de SEQ ID NO: 4 puede comprender la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3, de modo no taxativo.

El herbicida puede ser un herbicida que inhibe la protoporfirinógeno oxidasa.

Como modalidad específica, el herbicida puede ser uno o más tipos seleccionados del grupo formado por los pirimidindionas, difeniléteres, fenilpirazolos, N-fenilftalimidas, fenilésteres, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidindionas y otros herbicidas, de modo no taxativo.

Como modalidad específica, el herbicida puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por los butafenacilo, salufenacilo, benzfendizona, tiafenacilo, fomesafeno, oxifluorfenilo, aclonifeno, acifluorfenilo, bifenox, etoxifeno, lactofeno, clometoxifeno, clorintrofeno, fluoroglicofenetilo, halosafeno, piraflufenetilo, fluazolato, flumioxazina, cinidonetilo, flumicloracpentilo, flutiacet, tidiazimina, oxadiargilo, oxadiazona, carfentrazona, sulfentrazona, azafenidina, pentoxazona, piraclonilo, flufenpiretilo, profluazolo, fenopilato (2,4-diclorofenil 1-pirrolidincarboxilato), análogos de carbamato de fenopilato (por ejemplo, análogos de o-fenilpirrolidino- y piperidinocarbamato (véase “Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke, Stephen O. Duke, Relationships between molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(10) 1993-2000”)), sales agrícolamente aceptables de estos y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

Planta se refiere a un eucariota multicelular con capacidad fotosintética, que puede ser una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea y puede ser una planta herbácea o una planta leñosa. Alga significa un organismo unicelular con capacidad fotosintética, que puede ser un alga procariota o un alga eucariota.

En una modalidad, las plantas y algas son manipuladas genéticamente con el fin de comprender adicionalmente polipéptido de tolerancia a un segundo herbicida o un gen que codifique el mismo, y puede conferirse y/o mejorarse un rango mayor de tolerancia al segundo herbicida. Las plantas y algas manipuladas genéticamente con el fin de comprender un polipéptido de tolerancia a un segundo herbicida o un gen que lo codifique pueden prepararse usando una composición para conferir y/o mejorar la

tolerancia al herbicida donde se comprende adicionalmente el polipéptido de tolerancia al segundo herbicida o un gen que lo codifique. Por lo tanto, una composición para conferir y/o mejorar la tolerancia al herbicida puede comprender adicionalmente el polipéptido de tolerancia al segundo herbicida o un gen que lo codifique.

5 Como modalidad específica, el segundo herbicida puede incluir herbicidas que inhiben la división celular, herbicidas que inhiben la fotosíntesis, herbicidas que inhiben la síntesis de aminoácidos, herbicidas que inhiben plastos, y herbicidas que inhiben la membrana celular, de modo no taxativo.

10 Como modalidad específica, ejemplos del segundo herbicida pueden ser glifosato, glufosinato, dicamba, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), isoxaflutol, herbicida inhibidor de ALS (acetolactato sintasa), herbicida inhibidor de fotosistema II, herbicida a base de fenilurea, herbicida a base de bromoxinilo y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

15 Como modalidad específica, ejemplos del segundo herbicida pueden ser uno o más seleccionados del grupo formado por los EPSPS tolerante al herbicida glifosato (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato), GOX (glifosato oxidasa), GAT (glifosato-N-acetiltransferasa) o glifosato descarboxilasa); PAT (fosfinotricin-N-acetiltransferasa) tolerante al herbicida glufosinato , DMO (dicamba monooxigenasa) tolerante al herbicida dicamba ; 2,4-D monooxigenasa o AAD (ariloxialcanoato dioxigenasa) tolerante al herbicida 2,4-D; ALS (acetolactato sintasa) tolerante al herbicida a base de sulfonilurea inhibidor de ALS, AHAS (acetohidroxiácido sintasa) o Athahasl (subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa); proteína D1 del fotosistema II tolerante al herbicida inhibidor de fotosistema II; citocromo P450 tolerante al herbicida a base de feilurea; HPD (hidroxilfenilpiruvato dioxigenasa) tolerante al herbicida inhibidor de plastos; nitrilasa tolerante al herbicida bromoxinilo; y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

25 Además, el gen que codifica el polipéptido tolerante al segundo herbicida puede ejemplificarse mediante uno o más seleccionados del grupo formado por los genes cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 o gat4621 tolerantes al herbicida glifosato; genes bar, pat o pat(SYN) tolerantes al herbicida glufosinato; gen

dmo tolerante al herbicida dicamba; genes AAD-1, AAD-12 tolerantes al herbicida 2,4-D, genes ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, SurA o SurB tolerantes al herbicida a base de sulfonilurea inhibidor de ALS; gen psbA tolerante al herbicida inhibidor de fotosistema II; gen de CYP76B1 tolerante al herbicida fenilurea; 5 gen HPPDPF W336 tolerante al herbicida isoxaflutol, y gen bxn tolerante al herbicida bromoxinilo; y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

Otra modalidad proporciona un transformante de una planta y/o alga con tolerancia a los herbicidas, el cual fue transformado con el polinucleótido o un clon o progenie de los mismos.

10 Otra modalidad proporciona un método para preparar plantas o algas con tolerancia a los herbicidas, que comprende el paso de transformar plantas y/o algas con el polinucleótido.

Otra modalidad proporciona un método para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas y/o algas, que comprende el paso de transformar plantas y/o 15 algas con el polinucleótido.

La transformación puede realizarse en células vegetales y/o de alga, protoplastos, callos, hipocótilo, semillas, cotiledones, brotes o planta enteras.

El transformante puede ser una célula vegetal y/o de alga, protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote o planta entera.

20 Otra modalidad proporciona un método para controlar malezas en un campo de cultivo que comprende:

un paso de proporcionar al campo de cultivo una planta que comprende uno o más seleccionados del grupo formado por los polipéptidos de SEQ ID NO: 2 o 4, o las variantes de polipéptidos, un polinucleótido que codifica los mismos, un vector 25 recombinante que comprende el polinucleótido y una célula recombinante que comprende el vector recombinante; y

un paso de aplicar una dosificación eficaz de un herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al campo de cultivo (o la planta).

Como modalidad específica, el paso de aplicar una dosificación eficaz de 30 herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al campo de cultivo puede realizarse

aplicando una dosificación eficaz de dos o más herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa de forma secuencial o simultánea.

Como otra modalidad, la planta puede ser manipulada genéticamente con el fin de comprender adicionalmente un polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen
5 que codifica el mismo, y una dosificación eficaz del herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa y el segundo herbicida puede aplicarse de forma secuencial o simultánea.

Otra modalidad proporciona un método para eliminar un organismo acuático no deseado de un medio de cultivo, que comprende un paso de proporcionar a un medio de
10 cultivo algas que comprenden uno o más seleccionados del grupo formado por los polipéptidos, las variantes de polipéptido, un polinucleótido que codifica los polipéptidos o las variantes de polipéptido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido y una célula recombinante que comprende el vector recombinante y un
15 paso de aplicar una dosificación eficaz de un herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al medio de cultivo.

【Solución técnica】

Se proporciona una tecnología para conferir y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas.

20 En la presente, "conferir y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas" o "mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas" se interpreta como conferir tolerancia a las plantas o algas que no tienen tolerancia a los herbicidas, o mejorar la tolerancia de plantas o algas que sí tienen tolerancia a los herbicidas, o el significado amplio que abarca a ambas posibilidades.

25 Tal como se usa en la presente, "que consiste en una secuencia", "que consiste esencialmente en una secuencia" o "que comprende una secuencia" se usan para referirse a ambos casos de comprender la secuencia descrita o comprender necesariamente la secuencia, así como pueden interpretarse que significan comprender una secuencia sin ser la secuencia descrita y/o comprender una mutación (adición,
30 eliminación y/o sustitución de un aminoácido o ácido nucleico) siempre y cuando

mantengan una actividad intrínseca de la proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico y presente la función que se pretende.

En una modalidad, se proporcionan una o más variantes de polipéptido que se seleccionan del grupo que consiste en:

5 una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión de SEQ ID NO: 2 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO),
10 son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original o una secuencia de aminoácidos con un 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con este; y

 una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en que aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores
15 de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión de SEQ ID NO: 4 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO), son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original en la posición correspondiente o una secuencia de aminoácidos con un 95% o más, 98% o más, o 99% o más de
20 homología con este.

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido o la variante de polipéptido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido, y una célula recombinante que comprende el vector recombinante. El polinucleótido puede diseñarse con el fin de que un codón optimizado esté comprendido en la célula
25 que ha de transformarse entre los codones que codifican cada aminoácido. El codón optimizado puede ser fácilmente conocido para un experto en la técnica (por ejemplo, véase "<http://www.genscript.com/codon-opt.html>", "<http://sg.idtdna.com/CodonOpt>" etc.).

En otra modalidad, se proporciona una composición para conferir o mejorar la
30 tolerancia a los herbicidas de plantas o algas, que comprende uno o más seleccionados

del grupo formado por:

el polipéptido de SEQ ID NO: 2, el polipéptido de SEQ ID NO: 4, las variantes del polipéptido de los mismos y un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más o 99% o más de homología de secuencia con los mismos;

5 un polinucleótido que codifica el polipéptido o las variantes del polipéptido;

un vector recombinante que comprende el polinucleótido; y

una célula recombinante que comprende el vector recombinante.

Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2 puede comprender la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1, y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede comprender la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3, de modo no taxativo.

Otra modalidad proporciona un transformante de una planta y/o alga con tolerancia a los herbicidas, transformado con el polinucleótido que codifica el polipéptido o la variante de polipéptido. El polinucleótido puede diseñarse con el fin de que un codón optimizado esté comprendido en la célula que ha de transformarse entre los codones que codifican cada aminoácido. El codón optimizado puede ser fácilmente conocido para un experto en la técnica (por ejemplo, véase "http://www.genscript.com/codon-opt.html", "http://sg.idtdna.com/CodonOpt" etc.).

En otra modalidad, se proporciona un método para preparar plantas o algas con tolerancia a los herbicidas, que comprende el paso de transformar un alga, o célula de planta, protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote o planta entera con el polinucleótido.

En otra modalidad, se proporciona un método para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas, que comprende el paso de transformar una un alga, o célula de planta, protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote o planta entera con el polinucleótido.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle.

El polipéptido con secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4, o una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología de secuencia con este y sus variantes proporcionado en la presente es una proteína PPO

derivada de un procariota (por ejemplo, una cianobacteria) y es una proteína PPO tolerante a herbicidas con tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO. Específicamente, se proporciona una proteína PPO que deriva de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, y se designa como CyPPO10, y su secuencia de aminoácidos está representada por la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica está representada por la SEQ ID NO: 1. Además, se proporciona una PPO que deriva de la cepa *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab y se designa como CyPPO13, y su secuencia de aminoácidos está representada por la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica está representada por la SEQ ID NO: 3.

En la presente, el polipéptido y las variantes de polipéptidos que se describen anteriormente pueden ser referidos respectivamente como proteína PPO tolerante a los herbicidas o proteína PPO tolerante a los herbicidas con tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO. Además, tal como se usa en la presente, "PPO tolerante a los herbicidas o su variante" puede usarse para referirse a la proteína tolerante a los herbicidas o una variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas, al gen que codifica la proteína PPO tolerante a los herbicidas o gen que codifica la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas mencionados anteriormente, o a todos ellos.

Las proteínas PPO derivadas de cianobacteria tienen de por sí una actividad enzimática más excelente que las PPO de plantas, y estas proteínas PPO pueden conferir tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO e intensificar la tolerancia a herbicidas al comprender mutación de aminoácidos manteniendo la actividad enzimática intrínseca global en el mismo rango de las proteínas PPO de tipo salvaje. Tales mutaciones de aminoácidos pueden comprender la sustitución, eliminación, adición y/o introducción de uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácido de sitios de interacción entre proteínas PPO y herbicidas.

La variante de la proteína PPO se describirá con mayor detalle a continuación.

Una modalidad proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en:

una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores

de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 2 (CyPPO10) (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 2) son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (es decir, un aminoácido en la ubicación correspondiente del tipo salvaje), o

una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

El residuo de aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 2, que se elimina o sustituye con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (a saber, uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 2) puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por N59 (lo que significa “N(Asn) en la posición 59^a”; la expresión de los siguientes residuos de aminoácido se interpreta de la misma forma), S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360 y I408 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En una modalidad específica, la variante de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en:

una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360 y I408, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con un aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), etc. y es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente (por ejemplo, sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), R(Arg), W(Trp), G(Gly) etc. y es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente en el tipo salvaje), o

una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

Por ejemplo, la variante de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en:

una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por F360M (lo que expresa que “el residuo de aminoácido en la posición 360 se sustituye de F(Phe) a M(Met)”); la expresión de las siguientes mutaciones de aminoácidos se interpreta de la misma manera), F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, A167I, P303L, V305L, V305M, V305T, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, Q184G, F324V, L327T, I340T, I408R y I408W, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o

una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

Más específicamente, la variante de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en:

una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por mutaciones de aminoácidos de F360M, F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, A167I, P303L, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, Q184G, V305L, V305M, V305T, F324V, L327T, I340T, I408R, I408W, P303L+V305L (lo que expresa que un mutante o una mutación comprende ambas la sustitución del residuo 303 de P a L y la sustitución del residuo 305 de V a L; la expresión de las siguientes dos o más mutaciones de aminoácidos se interpreta de la misma manera), N59T+F360V, S60T+V165S+F360M, S60T+V165S+F360I, S60T+I340T+F360I, R89A+F360M, R89A+F360I, R89A+F360L, R89L+F360I, R89V+F360I, R89A+A167L+F360M, R89A+V305T+F360M, V165S+F360M, V165S+F360I, V165S+F360L, V165S+F360V, V165C+F360M, V165C+A167C+F360M, V165C+A167I+F360M, V165C+A167L+F360M, A167L+F360M, A167L+F360I, A167C+F360M, A167C+F360I, A167I+F360M, V305M+F360M, V305T+F360I, V305L+F360M, I408R+F360M, o I408W+F360M, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o

una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

Otra modalidad proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en:

- 5 una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 4 (CyPPO13) (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 4) son respectivamente y de manera independiente eliminados o
- 10 sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente (es decir, un aminoácido en la ubicación correspondiente del tipo salvaje), o

una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

- 15 El residuo de aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 4, que se elimina o sustituye con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original en la ubicación correspondiente (por ejemplo, uno o más seleccionados del grupo formado por los aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 3), pueden ser uno o más seleccionados del grupo
- 20 formado por los R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353 y F373, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad específica, la variante de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en:

- 25 una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por los R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353 y F373, de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 son respectivamente y de manera independiente eliminados o sustituidos con un aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg),
- 30 H(His), K(Lys), etc. y es diferente del aminoácido original en la ubicación

correspondiente en el tipo salvaje (por ejemplo, sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), N(Asn), etc. y es diferente del aminoácido en la ubicación correspondiente en el tipo salvaje), o

5 una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

Por ejemplo, la variante de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en:

una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por los F373M, F373V, F373I, F373T, F373L, F373C, F373N, F373H, A177C, A177L, A177I, P316A, P316L, V318L, V318M, R101A, F171A, V175C, V175L, G194E, G194Q, G194M, G194K, G194R, F337V, L340T y I353T, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma. Más específicamente, la variante de polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por F373M, F373V, F373I, F373T, F373L, F373C, F373N, F373H, A177C, A177L, A177I, P316A, P316L, V318L, V318M, R101A, F171A, V175C, V175L, G194E, G194Q, G194M, G194K, G194R, F337V, L340T, I353T, P316L+V318L, P316A+V318L, R101A+F373M, A177C+F373M, A177I+F373M, A177L+F373M, A177L+F373I, A177L+F373L, A177L+F373T, A177L+F373V, A177C+F373T, A177C+F373V, V175L+F373M, G194E+F373M, G194Q+F373M, G194M+F373M, G194K+F373M, G194R+F373M, o V318M+F373M, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o

25 una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con la misma.

La variante de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con homología de secuencia (por ejemplo, 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología de secuencia) descrita en la presente puede mantener actividad enzimática que comparada a la de un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es un

estándar de identificación de la homología de secuencia (por ejemplo, la proteína PPO con la mutación de aminoácido descrita anteriormente) es, por ejemplo, 5% o más, 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más o 95% o más de actividad enzimática que un polipéptido con una

5 secuencia de aminoácidos que es estándar en las plantas (en una planta entera, en una célula vegetal o cultivo celular, en un tejido de una planta, etc.), en algas y/o in vitro, y con la función de conferir tolerancia a los herbicidas. La descripción de la homología de secuencia se usa para aclarar que la variante de la proteína PPO de tolerancia a los herbicidas o variante de polipéptido que se describe en la presente puede comprender

10 todas las mutaciones de secuencia en el rango de satisfacer las condiciones anteriores (mantener la actividad enzimática y tener la función de conferir tolerancia a los herbicidas).

Los nombres de los aminoácidos usados en la descripción se disponen de la siguiente forma:

Amino acid	3-letter code	1-letter code
Alanine	Ala	A
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valine	Val	V
Asparagine	Asn	N
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tyrosine	Tyr	Y
Aspartic acid	Asp	D
Glutamic acid	Glu	E
Arginine	Arg	R
Histidine	His	H
Lysine	Lys	K

15

La variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas puede mantener la actividad enzimática de la proteína y presentar una mejor tolerancia a los herbicidas en comparación con el tipo salvaje.

Adicionalmente, la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas puede comprender mutaciones adicionales que presenten una actividad biológicamente igual a la de un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, o en una secuencia de aminoácidos con la mutación de aminoácido descrita anteriormente. Por ejemplo, la mutación adicional puede ser una sustitución de aminoácidos que en términos generales no **modifica la actividad molecular**, y tal sustitución de aminoácidos se conoce públicamente en la técnica. En un ejemplo, la sustitución adicional puede ser la sustitución de los residuos de aminoácido Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, o Asp/Gly, de modo no taxativo. En algunos casos, la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas puede haber sufrido una o más de las modificaciones del grupo formado por fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, farnesilación, etc. Además, la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas puede comprender una variante de proteína donde la estabilidad estructural al calor, pH, etc, de la proteína o la actividad de la proteína han sido aumentadas mediante mutación y/o modificación de aminoácidos.

El término "homología de secuencia" se refiere al grado de similitud con el tipo salvaje o la secuencia de aminoácidos de referencia o la secuencia de nucleótidos y puede incluirse cualquier proteína en el alcance de la presente invención, siempre que incluya residuos de aminoácido con 60% o más, 65% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más o 99% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína PPO tolerante a los herbicidas y tenga una actividad biológica equivalente a la de la variante de la proteína tolerante a los herbicidas. Tales homólogos de la proteína pueden comprender un sitio activo equivalente al de la proteína de referencia. Tal comparación de homología puede realizarse con la ayuda de programas de comparación fácilmente disponibles. La homología entre dos o más secuencias puede calcularse como un porcentaje (%) usando un programa de análisis disponible en línea. La alineación de secuencias para la comparación de secuencias puede llevarse a cabo por cualquier método convencional conocido en la técnica relevante y, por ejemplo, el método convencional puede incluir,

de modo no taxativo, GAP, BESTFIT, BLAST y Clustal Omega.

La proteína PPO tolerante a los herbicidas o sus variantes pueden obtenerse por extracción de la naturaleza y purificación mediante métodos conocidos en la técnica. De otro modo, puede obtenerse como proteína recombinante usando una tecnología de recombinación de genes. En el caso de usar una tecnología de recombinación de genes, puede obtenerse por un proceso de obtención de proteína PPO tolerante a herbicidas o sus variantes a partir de una célula anfitriona, después de introducir un ácido nucleico que codifica la proteína PPO tolerante a los herbicidas o su variante en un vector de expresión apropiado y transformar una célula anfitriona con el vector con el fin de expresar una proteína objetivo. Una vez que la proteína se expresa en una célula anfitriona seleccionada, pueden usarse técnicas de separación bioquímica generales, por ejemplo, tratamiento con un agente de precipitación de proteínas (precipitación por sales), centrifugación, alteración ultrasónica, ultrafiltración, diálisis, cromatografía, tal como cromatografía por tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía por adsorción, cromatografía por intercambio de iones, cromatografía por afinidad y similares, para aislar y purificar la misma y pueden usarse estos métodos en combinación con el fin de separar la proteína con una gran pureza.

La molécula de ácido nucleico de PPO tolerante a los herbicidas (polinucleótido que codifica la proteína PPO o su variante) puede aislarse o prepararse usando técnicas estándar de la biología molecular, por ejemplo, un método de recombinación o síntesis química o puede usarse alguno comercialmente disponible.

En una modalidad específica, se halló que las proteínas PPO presentaron una amplia tolerancia a los herbicidas contra los representantes de 9 familias de herbicidas inhibidores de PPO clasificados según sus estructuras químicas en un sistema de análisis de tolerancia a los herbicidas usando *E. coli* BT3(Δ PPO) con deficiencia de PPO. También se halló que pueden también expresarse en el cloroplasto de una planta usando un péptido de tránsito (TP). Además se halló que las proteínas PPO también pueden expresarse en *A. thaliana* ecotipo Columbia mediante un vector de expresión vegetal. A pesar de que las plantas transformadas fueron tratadas con herbicidas inhibidores de PPO, se observó la germinación y el crecimiento de las plantas.

Además, la transmisión de herencia de los rasgos de tolerancia a herbicidas mencionados anteriormente hacia la siguiente generación se confirmó mediante un estudio de herencia.

Por lo tanto, la proteína PPO y sus variantes proporcionadas en la presente
5 pueden introducirse a una planta o alga, y por lo tanto usarse para mejorar la tolerancia a los herbicidas de la planta o alga.

El herbicida en la presente se refiere a un ingrediente activo que mata, controla o de otro modo modifica adversamente el crecimiento de plantas o algas. Además, la tolerancia a los herbicidas significa que incluso tras el tratamiento con un herbicida que
10 normalmente destruye una planta normal o de tipo salvaje o normalmente inhibe el crecimiento de la misma, la inhibición del crecimiento de la planta se ve debilitado o eliminado, en comparación con la misma de la planta normal o de tipo salvaje, y por lo tanto, la planta continúa creciendo. El herbicida incluye un herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa (PPO) de una planta o alga. Tales herbicidas inhibidores de
15 PPO pueden clasificarse de acuerdo con sus estructuras químicas como pirimidindionas, difeniléteres, fenilpirazoles, N-fenilftalimidas, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidindionas, y otros herbicidas.

Como modalidad específica, entre los herbicidas tipo pirimidindiona se incluyen butafenacilo, saflufenacilo, benzfendizona, y tiafenacilo, de modo no taxativo.

20 Entre los herbicidas tipo difeniléter se incluyen fomesafeno, oxifluorfen, aclonifeno, acifluorfen, bifenox, etoxifeno, lactofeno, clometoxifeno, clorintrofen, fluoroglicofen-etilo y halosafeno, de modo no taxativo.

Entre los herbicidas tipo fenilpirazolo se incluyen piraflufen-etilo y fluazolato, de modo no taxativo.

25 Entre los herbicidas tipo fenilftalimida se incluyen flumioxazina, cinidonetilo y flumiclorac-pentilo, de modo no taxativo.

Entre los herbicidas tipo feniléster se incluyen fenopilato(2,4-diclorofenil 1-pirrolidincarboxilato) y análogos de carbamato de fenopilato (por ejemplo, análogos de O-fenilpirrolidino- y piperidinocarbamato (véase “Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke,
30 Stephen O. Duke, Relationships between molecular properties and biological activities

of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(10) 1993-2000”), etc., de modo no taxativo. En una modalidad, el análogo de carbamato de fenopilato puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por éster de fenilo de ácido pirrolidin-1-carboxílico (CAS No. 55379-71-0), ácido 1-
5 pirrolidincarboxílico, éster de 2-clorofenilo (CAS No. 143121-06-6), pirrolidin-1-carboxilato de 4-clorofenilo (CAS No. 1759-02-0), ácido carbámico, dietil-, éster de 2,4-dicloro-5-(2-propinilo)fenilo (9CI) (CAS No. 143121-07-7), ácido 1-pirrolidincarboxílico, éster de 2,4-dicloro-5-hidroxifenilo (CAS No. 143121-08-8), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(metoxycarbonil)fenilo (CAS No. 133636-94-
10 9), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-[(propan-2-ilo)carbonil]fenilo (CAS No. 133636-96-1), ácido 1-piperidincarboxílico, éster de 2,4-dicloro-5-(2-propinilo)fenilo (CAS No. 87374-78-5), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(prop-2-in-1-ilo)fenilo (CAS No. 87365-63-7), 4,4-difluoropiperidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(prop-2-in-1-ilo)fenilo (CAS No. 138926-22-4), ácido 1-Pirrolidincarboxílico, 3,3-difluoro-, éster de 2,4-dicloro-5-(2-propin-1-ilo)fenilo (CAS No. 143121-10-2), pirrolidin-1-carboxilato de 4-cloro-2-fluoro-5-[(propan-2-ilo)carbonil]fenilo (CAS No. 133636-98-3), etc.

Entre los herbicidas tipo tiadiazol se incluyen flutiacet y tidiazimina, de modo no taxativo.

20 Entre los herbicidas tipo oxadiazol se incluyen oxadiargilo y oxadiazona, de modo no taxativo.

Entre los herbicidas tipo triazolinona se incluyen carfentrazona, sulfentrazona y azafenidina, de modo no taxativo.

25 Entre los herbicidas tipo oxazolidindiona se incluye pentoxazona, de modo no taxativo.

Dentro del grupo otros herbicidas se incluyen piraclonil, flufenpiretilo y profluzol, de modo no taxativo.

El gen de PPO tolerante a los herbicidas que se proporciona en la presente puede introducirse en una planta o alga mediante varios métodos conocidos en la
30 técnica, y preferentemente, usando un vector de expresión para la transformación de

plantas o algas.

En el caso de la transformación de plantas, un promotor apropiado que puede incluirse en el vector puede ser cualquier promotor usado generalmente en la técnica para la introducción del gen en la planta. Por ejemplo, el promotor puede incluir un
5 promotor SP6, un promotor T7, un promotor T3, un promotor PM, un promotor de ubiquitina de maíz, un promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), un promotor de nopalina sintasa(nos), un promotor 35S del virus del mosaico de *Scrophularia*, un promotor del virus baciliforme de caña de azúcar, un promotor del virus de commelina de mancha amarilla, un promotor inducible por luz de la subunidad
10 pequeña (S) de ribulosa-I,5-bisfosfato carboxilasa (ssRuBisCO), un promotor de triosafosfato isomerasa (TPI) citosólica del arroz, un promotor de adenina fosforibosiltransferasa (APRT) de *Arabidopsis*, un promotor de octopina sintasa y un promotor de BCB (proteína azul de unión de cobre), de modo no taxativo.

Adicionalmente, el vector puede incluir una secuencia de señal poly A que
15 causa la poliadenilación del extremo 3', y por ejemplo, puede incluir NOS de extremo 3' derivado de un gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, un terminador de octopina sintasa derivado de un gen de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, del gen de tomate o papa inhibidor de proteasa I o II en el extremo 3', un terminador 35S de CaMV, un terminador RAmy1 A de α -amilasa de arroz y un
20 terminador de faseolina, de modo no taxativo.

Además, puede usarse como promotor para la introducción del gen en el alga un promotor específico de cloroplastos, un promotor de núcleo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. El gen de PPO tolerante a los herbicidas o su variante que se proporciona en la presente puede diseñarse con el fin de unirse de forma operativa a la
25 UTR 5' o UTR 3', por lo tanto expresando la función en el núcleo de las algas. Además, el vector puede comprender adicionalmente una secuencia reguladora transcripcional apropiada para la transformación de algas. Un gen recombinante proveedor de tolerancia a los herbicidas puede integrarse al genoma del núcleo o al genoma del cloroplasto en un alga anfitriona, de modo no taxativo.

30 Además, en el vector, puede vincularse un péptido de tránsito requerido para

dirigirse a los cloroplastos al extremo 5' del gen de PPO con el fin de expresar el gen de PPO tolerante a los herbicidas en los cloroplastos.

Además, opcionalmente, el vector puede incluir opcionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable como molécula reportera y un ejemplo del marcador
5 seleccionable puede incluir antibióticos (por ejemplo, neomicina, carbenicilina, kanamicina, espectinomicina, higromicina, bleomicina, cloranfenicol, etc.) o genes tolerantes a herbicidas (glifosato, glufosinato, fofinotricina, etc.), de modo no taxativo.

Además, el vector recombinante para la expresión de plantas puede incluir un vector binario de *Agrobacterium*, un vector de cointegración o un vector general que
10 carezca de una región de ADN-T, pero esté diseñado para expresarse en la planta. De ellos, vector binario se refiere a un vector que contiene dos sistemas de vectores separados que contienen un plásmido responsable de la migración que consiste en el borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) en el plásmido Ti (inductor de tumores), y el otro plásmido para la transferencia del gen objetivo, y el vector puede incluir una
15 región promotora y una secuencia de señal de poliadenilación para la expresión en plantas.

Cuando se usa el vector binario o el vector de cointegración, una cepa para la transformación del vector recombinante en la planta es preferentemente *Agrobacterium* (transformación mediada por *Agrobacterium*). Con respecto a esto, pueden usarse
20 *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Adicionalmente, cuando se usa el vector sin región de ADN-T, pueden usarse electroporación, bombardeo de partículas, absorción mediada por polietilenglicol, etc., para introducir el plásmido recombinante en la planta.

La planta transformada con el gen mediante el método anterior puede
25 rediferenciarse en una planta a través de inducción de callos, rizogénesis y aclimatización del suelo usando una técnica estándar conocida en la técnica.

En la presente, el significado de la planta sometida a la transformación incluye una célula vegetal (que incluye una célula cultivada en suspensión), un protoplasto, un callo, un hipocótilo, una semilla, un cotiledón, un brote así como una
30 planta madura.

Además, el alcance del transformante incluye un transformante en el que se ha introducido el gen así como un clon o progenie del mismo (generación T₁, generación T₂, generación T₃, generación T₄, generación T₅ o cualquiera de las generaciones subsiguientes). Por ejemplo, la planta transformada también incluye una planta con los rasgos de tolerancia a los herbicidas heredados como progenie sexuada y asexuada de la planta transformada en la que se fue introducido el gen proporcionado en la presente. El alcance de la presente invención también incluye todos los mutantes y variantes que presentan las características de la planta transformada inicial, junto con todos los productos de hibridación y fusión de la planta transformada con el gen que se proporciona en la presente. Además, el alcance de la presente invención también incluye una parte de la planta, tal como una semilla, una flor, un brote, una fruta, una hoja, una raíz, un tubérculo y/o una raíz tuberosa, que se origina a partir de una planta transformada que se transforma por adelantado mediante el método de la presente invención, o una progenie de esta, y está compuesta por al menos una parte de las células transformadas.

La planta, a la cual se aplica la presente invención, incluye pero no se limita particularmente a plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas. Además, la planta incluye plantas herbáceas y plantas leñosas. La planta monocotiledónea puede consistir en plantas que pertenecen a la familia Alismataceae, Hydrocharitaceae, Juncaginaceae, Scheuchzeriaceae, Potamogetonaceae, Najadaceae, Zosteraceae, Liliaceae, Haemodoraceae, Agavaceae, Amaryllidaceae, Dioscoreaceae, Pontederiaceae, Iridaceae, Burmanniaceae, Juncaceae, Commelinaceae, Eriocaulaceae, Gramineae (Poaceae), Araceae, Lemnaceae, Sparganiaceae, Typhaceae, Cyperaceae, Musaceae, Zingiberaceae, Cannaceae, Orchidaceae, de modo no taxativo.

La planta dicotiledónea puede consistir en plantas que pertenecen a la familia Diapensiaceae, Clethraceae, Pyrolaceae, Ericaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, Plumbaginaceae, Ebenaceae, Styracaceae, Symplocaceae, Symplocaceae, Oleaceae, Loganiaceae, Gentianaceae, Menyanthaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Rubiaceae, Polemoniaceae, Convolvulaceae, Boraginaceae, Verbenaceae, Labiatae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae, Orobanchaceae,

Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Caprifoliaceae, Adoxaceae, Valerianaceae, Dipsacaceae, Campanulaceae, Compositae, Myricaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Betulaceae, Fagaceae, Ulmaceae, Moraceae, Urticaceae, Santalaceae, Loranthaceae, Polygonaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, 5 Portulacaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Cactaceae, Magnoliaceae, Illiciaceae, Lauraceae, Cercidiphyllaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Nymphaeaceae, Ceratophyllaceae, Cabombaceae, Saururaceae, Piperaceae, Chloranthaceae, Aristolochiaceae, Actinidiaceae, Theaceae, Guttiferae, Droseraceae, Papaveraceae, Capparidaceae, 10 Cruciferae, Platanaceae, Hamamelidaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Eucommiaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Leguminosae, Oxalidaceae, Geraniaceae, Tropaeolaceae, Zygophyllaceae, Linaceae, Euphorbiaceae, Callitrichaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Polygalaceae, Anacardiaceae, Aceraceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sabiaceae, Balsaminaceae, Aquifoliaceae, Celastraceae, 15 Staphyleaceae, Buxaceae, Empetraceae, Rhamnaceae, Vitaceae, Elaeocarpaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Passifloraceae, Tamaricaceae, Elatinaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Lythraceae, Punicaceae, Onagraceae, Haloragaceae, Alangiaceae, Cornaceae, Araliaceae, Umbelliferae(Apiaceae), de modo no taxativo.

20 En una modalidad específica, la planta puede ser uno o más cultivos seleccionados del grupo formado por los cultivos alimentarios tales como arroz, trigo, cebada, maíz, soja, papa, frijol rojo, avena y sorgo; cultivos vegetales tales como repollo chino, rábano, pimienta roja, frutilla, tomate, sandía, pepino, col, melón, calabaza, cebolleta, cebolla y zanahoria; cultivos para uso especial tales como ginseng, tabaco, 25 algodón, forraje fresco, forraje, sésamo, caña de azúcar, remolacha, Perilla sp., maní, colza, césped, y planta de aceite de ricino; árboles frutales tales como manzano, peral, azufaifo, melocotonero, planta de kiwi, vid, árboles de frutos cítricos, árbol de caqui, ciruelos, albaricoquero, y banano; plantas leñosas tales como pino, palma aceitera y eucalipto; cultivos de flores tales como rosa, gladiolo, gerbera, clavel, crisantemo, lirio 30 y tulipán; y cultivos forrajeros tales como césped inglés, trébol rojo, césped de huerto,

alfalfa, festuca alta y césped perenne, de modo no taxativo. Como modalidad específica, la planta puede ser una o más seleccionados del grupo formado por plantas dicotiledóneas tales como *Arabidopsis thaliana*, papa, berenjena, tabaco, pimiento rojo, tomate, bardana, ojo de buey, lechuga, flor de globo, espinaca, acelga, boniato, apio,
5 zanahoria, nabo del diablo, perejil, col china, col, rábano, sandía, melón oriental, pepino, zapallo, calabaza, frutilla, soja, poroto chino, frijol, y guisante; y plantas monocotiledóneas tales como arroz, trigo, cebada, maíz, sorgo, etc. de modo no taxativo.

El alga, a la cual se aplica la presente invención, incluye pero no se limita
10 particularmente a algas procariotas o algas eucariotas. Por ejemplo, el alga puede ser cianobacteria, alga verde, alga roja, alga parda, macroalga o microalga.

Entre las cianobacterias se incluyen Chroococcales phylum (por ejemplo, Aphanocapsa, Aphanothece, Chamaesiphon, Chondrocystis, Chroococcus, Chroogloeocystis, Crocosphaera, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanodictyon,
15 Cyanosarcina, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeocapsa, Gloeothece, Halothece, Johannesbaptistia, Merismopedia, Microcystis, Radiocystis, Rhabdoderma, Snowella, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Woronichinia), Gloeobacteria phylum, Nostocales phylum (por ejemplo, Microchaetaceae, Nostocaceae, Rivulariaceae, Scytonemataceae), Oscillatoriales phylum (por ejemplo, Arthronema,
20 Arthrospira, Blennothrix, Crinalium, Geitlerinema, Halomicronema, Halospirulina, Hydrocoleum, Jaaginema, Katagnymene, Komvophoron, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Planktothricoides, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Pseudophormidium, Schizothrix, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema), Pleurocapsales phylum (por ejemplo,
25 Chroococcidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpella, Myxosarcina, Pleurocapsa, Solentia, Stanieria, Xenococcus), Prochlorales phylum, o Stigonematales phylum (por ejemplo, Capsosira, Chlorogloeopsis, Fischerella, Hapalosiphon, Mastigocladopsis, Mastigocladus, Nostochopsis, Stigonema, Symphyonema, Symphonemopsis, Umezakia, Westiellopsis), etc.

30 Como otro ejemplo de algas se puede incluir a Chlorophyta, Chlamydomonas,

Volvacales, Dunaliella, Scenedesmus, Chlorella, o Hematococcm.

Como otro ejemplo de algas se puede incluir a *Phaeodactylum tricornutum*, *Amphiprora hyaline*, *Amphora* spp., *Chaetoceros muelleri*, *Navicula saprophila*, *Nitzschia communis*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans*, *Synechococcus elongatus*, *Botryococcus braunii*, *Gloeobacter violaceus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Botryococcus sudeticus*, *Euglena gracilis*, *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia palea*, *Pleurochrysis carterae*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova* spp., *Aphanocapsa* spp., *Synechosystis* spp., *Nannochloris* spp., etc. Sin embargo, no se encuentra limitada por los tipos que se mencionaron anteriormente y las algas que pertenecen a otros géneros y familias diferentes también pueden estar comprendidas.

La planta o alga a la que se introduce la PPO tolerante a los herbicidas o su variante que se proporciona en la presente puede presentar tolerancia contra dos o más herbicidas inhibidores de PPO.

Por lo tanto, la tecnología que se proporciona en la presente puede usarse para controlar malezas o eliminar organismos acuáticos no deseados mediante el uso de dos o más tipos de herbicidas inhibidores de PPO de forma secuencial o simultánea.

Una modalidad proporciona un método para controlar malezas en un campo de cultivo, que comprende el paso de proporcionar al campo de cultivo una planta que comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un gen que la codifica descrito anteriormente y un paso de aplicación de una dosificación eficaz del herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al campo de cultivo.

Otra modalidad proporciona un método para eliminar un organismo acuático no deseado de un medio de cultivo, que comprende el paso de proporcionar al medio de cultivo un alga que comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un gen que la codifica descrito anteriormente y un paso de aplicar una dosificación eficaz del herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al medio de cultivo.

Además, la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un gen que la

codifica que se proporcionan en la presente pueden usarse en combinación con un polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo codifica.

Por lo tanto, la planta o alga en la que se introduce la PPO tolerante a los herbicidas que se proporciona en la presente puede presentar tolerancia contra dos o
5 más herbicidas que son diferentes entre sí en el mecanismo de acción. En la presente invención, pueden usarse dos o más herbicidas diferentes que incluyen el herbicida inhibidor de PPO, que son diferentes entre sí en el mecanismo de acción, de forma secuencial o simultánea, de esta manera controlando las malezas y/o eliminando organismos acuáticos no deseados. De aquí en adelante, el herbicida que es diferente
10 del herbicida inhibidor de PPO en el mecanismo de acción se denomina "segundo herbicida".

Una modalidad proporciona una composición para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas, que comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas descrita anteriormente, su variante o un gen que la codifica; y el
15 polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo codifica.

Otra modalidad proporciona un transformante con tolerancia a los herbicidas de plantas o algas o un clon o progenie de dicho transformante, que comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas descrita anteriormente, su variante o un gen que la codifica; y el polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo codifica.

20 Otra modalidad proporciona un método para preparar plantas o algas con tolerancia a los herbicidas, que comprende el paso de transformar algas o una célula, protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote de una planta o una planta entera con la proteína PPO tolerante a los herbicidas descrita anteriormente, su variante, o un gen que la codifica; y el polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo
25 codifica.

Otra modalidad proporciona un método para controlar malezas en un campo de cultivo, que comprende el paso de proporcionar al campo de cultivo una planta que posee la proteína PPO tolerante a los herbicidas descrita anteriormente, su variante o un gen que codifica cualquiera de las mismas; y el polipéptido tolerante al segundo
30 herbicida o un gen que lo codifica y un paso de aplicar una dosificación eficaz del

herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al campo de cultivo.

Otra modalidad proporciona un método para eliminar un organismo acuático de un medio de cultivo, que comprende el paso de proporcionar al medio de cultivo un alga que posee la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un gen que codifica cualquiera de las mismas; y el polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo codifica y un paso de aplicar una dosificación eficaz del herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa al medio de cultivo.

Por ejemplo, la planta o alga incluye adicionalmente el polipéptido tolerante al segundo herbicida o un gen que lo codifica, poseyendo por lo tanto una tolerancia novedosa y/o mejorada contra el segundo herbicida.

Por ejemplo, el segundo herbicida puede incluir herbicidas que inhiben la división celular, herbicidas que inhiben la fotosíntesis, herbicidas que inhiben la síntesis de aminoácidos, herbicidas que inhiben plastos, herbicidas que inhiben la membrana celular, y/o combinaciones de estos, de modo no taxativo. El segundo herbicida puede ser por ejemplo, glifosato, glufosinato, dicamba, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), herbicidas inhibidores de ALS (acetolactato sintasa (por ejemplo, imidazolidinona, sulfonilurea, triazolo pirimidina, sulfonanilida, tiobenzoato de pirimidina, etc.), herbicidas inhibidores de fotosistema II, herbicidas a base de fenilurea, herbicidas inhibidores de plastos, herbicidas a base de bromoxinilo y/o cualquier combinación de estos, de modo no taxativo.

Por ejemplo, el polipéptido tolerante al segundo herbicida puede ejemplificarse como uno o más seleccionados del grupo formado por EPSPS tolerante al herbicida glifosato (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato), GOX (glifosato oxidasa), GAT (glifosato-N-acetiltransferasa) o glifosato descarboxilasa; PAT (fosfinotricin-N-acetiltransferasa) tolerante al herbicida glufosinato, DMO (dicamba monooxigenasa) tolerante al herbicida dicamba; 2,4-D monooxigenasa o AAD (ariloxialcanoato dioxigenasa) tolerante al herbicida 2,4-D; ALS (acetolactato sintasa) tolerante al herbicida a base de sulfonilurea inhibidor de ALS, AHAS (acetohidroxiácido sintasa) o AtAHASL (subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa); proteína D1 del fotosistema II tolerante al herbicida inhibidor de fotosistema II;

citocromo P450 tolerante al herbicida a base de feinclurea; HPD (hidroxifenilpiruvato dioxigenasa) tolerante al herbicida inhibidor de plastos; nitrilasa tolerante al herbicida bromoxinilo; y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

Además, el gen que codifica el polipéptido tolerante a un segundo herbicida
5 puede ejemplificarse mediante uno o más tipos seleccionados del grupo formado por los genes cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 o gat4621 tolerantes al herbicida glifosato; los genes bar, pat o pat (SYN) tolerantes al herbicida glufosinato; el gen dmo tolerante al herbicida dicamba; los genes AAD-1, AAD-12 tolerantes al herbicida 2,4-D, los genes ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2,
10 SurA o SurB tolerantes al herbicida a base de sulfonilurea inhibidor de ALS; el gen psbA tolerante al herbicida inhibidor de fotosistema II; el gen CYP76B1 tolerante al herbicida fenilurea; el gen HPPDPF W336 tolerante al herbicida isoxaflutol, y el gen bxn tolerante al herbicida bromoxinilo; y combinaciones de estos, de modo no taxativo.

15 **【Efectos ventajosos】**

Una variante de proteína PPO tolerante a los herbicidas o un gen que la codifica que se proporciona en la presente es aplicada a plantas o algas y de este modo confiere y/o mejora rasgos más excelentes de tolerancia a herbicidas y el control selectivo se realiza usando herbicidas, y por lo tanto controla malezas o elimina organismos
20 acuáticos de forma más económica.

【Descripción de las figuras】

La figura 1 es el mapa del vector pACBB.

La figura 2 presenta el nivel de crecimiento celular después del tratamiento con
25 tiafenacilo a una concentración de 0 μ M (micromolar), 100 μ M o 400 μ M, de *E. coli* BT3 con deficiencia de PPO transformada con el vector de control pACBB-eGFP (V), con gen de PPO1 de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) susceptible a herbicidas inhibidores de PPO (AtPPO1 WT), con gen mutante PPO1 de *A. thaliana* PPO1 tolerante de a herbicidas inhibidores de PPO (AtPPO1 SLYM), con gen de CyPPO10
30 (Cy10 WT), y con gen de CyPPO13 (Cy13 WT), respectivamente.

La figura 3 es el mapa del vector pET303-CT-His.

La figura 4 presenta el diagrama esquemático de un vector recombinante para una proteína de fusión donde se fusionan MBP (proteína de unión a maltosa) y la proteína PPO.

5 La figura 5 es el mapa del vector pMAL-c2X.

La figura 6 es un diagrama esquemático que presenta a modo de ejemplo la estructura del vector binario para la transformación vegetal de genes de CyPPO.

La figura 7 es el resultado de la transferencia western que muestra el nivel de expresión de las proteínas variantes de CyPPO en T₂ de *A. thaliana* transformada con
10 variantes del gen CyPPO10 (variante F360I o variante F360M) o variante del gen CyPPO13 (variante F373M).

La figura 8 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T₃) transformados con el gen de CyPPO10 o CyPPO13 de tipo salvaje tras tratamiento con 1 µM de tiafenacilo. Col-O representa *A. thaliana*. no transgénica.

15 La figura 9 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T₂) transformados con genes que codifican una variante CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M o A167C+F360I) tras tratamiento con tiafenacilo a una concentración de 1 µM, 5 µM o 25 µM.

La figura 10 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T₂)
20 transformados con genes que codifican una variante CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373L, o A177L+F373I) tras tratamiento con tiafenacilo a una concentración de 1 µM o 10 µM.

La figura 11 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de *E. coli* BT3 con deficiencia de PPO (ΔPPO) transformados con un gen CyPPO10 de
25 tipo salvaje (indicado por Cy10 WT) o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con tiafenacilo a una concentración de 0µM, 5µM, 25µM, 50µM, 100µM y 200µM, respectivamente.

La figura 12 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (ΔPPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de
30 CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con saflufenacilo a una concentración de 0µM,

5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 13 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con fomesafeno a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 14 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con acifluorfen a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 15 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con flumioxazina a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 16 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con sulfentrazona a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 17 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con pentoxazona a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 18 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con piraflufen-etilo a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 19 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy10 WT o varios genes de CyPPO10 mutantes, tras tratamiento con piraclonil a una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 20 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3

con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con un gen CyPPO13 de tipo salvaje (indicado por Cy13 WT) o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con tiafenacilo a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M y 50 μ M, respectivamente.

La figura 21 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con saflufenacilo a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M y 50 μ M, respectivamente.

La figura 22 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con fomesafeno a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M, respectivamente.

La figura 23 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con acifluorfenó a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M, respectivamente.

La figura 24 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con flumioxazina a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M y 50 μ M, respectivamente.

La figura 25 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con sulfentrazona a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M, respectivamente.

La figura 26 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con pentoxazona a una concentración de 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M, respectivamente.

La figura 27 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con piraflufen-etilo a una concentración de 0 μ M,

5µM, 25µM, 50µM, 100µM y 200µM, respectivamente.

La figura 28 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con piraclo-nil a una concentración de 0µM, 5µM, 25µM, 50µM, 100µM y 200µM, respectivamente.

La figura 29 presenta el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3 con deficiencia de PPO (Δ PPO) transformados con Cy13 WT o varios genes de CyPPO13 mutantes, tras tratamiento con oxadiazona a una concentración de 0µM, 5µM, 25µM, 50µM, 100µM y 200µM, respectivamente.

La figura 30 es el mapa del vector pET29b.

Las figuras 31a a 31c presentan los resultados de la germinación de semillas de transformantes de *A. thaliana* transformados con el gen de CyPPO10 o CyPPO13 de tipo salvaje o un gen mutante de este, al 7° día después de sembrar en un medio 1/2 MS con varios herbicidas. Col-0 significa *A. thaliana* no transgénica.

La figura 32 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T_3) transformados con genes que codifican una variante CyPPO10 (F360I, F360L, F360M, A167C+F360I, A167C+F360M o V305M+F360M) tras tratamiento con 25 µM de tiafenacilo o 100 µM de saflufenacilo. Col-0 significa *A. thaliana* no transgénica.

La figura 33a presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T_3) transformados con un gen que codifica una variante CyPPO10 (F360I o A167L+F360M), tras tratamiento con tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina o sulfentrazona a una concentración de 50 µM, respectivamente.

La figura 33b presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T_3) transformados con un gen que codifica una variante CyPPO13 (A177L+F373L o A177L+F373I) tras tratamiento con saflufenacilo, tiafenacilo, flumioxazina, sulfentrazona, oxifluorfen o piraclo-nilo a una concentración de 50 µM, respectivamente. Col-0 significa *A. thaliana* no transgénica.

La figura 34 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T_4) transformados con CyPPO10 F360I tras tratamiento con 15 µM de tiafenacilo o 150 µM de saflufenacilo.

La figura 35 presenta el nivel de daño de transformantes de *A. thaliana* (T₅) transformados con CyPPO10 F360I tras tratamiento con 15 µM de tiafenacilo o 150 µM de saflufenacilo. Col-0 significa *A. thaliana* no transgénica.

La figura 36 es el resultado de una transferencia western que muestra la expresión de la proteína CyPPO10 F360I en transformantes de *A. thaliana* (T₄ o T₅) transformados con CyPPO10 F360I.

La figura 37 es el mapa del vector binario pB2GW7.0.

La figura 38 presenta el nivel de daño en hojas de soja T₀ transformadas con el gen de CyPPO10 A167L+F360M mutante tras tratamiento con 5 µM o 15 µM de tiafenacilo. Soja Kwangan significa soja no transgénica (cultivar).

La figura 39 proporciona resultados de transferencia southern que muestran la presencia del transgén en soja transformada con CyPPO10 A167L+F360M.

La figura 40 presenta la tolerancia a los herbicidas de las sojas transgénicas T1 (CyPPO10 A167L+F360M) 5 días después del tratamiento de aerosol con 25 µM de tiafenacilo o 150 µM de saflufenacilo. Soja Kwangan significa soja no transgénica (cultivar).

La figura 41 presenta el nivel de crecimiento celular de BT3 (ΔPPO) *E. coli* transformado con un gen mutante de CyPPO10 cuando se cultiva en un medio que contiene herbicida.

【Modos de la invención】

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle con ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos tienen solamente fines ilustrativos y no se pretende que la invención se limite a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Aislamiento del gen de PPO a partir de procariota

Se recolectaron genes de PPO usando la base de datos Genbank de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab y los genes de PPO se sintetizaron con información con codones optimizados para el análisis de la resistencia a los herbicidas eficaz en BT3 *E. coli*. Los genes de PPO sintetizados fueron

amplificados en las siguientes condiciones usando los cebadores de la Tabla 1 para clonar el vector pACBB.

Se prepararon cincuenta microlitros (50 µl) de mezcla de reacción de PCR mezclando 1 µl de plantilla (ADN sintético de cada gen), 5 µl de tampón 10X, 1 µl de mezcla dNTP (cada 10 mM), 1 µl de un cebador directo (remitirse a la Tabla 1; 10 µM), 1 µl de un cebador inverso (remitirse a la Tabla 1; 10 µM), 40 µl de DDW y 1 µl de Pfu-X (Solgent, 2,5 unidad/ µl) y la amplificación se llevó a cabo en condiciones a 1 ciclo de 94 °C durante 4 minutos, 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1,5 minutos y 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos.

La PPO aislada de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 se designó como CyPPO10, y la PPO aislada de la cepa JA-3-3Ab de *Synechococcus* sp. se designó como CyPPO13, respectivamente.

【Tabla 1】

Cepa	Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	CyPPO10_BamHI F	CCCCGGATCCATGATTGAAGTGGATGTGGC	8
	CyPPO10_XhoI R	CCCCCTCGAGTGATTGTCCACCAGCGAGGT	9
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	CyPPO13_BamHI F	CCCCGGATCCATGAACCCTGCTACCCCTGA	10
	CyPPO13_XhoI R	ccccctcgag cacctgtgat aacaactgct	11

Ejemplo 2. Tolerancia a los herbicidas de CyPPO10 y CyPPO13

La tolerancia a los herbicidas de CyPPO10 y CyPPO13 se evaluó usando *E. coli* con deficiencia de PPO.

Tras transformar BT3 *E. coli* con deficiencia de PPO (Δ PPO) con CyPPO10 o CyPPO13, la BT3 transformada (Δ PPO) se cultivó en placas de agar LB con herbicida inhibidor de PPO para examinar el nivel de crecimiento de BT3 transformada (Δ PPO). La cepa BT3 (Δ PPO) se obtuvo de Hokkaido University (Japón). La cepa BT3 (Δ PPO) tiene deficiencia de PPO de tipo hemG y tiene tolerancia a la kanamicina (remitirse a "Watanabe et ál., Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame inhibition codons, JBC 2001 276(23):20474–20481; Che et ál., Molecular Characterization and Subcellular

Localization of Protoporphyrinogen Oxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Physiol. 2000 Set;124(1):59-70").

El proceso de ensayo específico fue el siguiente:

Los genes de CyPPO10 y CyPPO13 se clonaron en el vector pACBB (plásmido #32551; Addgene; remitirse a la Figura 1).

Específicamente, los productos de PCR amplificados en el Ejemplo 1 se trataron con enzimas de restricción BamHI y XhoI (New England Biolabs) y se ligaron con un vector pACBB-eGFP que fue tratado con las mismas enzimas de restricción.

El tratamiento con enzimas de restricción se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

30 µl (microlitros) del producto de PCR, 0,5 µl de BamHI y XhoI (New England Biolabs) respectivamente, 4 µl de tampón 10X y 5,5 µl de agua; Reacción de enzima de restricción 37 °C, 1hr

La reacción de ligación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

0,5 µl de T4 ADN ligasa (RBC), 1 µl de tampón A, 1 µl de tampón B, productos de PCR y vector tratados con las enzimas de restricción, total 10 µl; 22 °C, 30min.

Los plásmidos clonados se agregaron a 100 µl de célula competente BT3 (Hokkaido University; Japón) respectivamente, realizando la transformación entonces por un método de choque de calor. La *E. coli* transformada con cada gen de PPO se cultivó en medio de agar LB (Luria-Bertani) con cloranfenicol (Duchefa).

Para el cultivo de siembra de *E. coli* transformada con los genes respectivos, cada colonia simple de transformante de *E. coli* obtenida según lo explicado anteriormente se cultivó en 3 ml de caldo LB con cloranfenicol durante la noche (220 rpm, 37 °C) y 50 a 100 µl se subcultivaron en 3 ml de un nuevo caldo LB, se cultivaron hasta que la absorbancia (OD₆₀₀) alcanzó 0,5-1, y se diluyeron con caldo LB a absorbancia (OD₆₀₀) de 0,5. La solución diluida se volvió a diluir en serie 5 veces por un factor de un décimo con caldo LB. A continuación, 10 µl de cada solución diluida se vertieron en medio de agar LB (placa de Petri) con tiafenacilo a una concentración de 0 µM, 100 µM y 400 µM,. El medio de agar LB se incubó a 37 °C, en condiciones de luz

y se observó el nivel de inhibición del crecimiento después de 16 a 20 horas de incubación.

A efectos comparativos, se llevó a cabo el mismo ensayo usando un transformante de BT3 *E. coli* transformado con el vector pACBB-eGFP (plásmido #32551; Addgene; remitirse a la Figura 1) (V; vector pACBB-eGFP); transformante de BT3 *E. coli* transformado con el gen de PPO1 de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) de tipo salvaje (AtPPO1 WT, AtPPO1 de tipo salvaje; susceptible a PPO) (SEQ ID NO: 6); y el transformante de BT3 *E. coli* transformado con un gen de PPO1 de *A. thaliana* mutante que codifica AtPPO1 mutado (AtPPO1 SLYM, SEQ ID NO: 7) con las sustituciones de aminoácidos Y426M (el residuo de aminoácido 426°, tirosina, se sustituyó con metionina) y S305L (el residuo de aminoácido 305°, serina, se sustituyó con leucina), a partir de la secuencia de aminoácidos de tipo de tipo salvaje AtPPO1 (SEQ ID NO: 5) (Li et ál. Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiol. 2003 133:736-747).

El resultado obtenido se presenta en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, en un medio que no contiene herbicida (tiafenacilo 0 μ M), el transformante de BT3 (V) transformado con pACBB-eGFP en el que el gen de PPO no se introdujo no fue recuperado y el crecimiento de transformantes de BT3 transformados con PPO susceptible al gen de PPO1 de *A. thaliana* de tipo salvaje (AtPPO1 WT), gen de PPO1 de *A. thaliana* mutante tolerante a PPO (AtPPO1 SLYM), gen de CyPPO10 (Cy10 WT) o gen de CyPPO13 (Cy13 WT) fueron recuperados, ya que cada gen introducido funcionaba como la enzima PPO en BT3. Estos resultados demuestran que ambos CyPPO10 y CyPPO13 ejercen la función de PPO normal.

El transformante de BT3 (AtPPO1 WT) transformado con gen de PPO1 de *A. thaliana* de tipo salvaje que es susceptible a tiafenacilo, creció normalmente en un medio sin herbicida (0 μ M), pero no creció en un medio con 100 μ M de tiafenacilo. El transformante de BT3 (AtPPO1 SLYM) transformado con el gen de PPO1 de *A. thaliana* mutante que es tolerante a tiafenacilo, gradualmente comenzó a presentar inhibición de crecimiento a partir de 100 μ M de tiafenacilo y casi no creció a 400 μ M.

Los transformantes de BT3 transformados con el gen de CyPPO10 o CyPPO13 crecieron en el medio con tiafenacilo 100 μ M a un nivel similar al del medio que sin tiafenacilo y también crecieron bien incluso en el medio con tiafenacilo 400 μ M. Con estos resultados, se demostró que los genes de CyPPO10 y CyPPO13 pueden presentar una tolerancia a tiafenacilo significativamente mayor en comparación con PPO1 de *A. thaliana* de tipo salvaje que es susceptible a tiafenacilo y un nivel similar o mayor de tolerancia a tiafenacilo en comparación con el mutante PPO1 de *A. thaliana* con tolerancia a tiafenacilo.

Ejemplo 3. Determinación de residuos de aminoácido de PPO que interactúan con herbicidas inhibidores de PPO de PPO y complejo de herbicidas inhibidores de PPO

Para investigar la información de estructura de unión entre proteína PPO y herbicida, se usaron para el ensayo tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina o sulfentrazona como ejemplos representativos de herbicidas inhibidores de PPO. Un gen que codifica la proteína CyPPO10 se clonó en el vector pET29b (número de catálogo: 69872-3; EMD Biosciences; remitirse a la Figura 30) y expresado como una proteína CyPPO10 usando el sistema de *E. coli*. La proteína CyPPO10 expresada se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel y se cristalizó con herbicidas inhibidores de PPO. A continuación, usando un acelerador de radiación de sincrotrón, se obtuvieron datos de difracción de rayos X de la resolución de 2,4 Å de los complejos de CyPPO10 y tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina o sulfentrazona para identificar la estructura tridimensional del complejo. Mediante este proceso, se recopiló la información sobre la posición de mutaciones de aminoácidos en proteínas CyPPO10 que confieren tolerancia a los herbicidas.

Como resultado del análisis de la estructura del complejo de CyPPO10 y tiafenacilo, se concluyó que los aminoácidos de N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360 y I408 de la proteína CyPPO10 (SEQ ID NO: 2) interactuaban con tiafenacilo.

Usando la información de unión derivada de la estructura del complejo de CyPPO10 y tiafenacilo, se identificaron los residuos de aminoácido que interactúan con tiafenacilo en la proteína CyPPO13 (SEQ ID NO: 4) mediante análisis de homología de secuencia (NCBI BLAST,

5 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) entre aminoácidos de CyPPO10 (SEQ ID NO: 2) y CyPPO13.

Como resultado se determinó que los aminoácidos de las posiciones R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353 y F373 de la proteína
10 CyPPO13 (SEQ ID NO: 4) interactuaban con tiafenacilo.

Ejemplo 4. Preparación de variantes de PPO

Para mejorar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de CyPPO10 y CyPPO13, ambos genes fueron mutados en las posiciones de los aminoácidos que
15 interactúan con los herbicidas, según lo descrito en el Ejemplo 3, preparando así los genes mutados para aumentar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO.

Los genes de PPO mutantes se aislaron y amplificaron por PCR en las siguientes condiciones usando los cebadores de la Tabla 3:

Materiales

20 Plantilla (ADN sintético de CyPPO10 o CyPPO13) 1 µl
Tampón 10X 5 µl
mezcla dNTP (10 mM cada uno) 1 µl
Cebador directo (10 µM) 1 µl
Cebador inverso (10 µM) 1 µl
25 DDW 40µl
Pfu-X (Solgent, 2,5 unidad/µl) 1 µl
Total 50 µl

【Tabla 2】

Condiciones de PCR

94 °C	4 min	
94 °C	30 seg	25 ciclos

56 °C	30 seg	
72 °C	1,5min	
72 °C	5min	
4 °C	5min	

【Tabla 3】

Cepa	Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	CyPPO10_XbaI F	CCCCTCTAGAATGATTGAAGTGGATGTGGC	12
	CyPPO10_XhoI R	CCCCCTCGAG TGATTGTCCA CCAGCGAGGT	13
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	CyPPO13_XbaI F	CCC TCTAGAATG AAC CCT GCT ACC CCT GA	14
	CyPPO13_XhoI R	CCCCCTCGAG CACCTGTGAT AACAACTGCT	15

Los productos génicos amplificados y vector pET303-CT His (VT0163; Novagen; remitirse a la figura 3) se acoplaron con XbaI y XhoI, y a continuación se prepararon plásmidos pET303-CyPPO10 y pET303-CyPPO13 respectivamente usando ligasa de ADN T4 (RBC, 3 unidad/μl).

Los genes mutantes de CyPPO10 y CyPPO13 se prepararon realizando PCR en las siguientes condiciones usando cebadores de las siguientes Tablas 5 y 6, y usando CyPPO10 y CyPPO13 clonados al vector pET303-CT His como plantilla.

- 10 Materiales
- Plantilla 1 μl
- Tampón 10X 5 μl
- mezcla dNTP (10 mM cada uno) 1 μl
- Cebador directo (10 μM) 1 μl
- 15 Cebador inverso (10 μM) 1 μl
- DDW 40 μl
- Pfu-X (Solgent, 2,5 unidad/μl) 1 μl
- Total 50 μl

【Tabla 4】

- 20 Condiciones de PCR

94 °C	4 min	17~25 ciclos
94 °C	30 seg	
56~60 °C	30 seg	
72 °C	3min	

72 °C	5min	
4 °C	5min	

【Tabla 5】

Lista de cebadores para construir el gen de CyPPO13 mutante

Mutación de aminoácidos de CyPPO10	Secuencia de cebador (5'-> 3')
F360M	F: GTT TTT ACC TCT ATG ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 16) R: AGC ACC TCC TAT CAT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 17)
F360V	F: GTT TTT ACC TCT GTT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 18) R: AGC ACC TCC TAT AAC AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 19)
F360I	F: GTT TTT ACC TCT ATT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 20) R: AGC ACC TCC TAT AAT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 21)
F360T	F: GTT TTT ACC TCT ACT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 22) R: AGC TCC ACC AAT AGT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 23)
F360L	F: GTT TTT ACC TCT CTT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 24) R: AGC TCC ACC AAT AAG AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 25)
F360C	F: GTT TTT ACC TCT TGT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 26) R: AGC TCC ACC AAT ACA AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 27)
A167C	F: TCAGGAGTGTAC TGT GGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 28) R: TTGAGGATCTCC ACA GTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 29)
A167L	F: TCAGGAGTGTAC CTT GGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 30) R: TTGAGGATCTCC AAG GTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 31)
P303L+V305L	F: ATACCTTAT CTT ACT CTT GCT TGT GTT GTG (SEQ ID NO: 32) R: AACACAAGC AAG AGT AAG ATA AGG TAT (SEQ ID NO: 33)
V305M	F: CCTTATCCAAC ATG GCTTGTGTTGTGCTT (SEQ ID NO: 34) R: CACAACACAAGC CAT AGTTGGATAAGGTAT (SEQ ID NO: 35)
N59T	F: GAG CTT GGT CCA ACT AGT TTC GCT C (SEQ ID NO: 36) R: AGCGAAACT AGT TGGACCAAGCTCCCA (SEQ ID NO: 37)
R89A	F: CAC CTT CCA GCT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 38) R: GTA TAT ATA AGC TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 39)
V165S	F: GTT TCA GGA TCA TAC GCT GGA GAT CCT CAA CAG (SEQ ID NO: 40) R: TCC AGC GTA TGA TCC TGA AAC AAA TGG TGC CAC (SEQ ID NO: 41)
V305T	F: CCTTATCCAAC ACT GCTTGTGTTGTGCTT (SEQ ID NO: 42) R: CACAACACAAGC AGT AGTTGGATAAGGTAT (SEQ ID NO: 43)
S60T	F: GGT CCA AAC ACT TTC GCT CCT ACT CCA GCA CTC (SEQ ID NO:44)

	R: AGG AGC GAA AGT GTT TGG ACC AAG CTC CCA CAC (SEQ ID NO: 45)
I340T	F: CTC GGA ACC ACC TGG TCT TCA TGC TTA TTC CCA (SEQ ID NO: 46) R: TGA AGA CCA GGT GGT TCC GAG TGT CCT TAT ACC (SEQ ID NO: 47)
R89L	F: CAC CTT CCA CTT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 48) R: GTA TAT ATA AAG TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 49)
R89V	F: CAC CTT CCA GTT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 50) R: GTA TAT ATA AAC TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 51)
F161A	F: AGATTGGTGGCACCAGCAGTTTCAGGAGTGTAC (SEQ ID NO: 52) R: GTACACTCCTGAAACTGCTGGTGGCCACCAATCT (SEQ ID NO: 53)
V165C	F: CCATTTGTTTCAGGA TGCTACGCTGGAGATCCT (SEQ ID NO: 54) R: AGGATCTCCAGCGTAGCATCCTGAAACAAATGG (SEQ ID NO: 55)
Q184G	F: TTTAGAAGGATTGCTGGACTTGAGAAGTTGGGA (SEQ ID NO: 56) R: TCCCAACTTCTCAAGTCCAGCAATCCTTCTAAA (SEQ ID NO: 57)
F324V	F: TCAGTTAGACCTGGAGTTGGTGTTCCTGGTGCCT (SEQ ID NO: 58) R: AGGCACCAAAACACCAACTCCAGGTCTAACTGA (SEQ ID NO: 59)
L327T	F: CCTGGATTGTTGTTACCGTGCCTAGAGGACAA (SEQ ID NO: 60) R: TTGTCCTCTAGGCACGGTAACACCAAATCCAGG (SEQ ID NO: 61)
A167I	F: TCAGGAGTGATACATTGGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 62) R: TTGAGGATCTCCAATGTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 63)
I408R	F: AGAAGGGCTCGTCCACAATATATCGTTGGTTAC (SEQ ID NO: 64) R: TATTGTGGACGAGCCCTTCTCCAAACCTTC (SEQ ID NO: 65)
I408W	F: GGTTCGGAGAAGGGCTTGCCACAATATATCGTTGG (SEQ ID NO: 66) R: CCAACGATATATTGTGGCCAAGCCCTTCTCCAAACC (SEQ ID NO: 67)

【Tabla 6】

Lista de cebadores para construir el gen de CyPPO13 mutante

Mutación de aminoácidos de CyPPO13	Secuencia de cebador (5'-> 3')
F373M	F: TCATTTCTCAGT ATG TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 68) R: AGCACCTCCTAA CAT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 69)
F373V	F: TCATTTCTCAGT GTT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 70) R: AGCACCTCCTAA AAC ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 71)
F373I	F: TCATTTCTCAGT ATT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 72) R: AGCACCTCCTAA AAT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 73)
F373T	F: TCATTTCTCAGT ACT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 74)

	R: AGCACCTCCTAA AGT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 75)
F373L	F: TCATTTCTCAGT CTT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 76) R: AGCACCTCCTAA AAG ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 77)
F373C	F: TCATTTCTCAGT TGT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 78) R: AGCACCTCCTAA ACA ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 79)
R101A	F: AAGTTGCCAGCATATATCTACTGGGAGGGTGC (SEQ ID NO: 80) R: AGTAGATATATGCTGGCAACTTTGCATCAGCC (SEQ ID NO: 81)
A177C	F: TCA GGA GTT TAT TGT GGA GAT CCT GAT CAA (SEQ ID NO:82) R: ATC AGG ATC TCC ACA ATA AAC TCC TGA TGT (SEQ ID NO: 83)
A177L	F: TCAGGAGTTTAT CTT GGAGATCCTGATCAA (SEQ ID NO: 84) R: ATCAGGATCTCC AAG ATAACTCCTGATGT (SEQ ID NO: 85)
A177I	F: GGAGTTTATATTGGAGATCCTGATCAACTTAG (SEQ ID NO: 86) R: AGGATCTCCAATATAAACTCCTGATGTGAAAG (SEQ ID NO: 87)
P316L+V318L	F: ATA CTC TAT CTT CCT CTT GCT GTT GTG GCT (SEQ ID NO: 88) R: CAC AAC AGC AAG AGG AAG ATA GAG TAT TTC (SEQ ID NO: 89)
V318L	F: TATCCACCTCTTGCTGTTGTGGCTCTTGCATAC (SEQ ID NO: 90) R: CAACAGCAAGAGGTGGATAGAGTATTTCTGCC (SEQ ID NO: 91)
V318M	F: CTC TAT CCA CCT ATG GCT GTT GTG GCT CTT (SEQ ID NO: 92) R: AGC CAC AAC AGC CAT AGG TGG ATA GAG TAT (SEQ ID NO: 93)
P316A+V318L	F: ATA CTC TAT GCT CCT CTT GCT GTT GTG GCT (SEQ ID NO: 94) R: CAC AAC AGC AGC AGG AAG ATA GAG TAT TTC (SEQ ID NO: 95)
F373N	F: TTTCTCAGTAACTTAGGAGGTGCTACAGATGC (SEQ ID NO: 96) R: CCTCCTAAGTTACTGAGAAATGAGTGATAAC (SEQ ID NO: 97)
F373H	F: TTTCTCAGTCACTTAGGAGGTGCTACAGATGC (SEQ ID NO: 98) R: CCTCCTAAGTGACTGAGAAATGAGTGATAAC (SEQ ID NO: 99)
G194Q	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTCAGCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 100) R: CCGTATCTCTCTTCGAGCTGAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 101)
G194K	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTAAACTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 102) R: CCGTATCTCTCTTCGAGTTTAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 103)
G194R	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTCGTCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 104) R: CCGTATCTCTCTTCGAGACGAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 105)
G194E	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTGAACTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID

	NO: 106) R: CCGTATCTCTCTTCGAGTTCAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 107)
G194M	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTATGCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 108) R: CCGTATCTCTCTTCGAGCATAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 109)
F337V	F: CAGCCATTAAGAGGAGTGGGTCATCTCATCCC (SEQ ID NO: 110) R: GGGATGAGATGACCCACTCCTCTTAATGGCTG (SEQ ID NO: 111)
L340T	F: GAGGATTTGGTCATACCATCCCTAGGTCTCAAG (SEQ ID NO: 112) R: CTTGAGACCTAGGGATGGTATGACCAAATCCTC (SEQ ID NO: 113)
I353T	F: GAACCTTGGGTACTACCTGGGCTTCATGTTTG (SEQ ID NO: 114) R: CAAACATGAAGCCCAGGTAGTACCCAAGGTTTC (SEQ ID NO: 115)
F171A	F: AGATTGGTGGAGCCTGCTACATCAGGAGTTTAT (SEQ ID NO: 116) R: ATAAACTCCTGATGTAGCAGGCTCCACCAATCT (SEQ ID NO: 117)
R101A	F: GATGCAAAGTTGCCAGCTTATATCTACTGGGAG (SEQ ID NO: 118) R: CTCCCAGTAGATATAAGCTGGCAACTTTGCATC (SEQ ID NO: 119)
V175C	F: CCTTTCACATCAGGATGTTATGCTGGAGATCCT (SEQ ID NO: 120) R: AGGATCTCCAGCATAACATCCTGATGTGAAAGG (SEQ ID NO: 121)
V175L	F: ACATCAGGATTGTATGCTGGAGATCCTGATC (SEQ ID NO: 122) R: TCCAGCATACAATCCTGATGTGAAAGGCTCCAC (SEQ ID NO: 123)

Ejemplo 5. Tolerancia a herbicidas inhibidores de PPO de PPO y sus variantes

Para mejorar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de CyPPO10 y
5 CyPPO13, los aminoácidos que interactúan con el herbicida, según lo descrito en el
Ejemplo 3, se mutaron. Tras transformar BT3 *E. coli* con deficiencia de PPO (Δ PPO)
con un gen de PPO con estas mutaciones, éstas se cultivaron con presencia de
herbicida inhibidor de PPO, para observar el crecimiento de *E. coli* transformada, del
siguiente modo:

10 Los plásmidos pET303-CyPPO10 o pET303-CyPPO13 preparados en el
Ejemplo 4 y los plásmidos que contienen cada gen mutante, se usaron para transformar
una célula competente BT3 por un método de choque de calor y se cultivaron en un
medio de agar LB con ampicilina (100 µg/ml).

Para el cultivo semilla de transformantes de BT3, se cultivó una única colonia de estos en 3 ml de caldo LB (LPSS) con ampicilina durante 12 horas o más, y 50~100 µl de la solución cultivada se cultivó adicionalmente hasta que la absorbancia (OD₆₀₀) alcanzó 0,5 a 1. A continuación, la solución cultivada obtenida se diluyó con caldo LB para ajustar la absorbancia (OD₆₀₀) a 0,5 y se volvió a diluir en serie 5 veces por un factor de un décimo con caldo LB.

Se mezclaron LB (25 g/l), agar Bacto (12 g/l), ampicilina (100 µg/ml) y varios herbicidas (0~200 µM), para preparar el medio con herbicida.

Diez microlitros de la solución diluida se vertieron en el medio con herbicida y el medio se incubó con luz durante 16-20 horas a 37 °C. Se evaluó el nivel de crecimiento y la tolerancia a herbicida inhibidor de PPO de BT3 transformada con cada gen.

Los herbicidas usados en el ensayo se enumeran en la Tabla 7 a continuación:

【Tabla 7】

Familia	Herbicida
Herbicidas a base de pirimidindiona	Tiafenacilo
	Saflufenacilo
Herbicidas a base de difeniléter	Fomesafeno
	Acifluorfen
Herbicidas a base de N-fenilftalimida	Flumioxazina
Herbicidas a base de triazolinonas	Sulfentrazone
Herbicidas a base de oxazolidindionas	Pentoxazona
Herbicidas a base de fenilpirazolos	Piraflufenetilo
Otros herbicidas	Piraclonilo

La tolerancia a los herbicidas se evaluó relativamente en comparación con CyPPO de tipo salvaje y se presenta en las Tablas 8 a 11 a continuación y las Figuras 11 a 29:

【Tabla 8】

CyPPO10 mutación	Tiafenacilo (hasta 200 µM)	Saflufenacilo (hasta 200 µM)	Acifluorfen (hasta 200 µM)	Fomesafeno (hasta 200 µM)
CyPPO10 (de tipo salvaje)	-	-	-	-

F360C	++++	++++	++++	++++
F360I	++++	++++	++++	++++
F360L	++++	++++	++++	++++
F360M	++++	++++	++++	++++
F360V	++++	++++	++++	++++
A167C	+++	+	++++	++++
A167L	++++	+++	++++	++++
P303L+V305L	NT	NT	++	+
V305M	++	+	+++	++++

NT (no analizado)

【Tabla 9】

CyPPO10 mutación	Pentoxazona (hasta 200 µM)	Piraflufen -etilo (hasta 200 µM)	Piraclonilo (hasta 200 µM)	Flumioxazina (hasta 200 µM)	Sulfentrazone (hasta 200 µM)
CyPPO10 (de tipo salvaje)	-	-	-	-	-
F360C	++++	++++	++++	++++	++++
F360I	++++	++++	++++	++++	++++
F360L	++++	++++	++++	++++	++++
F360M	++++	++++	++++	++++	++++
F360V	++++	++++	++++	NT	++++
A167C	++++	++++	++++	+	++
A167L	++++	++++	++++	++++	+++
P303L+V305L	++++	+	+++	NT	NT
V305M	++++	+	+++	NT	NT

NT (no analizado)

【Tabla 10】

CyPPO13 mutación	Tiafenacilo (hasta 50 µM)	Saflufenacilo (hasta 50 µM)	Acifluorfen (hasta 200 µM)	Fomesafeno (hasta 200 µM)	Pentoxazona (hasta 200 µM)
CyPPO13 (de tipo salvaje)	-	-	-	-	-
F373C	+++++	+++	+++	+++	++++
F373I	+++++	+++++	+++	+++	+++++
F373L	+++++	+++++	+++	++++	+++++
F373M	+++++	+++	+++	++++	+++++
F373T	+++++	++++	++++	++++	++++
A177C	NT	+	++++	++++	++++
A177L	++	+	++++	++++	++++
V318M	NT	NT	+++	++	+
P316A+V318L	NT	NT	+++	-	NT
P316L+V318L	NT	NT	+++	++	NT

5 NT (no analizado)

【Tabla 11】

CyPPO13 mutación	Piraflufen -etilo	Piraclonilo (hasta 200 µM)	Sulfentrazone (hasta 200 µM)	Flumioxazina (hasta 50 µM)
---------------------	----------------------	-------------------------------	---------------------------------	-------------------------------

	(hasta 200 μ M)			
CyPPO13	-	-	-	-
F373C	++	+++++	-	-
F373I	++	+++++	++++	++++
F373L	++	+++++	++++	++++
F373M	++	+++++	++++	+++
F373T	++++	++++	+	++++
A177C	+++++	++++	++++	-
A177L	+++++	+++	++++	++++
V318M	++	-	+	NT
P316A+V318L	+	-	-	NT
P316L+V318L	+	-	+	NT

NT (no analizado)

En las Tablas 8 a 11, el nivel de tolerancia a los herbicidas del tipo salvaje se representó por “-” y el nivel de tolerancia a los herbicidas se graduó representando el nivel igual de tolerancia por “-” y, en caso de ser mayor, agregando “+” hasta un
5 máximo de “+++++”.

Las figuras 11 a 19 (de tipo salvaje y variantes de CyPPO10) y las Figuras 20 a 29 (de tipo salvaje y variantes de CyPPO13) presentan los resultados de cultivar *E. coli* transformado con genes de CyPPO (de tipo salvaje y tipo variante) y la concentración descrita en la parte superior es la concentración del herbicida tratado. Seis columnas de
10 cada concentración se diluyeron secuencialmente 5 veces por un factor de un décimo con la solución de cultivo *E. coli* a la derecha y la columna de más a la izquierda es el resultado de la solución de cultivo de *E. coli* OD600=0,5.

Como se muestra en las Tablas 8 a 11 y las Figuras 11 a 29, se demostró que todos los transformantes transformados con genes mutantes de CyPPO10 y CyPPO13
15 presentaron igual o mayor nivel de tolerancia a los herbicidas con varios tipos de herbicidas, en comparación con el transformante con el gen de tipo salvaje.

Ejemplo 6: Medición de la actividad enzimática y valores IC₅₀ por herbicidas de PPO

20 Se examinaron las actividades enzimáticas de la proteína PPO y variantes de la proteína PPO y se llevó a cabo un ensayo de inhibición por herbicidas inhibidores de

PPO. Se confirmó que la proteína PPO tenía baja solubilidad en agua, pero que en caso de expresarse como proteína de fusión con MBP (proteína de unión a la maltosa) (MBP-PPO), la proteína PPO puede expresarse establemente como una forma soluble en agua. Por lo tanto, las proteínas de tipo salvaje y variantes que se expresaron en la forma de
5 proteína de fusión con MBP se usaron en esta prueba (remitirse a la Figura 4).

Con el fin de expresar los genes de tipo salvaje y genes mutantes de CyPPO10 y CyPPO13 (remitirse al Ejemplo 1 y Ejemplo 4), esos genes se introdujeron respectivamente en el vector pMAL-c2X (remitirse a la Figura 5), y a continuación se se usaron para transformar...BL21 (DE3) *E. coli* (CodonPlus).

10 Las *E. coli* transformadas se cultivaron en las siguientes condiciones para expresar los genes de PPO introducidos:

Inducción: OD₆₀₀=0,2, adición de IPTG a 0,3 mM de concentración final;

Temperatura de expresión: 23 °C, agitación de 200 rpm del cultivo;

Tiempo de expresión: 16hrs

15 Escala de cultivo: 200 ml/1.000 ml matraz.

La lisis celular y extracción de proteína de las células *E. coli* cultivadas se llevaron a cabo por los siguientes procesos :

Tampón de extracción: Tampón de columna (50 mM de Tris-Cl, pH8,0, 200 mM de NaCl) 5 ml de tampón/g de célula;

20 Sonicación: SONICS&MATERIALS VCX130 (130 watts);

15 seg ENCENDIDO, 10 seg APAGADO durante 5 min sobre hielo;

Centrifugación a 4 °C durante 20 minutos (20.000 g); y se diluyó el sobrenadante obtenido por la centrifugación a una relación de 1:6 usando tampón de columna.

25 El siguiente proceso de purificación de la proteína PPO se llevó a cabo en una habitación fría a 4 °C. Se empaquetó Resina amilosa (New England Biolabs) en una columna 1,5x15 cm (Bio-Rad Econo Columns 1,5 x 10 cm, columna de cromatografía de vidrio, máx. vol), y los extractos de proteína obtenidos se cargaron en la columna a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se lavó la columna con 3 volúmenes de columna
30 de tampón y se monitoró la cantidad de proteína en la solución de lavado. Cuando ya no

se detectó proteína, se finalizó el lavado. A continuación, la proteína MBP-PPO se eluyó con aproximadamente 2 volúmenes de columna de tampón con 20 mM de maltosa. Se determinó la concentración de proteína de cada eluyente y la elución se detuvo cuando la proteína ya no se detectó más. Se analizaron diez microlitros de cada
5 fracción para cuantificación de proteínas y análisis SDS-PAGE. Las fracciones altamente puras con proteínas PPO se tomaron para ensayo de actividad enzimática.

La actividad enzimática de la proteína de tipo salvaje purificada y las proteínas variantes de CyPPO10 y CyPPO13 se midió por el siguiente proceso.

En primer lugar, se sintetizó un sustrato de proteína PPO, protoporfirinógeno
10 IX. Este proceso se llevó a cabo en un espacio con introducción de una corriente de nitrógeno. Se disolvieron 6 mg de protoporfirina IX en 20% (v/v) de EtOH 20 ml y se agitó en condiciones de oscuridad durante 30 minutos. La solución de protoporfirinógeno IX obtenida se depositó en un tubo roscado de 15 ml en una cantidad de 800 µl y se sometió a arrastre con gas nitrógeno durante 5 minutos. A la solución, se
15 agregó 1 g de amalgama de sodio y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Se abrió la tapa para hacer escapar el gas hidrógeno del tubo. A continuación, la tapa se cerró e incubó durante 3 minutos. La solución de protoporfirina IX se filtró usando una jeringa y un filtro de membrana de celulosa. A 600 µl de la solución de protoporfirina IX obtenida, se le agregó 2M MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico] en una
20 cantidad de aproximadamente 300 µl, ajustando así el pH hasta 8,0. Para determinar la actividad enzimática de una proteína PPO, se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición (basada en 10 ml de mezcla): 50 mM de Tris-Cl (pH 8,0); 50 mM de NaCl; 0,04% (v/v) de Tween 20; 40 mM de glucosa (0,072 g); 5 unidades de glucosa oxidasa (16,6 mg) y 10 unidades de catalasa (1 µl).

25 Se colocaron doscientos microlitros (200 µl) de una mezcla de reacción con una proteína PPO purificada en placas de 96 pocillos y se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para reducir la concentración de oxígeno por la reacción de glucosa oxidasa-catalasa. El aceite mineral se depositó sobre la superficie para sellar la mezcla y a continuación se inició la reacción agregando el sustrato, la solución de
30 protoporfirina IX a una concentración final de 50 µM. La reacción siguió adelante a

temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la fluorescencia de protoporfirina IX usando un lector de microplacas (Sense, Hidex) (excitación: 405 nm; emisión: 633 nm). Para calcular la actividad enzimática de PPO, la solución de protoporfirinógeno IX se mantuvo abierta al aire para oxidarla (durante la noche). A esta se agregó 2,7N HCl y se midió la absorbancia en 408 nm. Se generó una curva estándar usando protoporfirina IX estándar y se midió la actividad de PPO mediante la calibración de protoporfirina IX usando la curva estándar de protoporfirina IX.

La actividad enzimática de la PPO de tipo salvaje y de las variantes obtenidas se presenta en la Tabla 12.

Por otro lado, se calcularon los valores de la constante Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) de cada enzima para evaluar los parámetros cinéticos de las proteínas PPO (CyPPO10 y CyPPO13). La velocidad de reacción inicial se midió donde la velocidad de reacción era proporcional a la concentración de sustrato y la cantidad de protoporfirina IX producida que es un producto de reacción enzimática se midió frente al tiempo transcurrido a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se calcularon los valores K_m y V_{max} con el programa de análisis de cinética enzimática por ecuación de Michaelis-Menten y la PPO de planta se usó como un grupo de control. El resultado obtenido se presenta en la Tabla 12:

【Tabla 12】

Clasificación	CyPPO10	CyPPO13	AtPPO1	<i>Amaranthus</i> PPO1
V_{max} ($\mu\text{M mg de proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	949,1 $\pm$ 64	341,4 $\pm$ 14	134,4 $\pm$ 19	57 $\pm$ 7

Como se muestra en la Tabla 12, CyPPO10 y CyPPO13 tienen mayor capacidad como enzima PPO que PPO1 de *A. thaliana* (AtPPO1) y PPO1 de *Amaranthus*.

Se midió la concentración de los herbicidas inhibidores de PPO que inhibe la actividad enzimática de PPO en un 50% (IC_{50}) para cada herbicida. La concentración final de cada herbicida fue la siguiente:

0, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000 nM

Se determinó IC_{50} por cálculos a partir de la inhibición de la actividad enzimática medida a cada una de las concentraciones de pesticidas anteriores.

Los valores IC₅₀ de los distintos herbicidas se presentan en la siguiente Tabla

13.

【Tabla 13】

CyPP O10 No.	Mutaci ón	Acti vida d (%)	IC ₅₀ (nM)					
			Tiafenacil o	Saflufenac ilo	Fomesafe no	Butafenac ilo	Flumioxaz ina	Sulfentraz ona
1	WT	100	21	9	15	8	NT	NT
2	F360M	93	115	1.500	114	24	NT	NT
3	F360I	67	799	3.916	191	268	3.323	NT
4	F360L	59	172	NT	NT	NT	NT	NT
5	F360V	56	307	NT	NT	NT	NT	NT
6	N59T + F360V	62	543	NT	NT	NT	NT	NT
7	R89A + F360M	67	931	5.000	5.000	674	1.216	5.000
8	R89A + F360I	38	2.153	5.000	5.000	1.323	5.000	5.000
9	R89A + F360L	30	1.000	NT	NT	NT	1.025	NT
10	V165S + F360M	78	435	NT	NT	NT	119	NT
11	V165S + F360I	63	818	NT	NT	NT	NT	NT
12	V165S + F360L	59	470	NT	NT	NT	NT	NT
13	V165S + F360V	52	929	NT	NT	NT	NT	NT
14	A167L + F360M	80	5.000	5.000	3.000	4.000	5.000	5.000
15	A167L + F360I	32	5.000	NT	NT	NT	NT	NT
16	A167C + F360M	90	4.500	5.000	1.900	2.500	4.000	5.000
17	A167C + F360I	48	4.500	NT	NT	NT	NT	NT
18	V305M + F360M	87	356	5.000	675	121	544	2.057
19	V305T + F360I	10	276	NT	NT	NT	NT	NT
20	R89A + V305T + F360M	5	741	NT	NT	NT	NT	NT

21	S60T + V165S + F360M	17	2.720	NT	NT	NT	NT	NT
22	S60T + V165S + F360I	12	3.580	NT	NT	NT	NT	NT
23	S60T + I340T + F360I	5	2.000	NT	NT	NT	NT	NT
24	R89V + F360I	57	242	NT	NT	NT	NT	NT
25	R89L + F360I	51	184	NT	NT	NT	NT	NT
26	A167I + F360M	85	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000
27	V165C + F360M	93	2.169	NT	NT	NT	NT	NT
28	V305L + F360M	82	262	NT	NT	NT	NT	NT
29	V165C + A167C + F360M	91	5.000	5.000	3.034	2.810	5.000	5.000
30	V165C + A167I + F360M	75	5.000	5.000	3.741	5.000	5.000	5.000
31	V165C + A167L + F360M	83	5.000	5.000	4.277	4.820	5.000	5.000
32	R89A + A167L + F360M	7	5.000	NT	NT	NT	NT	NT
33	I408R + F360M	5	5.000	NT	NT	NT	NT	NT
34	I408W + F360M	5	5.000	NT	NT	NT	NT	NT
35	R89A	83	104	NT	NT	NT	NT	NT
36	F161A	92	203	NT	NT	NT	NT	NT
37	V165C	99	97	NT	NT	NT	NT	NT
38	A167C	98	86	NT	NT	NT	NT	NT
39	A167L	95	792	NT	NT	NT	NT	NT

40	Q184G	97	79	NT	NT	NT	NT	NT
41	V305M	100	186	NT	NT	NT	NT	NT
42	F324V	59	140	NT	NT	NT	NT	NT
43	L327T	84	214	NT	NT	NT	NT	NT
44	I340T	19	216	NT	NT	NT	NT	NT
45	F360T	85	5.000	NT	NT	NT	NT	NT
CyPP O13								
1	WT	100	28	36	30	37	NT	NT
2	F373M	98	56	481	77	18	NT	NT
3	F373I	83	135	1.480	NT	NT	NT	NT
4	F373L	82	141	1.470	NT	NT	NT	NT
5	F373C	86	212	NT	NT	NT	NT	NT
6	F373V	83	339	NT	NT	NT	NT	NT
7	F373T	81	818	NT	NT	NT	NT	NT
8	F373H	26	114	NT	NT	NT	NT	NT
9	F373N	40	40	NT	NT	NT	NT	NT
10	R101A + F373M	55	615	5.000	NT	NT	573	NT
11	A177C + F373M	77	336	4.500	NT	NT	NT	NT
12	A177I + F373M	75	261	4.700	NT	NT	NT	NT
13	A177L + F373M	75	1.122	5.000	690	2.500	5.000	5.000
14	A177L + F373I	66	1.630	5.000	315	5.000	5.000	5.000
15	A177L + F373L	68	5.000	5.000	464	5.000	5.000	5.000
16	V175L + F373M	93	203	1.375	NT	NT	NT	NT
17	V318M + F373M	72	386	1.924	NT	NT	NT	NT
18	A177L + F373T	62	4.700	5.000	3.000	4.000	5.000	5.000
19	A177L + F373V	49	5.000	5.000	1.229	5.000	5.000	5.000
20	A177C + F373T	80	3.900	NT	NT	NT	NT	NT

21	A177C + F373V	56	3.200	NT	NT	NT	NT	NT
22	G194E + F373M	32	64	261	NT	NT	66	NT
23	G194Q + F373M	37	24	265	NT	NT	5,2	NT
24	G194M + F373M	43	20	475	NT	NT	53	NT
25	G194K + F373M	41	95	224	NT	NT	128	NT
26	G194R + F373M	35	67	218	NT	NT	81	NT
27	R101A	87	139	NT	NT	NT	NT	NT
28	F171A	70	70	NT	NT	NT	NT	NT
29	V175C	94	57	NT	NT	NT	NT	NT
30	A177C	98	113	NT	NT	NT	NT	NT
31	A177L	97	211	NT	NT	NT	NT	NT
32	V318M	81	211	NT	NT	NT	NT	NT
33	F337V	88	158	NT	NT	NT	NT	NT
34	L340T	83	443	NT	NT	NT	NT	NT
35	I353T	62	280	NT	NT	NT	NT	NT

NT (no evaluado)

Como se muestra en la Tabla 13, las variantes de proteína PPO presentan valores de IC₅₀ mayores, en comparación con la proteína CyPPO de tipo salvaje. Estos resultados demuestran que las mutaciones de aminoácido en determinadas posiciones de la proteína PPO pueden llevar a un aumento en la tolerancia a los herbicidas. Aunque los datos de la presente muestran que las variantes de proteínas CyPPO tienen una menor actividad enzimática en comparación con el tipo salvaje, puede ser el resultado de las distintas condiciones de plegamiento de la proteína y/o la hidrofobicidad de las PPO recombinantes en comparación con las PPO naturales. Si bien las PPO naturales son hidrofóbicas y se ubican en las membranas de los cloroplastos en las plantas, las PPO recombinantes que se producen en *E. coli* son hidrofílicas y contienen una MBP como compañera de fusión. Por lo tanto, cuando las variantes de PPO se ensamblen de forma adecuada en la membrana de cloroplastos de las plantas, la actividad enzimática

no se verá afectada drásticamente.

Ejemplo 7. Generación de transformantes de *A. thaliana* usando CyPPO y sus variantes y una prueba de tolerancia al herbicida inhibidor de PPO

5 **7-1. Construcción de vectores transformantes de *A. thaliana* y transformación de *A. thaliana***

Se transformó *A. thaliana* con un vector binario con un marco abierto de lectura (ORF) de un marcador seleccionable, gen bar (tolerante a glufosinato), y un ORF de cada gen para codificación de variantes CyPPO10 y CyPPO13. La planta transgénica
10 fue analizada para determinar la tolerancia cruzada a glufosinato y los herbicidas inhibidores de PPO. El gen bar también se usó para analizar si el transgén se heredó de forma estable a través de las generaciones. Se usaron el promotor NOS y el terminador E9 para la expresión del gen bar.

Con el fin de expresar CyPPO10, variantes de CyPPO10, CyPPO13 y variantes
15 de CyPPO13 respectivamente en una planta se usó un promotor CaMV35S y un terminador NOS. Los genes de codificación de CyPPO10, variantes de CyPPO10, CyPPO13 y variantes de CyPPO13 se clonaron usando enzimas de restricción XhoI y BamHI. Con el fin de identificar la proteína expresada, se fusionó la etiqueta hemaglutinina (HA) a la región del extremo 3' usando enzimas de restricción BamHI y
20 SacI. El terminador NOS se insertó tras la etiqueta HA, terminando así la transcripción del gen de PPO. Además, con el fin de translocar la proteína al cloroplasto se insertó un péptido de tránsito (TP) del gen AtPPO1 (SEQ ID NO: 10) frente al 5' del gen insertado usando enzimas de restricción XbaI y XhoI. La región del péptido de tránsito que se insertó en el vector se representó mediante la SEQ ID NO: 27 y la secuencia de etiqueta
25 HA que se insertó se representó mediante la SEQ ID NO: 28. Un diagrama esquemático del vector binario de transformación de la planta se presenta en la Figura 6.

Cada uno de estos vectores ensamblados fue introducido en una célula competente de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediante un método de congelación-descongelación. Para preparar la célula competente de *Agrobacterium*
30 GV3101 se cultivó una cepa de *Agrobacterium* GV3101 en 5 ml de medio LB en

condiciones de 30 °C y 200 rpm durante 12 horas. El medio de cultivo se inoculó en 200 mL de medio LB y a continuación se cultivó a 200 rpm durante 3~4 horas a 30 °C y se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con agua destilada estéril y se volvió a suspender en 20 ml de medio LB. Alícuotas de 200 µl
5 congeladas instantáneamente con nitrógeno líquido se almacenaron en un congelador profundo.

Cada *Agrobacterium* transformada se cultivó en un medio antibiótico (agar LB con espectinomicina) y se analizó. La colonia analizada se cultivó en líquido en un caldo de LB. Tras recolectar *Agrobacterium* del medio de cultivo, fue suspendido de
10 nuevo en una solución de 5% (p/v) de sucrosa, 0,05% (p/v) de Silwet L-77 (empresa Momentive Performance Materials) en una absorbancia (OD₆₀₀) de 0,8. *A. thaliana* de tipo salvaje ecotipo Col-0, se transformó mediante el método de sumergimiento floral y a continuación se recolectó la semilla (T₁) 1~2 meses después.

Se usó el gen Bar en el vector binario para cribar los transformantes
15 individuales. Las semillas T₁ obtenidas se sembraron en medio 1/2 MS (2,25 g/l sal de MS, 10 g/l de sucrosa, 7 g/l de agar) complementadas con 25 µM de glufosinato y las plantas sobrevivientes 7 días después del sembrado se seleccionaron y se trasplantaron a la tierra.

Para analizar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de las plantas
20 transgénicas, se pulverizaron plantas de 4 semanas de forma uniforme con 100 ml de 1 µM de solución de tiafenacilo (0,05% Silwet L-77) cada 40 x 60 cm de superficie (0,24 m²). Si bien *A. thaliana* de tipo salvaje (ecotipo Col-0; ecotipo Columbia-0) murió completamente en un período de 7 días tras el tratamiento, ningún transformante presentó daños por causa del tratamiento con herbicida inhibidor de PPO.

25 Las semillas T₂ recolectadas de plantas sobrevivientes se sembraron en medio 1/2 MS (2,25 g/l de sal de MS, 10 g/l de sucrosa, 7 g/l de agar) complementado con 25 µM de glufosinato y tras 1 semana, las plantas que sobrevivieron se trasplantaron a la tierra.

Para confirmar el número de copias de gen en cada línea, se investigaron las
30 relaciones de segregación con semillas T₂.

La tolerancia a tiafenacilo de transformantes de 4 semanas de edad se confirmó pulverizando 100 ml de solución de tiafenacilo (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M o 25 μ M de tiafenacilo + 0,05% Silwet L-77) cada 40 x 60 cm de superficie (0,24 m²). Las semillas T₃ se recolectaron de plantas T₂ tolerantes a tiafenacilo.

- 5 Las semillas se seleccionaron en un medio 1/2 MS con 25 μ M de glufosinato y las líneas en las que los individuos eran tolerantes a glufosinato se consideraron homolíneas.

7-2. Germinación de las semillas

- 10 Se confirmó la tolerancia a los herbicidas de transformantes de *A. thaliana* introducidos con genes de tipo salvaje o variantes de CyPPO10 y CyPPO13.

Las semillas T₃ de generación de cada transformante se cultivaron en medio 1/2 MS con herbicidas. Las semillas de ecotipo Col-0 (*Arabidopsis* de tipo salvaje) se usaron como control. Los tipos de herbicidas y concentración son los siguientes:

- 15 La figura 31a: 25 μ M de glufosinato (PPT), 70 nM de tiafenacilo, 100 nM de saflufenacilo, 25 μ M de glufosinato + 70 nM de tiafenacilo o 25 μ M de glufosinato + 30 nM de tiafenacilo + 40 nM de saflufenacilo;

- Las figuras 31b y 31c: 25 μ M de glufosinato (PPT), 0,1 μ M o 1 μ M de tiafenacilo, 0,3 μ M o 3 μ M de saflufenacilo, 0,1 μ M o 1 μ M de flumioxazina, 0,5 μ M o
20 5 μ M de piraclonilo o 1 μ M o 10 μ M de sulfentrazona.

- Los resultados de la germinación de semillas 7 días después de la siembra se presentan en las Figuras 31a, 31b y 31c. En las Figuras 31a a 31c, 10-3 se refiere a CyPPO10 de tipo salvaje, 10FM-4-7 a la línea transgénica de CyPPO10 F360M, 10FL-1-9 a la línea transgénica de CyPPO10 F360L, 10FC-3-5 a la línea transgénica de
25 CyPPO10 F360C, 10AC-5-4 a la línea transgénica de CyPPO10 A167C, 13-1 a CyPPO13 de tipo salvaje, 13FM-3-1 a la línea transgénica de CyPPO13 F373M, 13FC-1-1 a la línea transgénica de CyPPO13 F373C, 13FI-2-1 a la línea transgénica de CyPPO13 F373I, 13AC-1-3 a la línea transgénica de CyPPO13 A177C, CyPPO13_ALFL a la línea transgénica de CyPPO13 A177L+F373L y CyPPO13_ALFI
30 a la línea transgénica de CyPPO13 A177L+F373I, respectivamente.

Tal como se muestra en las Figuras 31a a 31c, mientras que *A. thaliana* de tipo salvaje (ecotipo Col-0) germinó en el medio 1/2 MS sin herbicidas, no germinó en el medio 1/2 MS con herbicidas. Por lo tanto, la prueba de germinación en el medio con herbicidas es útil para evaluar la tolerancia a los herbicidas.

5 Por otro lado, las líneas T₃ de *A. thaliana* transformadas en las que los genes de CyPPO10 de tipo salvaje, CyPPO10 mutante (F360M, F360I, F360L, F360C, A167C), genes de CyPPO13 de tipo salvaje o CyPPO13 mutante (F373M, F373C, F373I, A177C, A177L+F373L, A177L+F373I) germinaron en el medio con herbicidas (con 25 μM de glufosinato, 25 μM de glufosinato + 70 nM de tiafenacilo o 25 μM de
10 glufosinato + 30 nM de tiafenacilo + 40 nM de saflufenacilo). Estos resultados indican que el gen bar (gen tolerante a glufosinato) y los genes de CyPPO (gen tolerante a los herbicidas inhibidores de PPO) funcionaron como rasgos de tolerancia a los herbicidas de manera simultánea e independiente en las plantas transgénicas.

Como se muestra en 31a a 31c, en el medio con varios tipos y varias
15 concentraciones de herbicidas inhibidores de PPO, *A. thaliana* transformada germinó y sobrevivió normalmente, mientras que Col-0 no germinó normalmente. Este resultado mostró que a *A. thaliana* transformada se le confirió tolerancia o adquirió una mejor tolerancia a varios herbicidas inhibidores de PPO por los genes insertados de los transformantes.

20

7-3. Análisis de la expresión de la proteína CyPPO en genes de CyPPO introducidos en *A. thaliana* (T₂)

Se investigó la expresión de cada proteína en transformantes de *A. thaliana* (T₂) en los que se habían insertado genes codificantes de CyPPO10, variantes de CyPPO10
25 (F360I o F360M), CyPPO13, o variantes de CyPPO13 (F373M), respectivamente.

Se molieron hojas del transformante de *A. thaliana* de cuatro semanas de edad con nitrógeno líquido y la proteína se extrajo agregando tampón de extracción de proteínas (0,05 M de Tris-Cl pH 7,5, 0,1 M de NaCl, 0,01 M de EDTA, 1% de Triton X-100, 1 mM de DTT). A continuación se llevó a cabo transferencia western usando
30 anticuerpo anti-HA (Santa cruz). Se detectaron las proteínas que se expresaron en el

transformante usando una etiqueta HA. Para comparar la cantidad de proteínas cargadas, la cantidad de subunidad grande(L) RuBisCO se confirmó por tinción con azul Coomassie. Se evaluaron dos líneas independientes por cada variante y se usó Col-0 como control.

5 El resultado se presenta en la figura 7. Todos los transformantes de *A. thaliana* con inserción del gen variante de CyPPO10 (variante de F360I o variante de F360M) o variante de CyPPO13 (variante de F373M) presentaron una expresión exitosa de las proteínas PPO.

10 **7-4. Verificación de la tolerancia a los herbicidas de *A. thaliana* transformada (T₂ o T₃)**

La tolerancia a los herbicidas se evaluó con transformantes de *A. thaliana* (T₂ o T₃) en los que se introdujeron genes que codifican CyPPO10, variantes de CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M, 15 A167C+F360M, A167C+F360I, o V305M+F360M), CyPPO13, o variantes de CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373I, o A177L+F373L) respectivamente.

Tras someter a tratamiento con una solución de tiafenacilo (1 µM de tiafenacilo + 0,05% (v/v) Silwet L-77) a transformantes de CyPPO10 o CyPPO13 (T₃) con un 20 volumen de 100 ml por superficie de 40 X 60 cm (0,24 m²), el nivel de daño de la planta se evaluó en el séptimo día. Con fines comparativos, se realizó el mismo ensayo usando *A. thaliana* de tipo salvaje (ecotipo Col-0).

El resultado se presenta en la figura 8.

Adicionalmente, tras el tratamiento con 100 ml de solución de tiafenacilo (1 25 µM, 5 µM, 10 µM, o 25 µM de tiafenacilo + 0,05% (v/v) Silwet L-77) por superficie de 40 X 60 cm (0,24 m²) a transformantes (T₂) con genes que codifican variante de CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M, o A167C+F360I) o variante de CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373I, o A177L+F373L), se evaluó el nivel de daño de las plantas en 30 el séptimo día.

El resultado se presenta en la figura 9 (transformantes T₂ con gen de variante de CyPPO10 introducido) y Figura 10 (transformantes T₂ con gen de variante de CyPPO13 introducido).

Adicionalmente, el nivel de daño (índice de daño) de cada línea después del tratamiento con tiafenacilo presentado en las Figuras 8 a 10 se presenta en la siguiente Tabla 14 como un índice numérico.

【Tabla 14】

Índice de daño de T₂ (nivel de daño)

	Línea No.	Tiafenacilo	Índice de daño promedio
Col-0		1 µM	5
CyPPO10			
De tipo salvaje		1 µM	0,5
F360C	3	1 µM	0,3
		5 µM	0,9
F360I	7	1 µM	0
		5 µM	0,1
F360L	3	1 µM	0
		5 µM	0,3
F360M	4	1 µM	0,1
		5 µM	0,3
F360V	4	1 µM	0
		5 µM	0,3
F360T	3	1 µM	2,6
A167C	3	1 µM	0
A167L	3	1 µM	0,2
A167L+F360M	12	25 µM	2
A167C+F360I	19	25 µM	2
CyPPO13			
De tipo salvaje		1 µM	0,5
A177C	1	1 µM	0
F373C	2	1 µM	0,1
F373I	2	1 µM	0,1
F373M	2	1 µM	0
A177L+F373I	9	10 µM	1,5
A177L+F373L	7	10 µM	0

Tras tratamiento con una solución de tiafenacilo (25 μ M de tiafenacilo + 0,05% (v/v) Silwet L-77) o solución de saflufenacilo (100 μ M de saflufenacilo + 0,05% (v/v) Silwet L-77) con un volumen de 100 ml por superficie de 40 X 60 cm (0,24 m²) a transformantes (T₃) con genes introducidos de codificación de variantes de CyPPO10 (F360I, F360L, F360M, A167C+F360I, A167C+F360M o V305M+F360M), se evaluó el nivel de daño de la planta en el séptimo día.

El resultado de los transformantes T₃ con genes introducidos de codificación de variantes de CyPPO10 se presenta en la Figura 32.

Además, el nivel de daño (índice de daño) por tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo de los transformantes de *A. thaliana* con genes introducidos de codificación de CyPPO10 mutante, se presenta en la siguiente Tabla 15 como un índice numérico.

【Tabla 15】

Índice de daño de T₃ (nivel de daño)

		Línea No.	Tiafenacilo	Índice de daño promedio	Saflufenacilo	Índice de daño promedio
Col-0			25 μ M	5	100 μ M	5
CyPPO10	F360I	7-2	25 μ M	1	100 μ M	1,1
		10-2			100 μ M	0
	F360M	4-7	25 μ M	2		
	F360L	3-2	25 μ M	1		
	A167C+F360I	1-4	25 μ M	2		
	A167C+F360M	4-5	25 μ M	2		
	V305M+F360M	6-5	25 μ M	2		

15

Las Tablas 14 y 15 presentan los niveles de daño promedio de los individuos evaluados (10 a 20 individuos) de acuerdo con el criterio de la siguiente Tabla 16.

【Tabla 16】

Definición del nivel de daño

Índice de daño	Síntoma
0	Sin daño
1	Extremo de hoja seco o menos de 20% con necrosis
2	Más del 20% y menos del 30% de la planta con necrosis

2,5	Más del 30% y menos del 50% de la planta con necrosis
3	Más del 50% y menos del 70% de la planta con necrosis
4	Más del 70% de la planta con necrosis
5	Toda la planta se secó y murió.

El nivel de tolerancia de los transformantes de *A. thaliana* (T₃) a los que se introdujeron genes de CyPPO10 mutantes (F360I o A167L+F360M) o genes de CyPPO13 mutantes (A177L+F373L o A177L+F373I) se confirmó el séptimo día después del tratamiento con tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina o sulfentrazona (50 μ M cada uno). Con fines comparativos, los transformantes de *A. thaliana* de tipo salvaje o *A. thaliana* PPO1 SLYM (AtPPO1 SLYM, S305L+Y426M) (T₃) conocidos por presentar tolerancia a los herbicidas PPO se evaluaron en las mismas condiciones.

En el experimento de tolerancia con varios herbicidas, 100 ml de una concentración de 50 μ M de cada herbicida se pulverizaron uniformemente por una superficie de 40 x 60 cm (0,24 m²). El peso molecular (MW) de tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina y sulfentrazona es 511,87, 500,85, 354,34 y 387,18, respectivamente. Las dosificaciones de tratamiento convertidas corresponden con 106,7 i.a./ha de tiafenacilo, 104,4 g i.a./ha de saflufenacilo, 73,8 g i.a./ha de flumioxazina y 80,7 g i.a./ha de sulfentrazona.

El resultado se presenta en las Figuras 33a y 33b.

Además, el nivel de daño (índice de daño) de los transformantes se presenta en la Figura 33 y Tabla 17 como un índice numérico.

【Tabla 17】

Índice de daño de T3 (nivel de daño)			
	Cy10 FI	AtPPO1 SLYM	Cy10 ALFM
Tiafenacilo	1	4	1
Saflufenacilo	0	0-1	0-1
Flumioxazina	0-1	4-5	1
Sulfentrazona	0-1	0-1	1

En la Figura 33a y Tabla 17, Cy10 FI, AtPPO1 SLYM, Cy10 ALFM representan los transformantes de CyPPO10 F360I, S305L+Y426M de AtPPO1 (control) y CyPPO10 A167L+F360M, respectivamente.

En la Figura 33b, Col-0, Cy13 ALFL y Cy13 ALFI representan los

transformantes de tipo salvaje de CyPPO13 A177L+F373L y CyPPO13 A177L+F373I, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 33A, los transformantes de genes mutantes tienen una tolerancia igual o mayor que AtPPO1 SLYM. Se demostró que todos los CyPPO10 FI y CyPPO10 ALFM confirieron un mayor nivel de tolerancia a varios herbicidas en comparación con AtPPO1 SLYM.

Como se muestra en la Tabla 14 y la Figura 8, casi todos los transformantes con CyPPO10 de tipo salvaje, sus genes variantes, CyPPO13 de tipo salvaje o sus genes variantes crecieron después del tratamiento con 1 μ M de tiafenacilo mientras que *A. thaliana* de tipo salvaje (Col-0) murió.

Además, como se muestra en las Tablas 15 y 17, Figuras 9 a 19 y Figuras 32 a 33, los transformantes de *A. thaliana* a los que se les introdujeron genes variantes de CyPPO10 y CyPPO13 presentaron un nivel bajo o inexistente de daño después de un tratamiento con más de 5 μ M de tiafenacilo. El resultado mostró que a *A. thaliana* se le confirió y/o mejoró la tolerancia a los herbicidas mediante la introducción de CyPPO10, CyPPO13 o sus genes mutantes.

Se demostró que la tolerancia a los herbicidas se mantuvo en las generaciones T₂ a T₃, lo que indica que la tolerancia a los herbicidas se transfirió establemente incluso con progresión de generación .

A partir de este resultado, se espera que las variantes de CyPPO otorguen varias tolerancias a los herbicidas de inhibición de PPO a otras plantas además de a *A. thaliana*.

7-5. Confirmación de la estabilidad de los transgénicos durante el paso por generaciones

En este Ejemplo, se confirmó si los genes introducidos en *A. thaliana* se heredaban establemente durante las generaciones.

Las líneas de transformantes 7-2, 10-2, y 10-5 T₃, transformadas con CyPPO10 F360I, fueron desarrolladas adicionalmente hasta la generación T₄, T₅ y de ese modo se confirmó la tolerancia a tiafenacilo o saflufenacilo y la expresión de los genes

introducidos en las generaciones T₄ y T₅ de cada línea.

Extracción de proteínas

Se extrajeron las proteínas de plantas de cada generación. Tras moler las plántulas con nitrógeno líquido, se agregó tampón de extracción de proteínas (0,05 M Tris-Cl pH 7,5, 0.1 M NaCl, 0,01 M EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT) y se extrajo la proteína total. Una vez que la proteína extraída, a continuación de ser sometida a electroforesis, se transfirió a una membrana de PVDF , se realizó transferencia western con anticuerpo anti-HA (Santacruz).

Confirmación de tolerancia a los herbicidas

Cien mililitros de solución herbicida con 15 µM de tiafenacilo o 150 µM de saflufenacilo se pulverizaron uniformemente en la superficie de 40 x 60 cm (0,24 m²) a *A. thaliana* 4 semanas después del trasplante. El nivel de daño del herbicida se observó el séptimo día después del tratamiento.

El resultado de la tolerancia a los herbicidas se presenta en la Figura 34 (T₄) y en la Figura 35 (T₅), y el nivel de daño (índice de daño) por herbicidas de los transformantes se presenta en la Tabla 18.

【Tabla 18】

Índice de daño de T ₄ y T ₅ (nivel de daño)		
	CyPPO10 F360I	
	T ₄	T ₅
Tiafenacilo	0,5	0,5
Saflufenacilo	0	1

Mientras que el control negativo (Col-0; *A. thaliana* de tipo salvaje) fue susceptible al tratamiento con herbicidas, los transformantes T₄ y T₅ de *A. thaliana* de CyPPO10 F360I fueron tolerantes.

Además, el análisis de transferencia western para la expresión de transgenes se presenta en la Figura 36. La proteína CyPPO10 F360I se detectó en todas las generaciones T₄ y T₅ de los transformantes.

Por lo tanto, se demostró que la tolerancia a los herbicidas por introducción de variantes de CyPPO10 se heredó de manera estable y se mantuvo durante las generaciones T₄ y T₅.

Ejemplo 8. Construcción de transformantes de soja usando CyPPO y sus variantes y una prueba de tolerancia al herbicida inhibidor de PPO

8-1. Vector recombinante para la transformación de soja y la construcción de transformantes de soja usándolo

Se construyó un vector para la transformación de la planta de soja para conferir tolerancia al tiafenacilo mediante la expresión del gen de CyPPO10 A167L+F360M.

Específicamente, el gen de CyPPO10 A167L+F360M combinado con el péptido de tránsito del gen de PPO1 de *A. thaliana* fue amplificado por PCR usando el vector usado para la transformación de *A. thaliana* (remitirse a la Figura 6) como plantilla. El producto amplificado se clonó usando kits de clonación pENTR Directional TOPO (Invitrogen) y se usó para transformar una célula competente alfa DH5 (Invitrogen). Así, el gen clonado se movió a un vector, vector binario pB2GW7.0 (Figura 37) para la transformación de plantas, usando el kit Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). Tras mezclar el vector pENTR/D-TOPO en el que se clonó el gen de CyPPO10 A167L+F360M, tampón TE, y mix de enzima LR Clonase II, se incubó a 25 °C durante 1 hr. Tras agregar solución de proteinasa K (Invitrogen) a la mezcla de reacción, se incubó durante 10 minutos a 37 °C y se transformó la célula competente alfa DH5.

Se electrotransformó EHA105 de *Agrobacterium* con el vector binario construido como antecede.

Se usaron plantas de soja Kwangan para la construcción de transformantes de soja.

Tras retirar el recubrimiento de semilla de la semilla de soja, se cortó el hipocótilo y se lesionó 7-8 veces por bisturí quirúrgico (cuchilla número 11). Aproximadamente 50 piezas de explantes se mezclaron con EHA105 de *A. tumefaciens* transformadas (Hood et ál., New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). Trans Res. 1993 2:208-218) y la mezcla se sonicó durante 20 segundos y a continuación se incubó durante 30 minutos para inoculación. Se colocó en CCM (medio de cocultivo; 0,32 g/l de Gamborg B5, 4,26 g/l de MES, 30 g/l de sucrosa,

0,7% de agar). A continuación, se cocultivó en una cámara de crecimiento (25 °C, 18 h de luz / 6 h de oscuridad) durante 5 días).

Tras este período, se lavó durante 10 minutos en medio de inducción líquido 1/2 SIM (medio de inducción de brote; 3,2 g/l de Gamborg B5, 1,67 mg/l de BA, 3 mM de MES, 0,8% (p/v) de agar, 3% (p/v) de sucrosa, 250 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de vancomicina, 100 mg/l de ticarcilina, pH 5,6) y se colocó en SIM sin antibióticos y se cultivó en la cámara de crecimiento (25 °C, 18 h de luz/ 6 h de oscuridad) durante 2 semanas.

Los explantes con brotes inducidos se trasplantaron a medio SIM-1 (medio SIM suplementado con 10 mg/l de DL-fosfinotricina, pH 5,6).

Los brotes con amarronamiento se trasplantaron a SEM (medio de alargamiento de brotes; 4,4 g/l de sal MS, 3 mM de MES, 0,5 mg/l de GA3, 50 mg/l de asparagina, 100 mg/l de ácido piroglutámico, 0,1 mg/l de IAA, 1 mg/l de zeatina, 3% (p/v) de sucrosa, 0,8% (p/v) de agar, 250 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de vancomicina, 100 mg/l de ticarcilina, 5 mg/l de DL-fosfinotricina, pH 5,6). Los brotes alargados con altura mayor que 4 cm se transfirieron a RIM (medio de inducción de raíz; 4,4 g/l de sal MS, 3 mM de MES, 3% de sucrosa, 0,8% de agar, 50 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de vancomicina, 50 mg/l de ticarcilina, 25 mg/l de asparagina, 25 mg/l de ácido piroglutámico, pH 5,6).

Cuando las raíces crecieron lo suficiente, las plantas se transplantaron a lecho de suelo (Bioplug No. 2, Farmhannong) mezclado con vermiculita en relación 2:1 (v/v). Tras 10 días, las hojas se pintaron con 100 mg/l de DL-fosfinotricina.

8-2. Verificación de la tolerancia a los herbicidas de soja transformada

Cinco micromolares o 15 µM de tiafenacilo fueron pintados en las hojas de las líneas n.º 2 de soja transformada con CyPPO10 A167L+F360M (generación T₀) y soja no transformada (Kwangan; soja de tipo salvaje, control) 2~3 veces con un cepillo. La solución de tiafenacilo contiene 0,05% (v/v) de Silwet L-77 como tensioactivo.

Como se muestra en la Figura 38, Kwangan (soja no transformada) presentó daño grave 7 días después del tratamiento con 5 µM de tiafenacilo pero la soja

transformada con CyPPO10 A167L+F360M no mostró daño incluso después del tratamiento con 15 μ M de tiafenacilo.

Por otro lado, la generación T₁ de la línea transformante de CyPPO10 A167L+F360M n.º 2 en la etapa de V2~3 se trató con tiafenacilo o saflufenacilo. 100 ml de 25 μ M de tiafenacilo o 150 μ M de saflufenacilo se pulverizaron de manera uniforme en la superficie de 40 X 60 cm (0,24 m²) y el nivel de daño se evaluó 5 días después de la pulverización.

En la Figura 40, soja Kwangan se usó como control. En comparación con el control, el transformante de soja CyPPO10 A167L+F360M (10ALFM) no mostró daño incluso después del tratamiento con una concentración relativamente alta de tiafenacilo o saflufenacilo.

8-3. Confirmación de la cantidad de genes inseridos en la soja transformada

Se extrajo ADN genómico en 250 mg de tejidos de hojas de líneas transformadas de CyPPO10 A167L+F360M n.º 2 o n.º 23 para analizar el número de copias del transgén.

El ADN genómico se extrajo usando un método de tampón CTAB. Tras moler los tejidos de hojas en nitrógeno líquido usando mortero, se agregó 1,25 ml de tampón de aislamiento de ADN (2% (p/v) de CTAB, 1,5 M de NaCl, 25 mM de EDTA, 0,2% (v/v) de beta-mercaptoetanol, 100 mM de Tris-Cl (pH 8,0)) y sometió a vórtex. Tras calentar a 60 °C durante 1 hora, se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamilo (24:1) y se mezcló por inversión. Tras centrifugación a 7000 g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol. Tras centrifugación a 5000 g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el sedimento se disolvió con tampón TE (LPSS). Tras agregar 20 μ g/ml de ARnasa A (Bioneer), se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Tras agregar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló y centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y a continuación se agregó 1 volumen de cloroformo: isoamil alcohol (24:1) y se mezcló. Tras centrifugación a 10.000 g durante

10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 0,1 volúmenes de NaOAc (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol y se mezcló. Tras centrifugación a 5.000 g durante 5 minutos a 4 °C, se lavó con 70% de etanol. Tras secado al aire, se disolvió el ADN genómico con una cantidad apropiada de tampón TE.

5 10~40 µg de ADN extraído se digirieron durante la noche usando EcoRI (Enzynomics).

A continuación, tras electroforesis con gel de agarosa 0,8 % (p/v) (50 V), el gel se trató de la siguiente manera:

- 1) depurinación: 0,25 N de HCl, agitación de 15 min
- 10 2) desnaturalización: 0,5 M de NaOH, 1,5 M de NaCl, 30 min de agitación
- 3) neutralización: 0,5 M de Tris(pH 7,5), 1,5 M de NaCl, 20 min de agitación

A continuación, los fragmentos de ADN se movieron a una membrana de nitrocelulosa usando un método de transferencia capilar, y se llevó a cabo reticulación usando un reticulador UV (UVC-508; ULTRA LUM Inc.).

15 Se realizó una hibridación mediante el siguiente método: La membrana de nitrocelulosa se sumergió en solución DIG Easyhybridization (Roche) y se incubó a 42 °C durante 3 horas. A continuación, la solución se descartó, se sustituyó con una solución DIG Easyhybridization fresca con una sonda marcada con DIG y se incubó durante 16-18 horas a 42 °C.

20 La sonda (sonda CyPPO8-M marcada con DIG) se marcó por reacción de PCR del siguiente modo:

Sonda de PCR

El gen bar marcado con DIG fue amplificado usando DIG dUTP (Jena bioscience) y los cebadores usados fueron los siguientes:

25 Cebador directo para sonda bar: 5'- TTC CGT ACC GAG CCG CAG GA-3' (SEQ ID NO: 124)

Cebador inverso para sonda bar: 5'- CGT TGG GCA GCC CGA TGA CA-3' (SEQ ID NO: 125)

PCR: usando kit Solgent e-Taq

30 Condiciones: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C

durante 30 seg y 72 °C durante 30 seg y 72 °C durante 2 min.

Tras la hibridación, se lavó la membrana en tampón de lavado de baja rigurosidad (2X SSC, 0.1% SDS) y tampón de lavado de alta rigurosidad (0,5X SSC, 0,1% SDS). Se detectó la señal de transferencia southern de la siguiente manera:

5 1) agitación durante 30 minutos tras agregar tampón de bloqueo (Roche) a la membrana

 2) agitación durante 30 minutos tras agregar anticuerpo DIG (fragmentos Fag anti-digoxigenina-AP, Roche)

 3) agitación durante 15 minutos en tampón de lavado (Roche)

10 4) agitación durante 3 minutos tras agregar tampón de detección (Roche)

 5) Después de aplicar CDP-Star (Roche) a la membrana, desarrollar la transferencia en una película de rayos x.

 Para un control negativo, se usó para la transferencia southern el ADN genómico de las plantas de soja Kwangan no transformadas.

15 En la Figura 39, la cantidad de bandas mostradas en la película representa la cantidad de transgenes. Debido a que en las líneas n.º 2 o n.º 23 de transformante CyPPO10 A167L+F360M fue observada una banda, se determinó que cada planta transgénica tenía una única copia de transgén.

20 **Ejemplo 9: Prueba de actividad de genes mutados con homología de secuencia con la variante PPO**

 Se llevó a cabo PCR propensa al error en las siguientes condiciones usando plásmido CyPPO (vector pACBB) como plantilla, induciendo así las mutaciones aleatorias en CyPPO:

25	Plantilla	0,5 µl
	Tampón 10X 5 µl	
	10 mM de MnCl ₂	1,5 µl
	dNTP	5 µl
	e-Taq(Solgent Inc.)	1 µl
30	Cebador directo (100 µM) 0,5 µl	

	Cebador inverso (100 μ M) 0,5 μ l
	DDW 36 μ l
	total 50 μ l
	tampón 10X: 100 mM de Tris-Cl, pH8,3; 500 mM de KCl, 70 mM de MgCl ₂ ,
5	0,1% (p/v) de gelatina
	dNTP: 10 mM de dATP, 10 mM de dGTP, 100 mM de dCTP, 100 mM de dTTP
	94 °C 3 min; (94 °C 30 seg, 57 °C 30 seg, 72 °C 1,5 min, 72 °C 5 min) 35
	ciclos
10	Secuencias de cebador:
	CyPPO10_BamHI F
	ccccggatccATGATTGAAGTGGATGTGGCTA (SEQ ID NO: 126)
	CyPPO10_XhoI R
	ccccctcgagTGATTGTCCACCAGCGAGGTAAG (SEQ ID NO: 127)
15	CyPPO13_BamHI F
	ccccggatccATGAACCCTGCTACCCCTGAAC (SEQ ID NO: 128)
	CyPPO13_XhoI R
	ccccctcgagCACCTGTGATAACAACCTGCTGAG (SEQ ID NO: 129)
20	El producto de PCR propenso al error obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y a continuación limpiado del gel y el vector pACBB y el producto de PCR fueron digeridos por enzimas de restricción BamHI y XhoI. El vector digerido y el producto de PCR sometido a electroforesis en gel de agarosa fueron limpiados y se llevó a cabo la ligación. El producto de ligación fue usado para transformar célula competente BT3, y se secuenciaron los genes de CyPPO mutados de colonias de BT3 en cultivo.
25	Fueron observadas colonias de BT3 con genes de CyPPO mutados en placas LB con varias concentraciones (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M) de tiafenacilo o saflufenacilo, investigando así el crecimiento de <i>E. coli</i> , y evaluando el nivel de tolerancia a los herbicidas.
30	Entre los clones mutados, se usó para este ensayo de tolerancia a los herbicidas un clon con las siguientes mutaciones:

CyPPO10m-6: con 9 mutaciones de aminoácidos (E225G, G258S, Q266L, T336I, V356F, F360M, A364D, R406G, W419R); secuencia de ácido nucleico – SEQ ID NO: 130, secuencia de aminoácidos – SEQ ID NO: 131 (98% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje CyPPO10)

5 Las células BT3 transformadas con los genes mutantes de CyPPO10 se cultivaron en medio con herbicida y se midió la inhibición del crecimiento celular. En la Figura 41, 'AtPPO1 WT' se refiere a PPO1 de tipo salvaje de *A. thaliana*, 'AtPPO1 SLYM' a PPO1 mutante (Y426M+S305L) de *A. thaliana*, 'CyPPO10 WT' a CyPPO10 de tipo salvaje y 'CyPPO10m-6' a CyPPO10 mutada, como se describe anteriormente,
10 respectivamente.

Como se muestra en la Figura 41, las células transformadas con mutantes CyPPO10 con homología de secuencia de 98% o más con CyPPO10 de tipo salvaje presentan una viabilidad celular similar a la de las células con CyPPO10 de tipo salvaje, incluso en el caso en que el medio contiene una alta concentración (hasta 200 μ M) de
15 tiafenacilo o saflufenacilo. Este resultado demuestra que los mutantes CyPPO10 con homología de secuencia de 98% o más pueden retener la tolerancia a los herbicidas (viabilidad en medio que contiene herbicida) de tipo salvaje.