

## 【DESCRIPCIÓN】

### 【Título de la invención】

Variantes de la protoporfirinógeno oxidasa y métodos y composiciones para conferir y/o mejorar la tolerancia a herbicidas utilizando las mismas

5

### 【Campo técnico】

Son proporcionadas 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 utilizando las mismas.

10

### 【Antecedentes en la técnica】

Una vía para la biosíntesis de porfirina sirve para la síntesis de clorofila y hemo que desempeñan un papel esencial en el metabolismo de las plantas y tiene lugar en el cloroplasto. En esta vía, la protoporfirinógeno IX oxidasa (denominada de aquí en adelante 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 conduce 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, fenilpirazoles, 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 proporcionarle 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 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  
10 tales como enzimas 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 competentes indeseados pueden contaminarlas, tales como, algas indeseadas, hongos, rotíferos o zooplancton.

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 competentes 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,  
30 Ward 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 sus mutantes presentan una amplia tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO (protoporfirinógeno oxidasa) y por lo tanto se propone que si se proporcionan dichos genes a las plantas y/o algas, entonces puede  
10 conferirse 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 aminoácidos 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: 1** (por  
15 ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión del polipéptido de la SEQ ID NO: 1 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
- 20 (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).

El aminoácido seleccionado o los aminoácidos 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: 1, puede ser seleccionado  
25 o pueden ser seleccionados del grupo formado por S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, y Y373, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

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

- 30 (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: 3 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión del polipéptido de la SEQ ID NO: 3 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).

El tipo o tipos 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: 3, puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, y R465, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

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

(1) una secuencia de aminoácidos donde uno o más tipos 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: 5 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión del polipéptido de la SEQ ID NO: 5 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).

El tipo o tipos 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: 5, puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, y F363, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

Otra modalidad proporciona un polinucleótido que codifica la variante de polipéptido o un polipéptido de la SEQ ID NO: 1, 3 o 5.

Otra modalidad proporciona un vector recombinante que comprende el polinucleótido.

5 Otra modalidad proporciona una célula recombinante (transformada) 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:

10 el polipéptido de la SEQ ID NO: 1, el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, el polipéptido de la SEQ ID NO: 5, una variante 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 la variante;

un polinucleótido que codifica el polipéptido o la variante;

15 un vector recombinante que comprende el polinucleótido; y

una célula (transformada) recombinante que comprende el vector recombinante.

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

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

Como modalidad específica, el herbicida puede ser uno o más tipos seleccionados del grupo formado por butafenacilo, saflufenacilo, 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, 25 pentoxazona, piraclonilo, flufenpiretilo, profluzol, fenopilato (2,4-diclorofenil 1-

pirrolidincarboxilato), carbamatos análogos de fenopilatos (por ejemplo, análogos de o-fenilpirrolidino- y de 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**.

En la presente, 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. En la presente alga se refiere a 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 un polipéptido de tolerancia a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo, y puede ser conferido y/o mejorado un rango mayor de tolerancia a herbicidas para el segundo herbicida. Las plantas y algas son manipuladas genéticamente con el fin de comprender un polipéptido de tolerancia a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo pueden prepararse usando una composición para conferir y/o mejorar la tolerancia al herbicida donde se incluye adicionalmente el polipéptido de tolerancia al segundo herbicida o un gen que codifica el mismo. 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 codifica el mismo.

Como modalidad específica, el segundo herbicida puede consistir en 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, de modo no taxativo.

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.

Como modalidad específica, ejemplos de péptidos tolerantes a un segundo herbicida pueden ser uno o más tipos seleccionados del grupo formado por EPSPS tolerante al herbicida glifosato (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa resistente 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 inhibidora 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 fenilurea; HPPD (hidroxilfenilpiruvato 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 al segundo herbicida puede ejemplificarse mediante uno o más tipos seleccionados del grupo formado por los genes cp4 epsps, 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, 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.

Otra modalidad proporciona un transformante de una planta y/o alga con tolerancia a los herbicidas, que es transformado con el polinucleótido o un clon o la progenie de dicho transformante.

Otra modalidad proporciona un método de preparación de una planta

transgénica o un alga transgénica con tolerancia a los herbicidas, que incluye una etapa de transformar una planta y/o alga con el polinucleótido.

Otra modalidad proporciona un método para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de una planta y/o alga, que incluye una etapa de transformar una  
5 planta y/o alga con el polinucleótido o un gen que codifica el mismo.

La transformación puede realizarse en un alga y/o en un/una célula de planta , protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote o planta entera.

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

10 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 las SEQ ID NO: 1, 3 o 5, o variante de los polipéptido, un polinucleótido que codifica los mismos, un  
15 vector 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  
20 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 a un segundo herbicida o  
25 un gen que codifica el mismo, y una dosificación eficaz del herbicida inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa y del segundo herbicida puede ser aplicada 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 algas a  
30 un medio de cultivo que comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo

formado por el polipéptido, la variante de polipéptido, 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 y un 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.

10 Tal como se usa 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 como mejorar la tolerancia de plantas o algas que sí tienen tolerancia a los herbicidas, o como el significado amplio que abarca a ambas  
15 posibilidades.

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 puede interpretarse que significan comprender  
20 una secuencia diferente de la secuencia descrita y/o comprender una mutación (adición, 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 núcleo y presente la función que se pretende.

En una modalidad, se proporciona una o más variantes de polipéptido  
25 seleccionadas del grupo formado por una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos donde uno o más tipos seleccionados del grupo formado por aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión de la SEQ ID NO: 1  
30 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 homología con este;

una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o  
5 consiste en una secuencia de aminoácidos donde uno o más tipos seleccionados del grupo formado por aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión de la SEQ ID NO: 3 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO), son respectivamente y de manera independiente  
10 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 homología con este;

una variante de polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o  
consiste en una secuencia de aminoácidos donde uno o más tipos seleccionados del  
15 grupo formado por aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 5 (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión de la SEQ ID NO: 5 que interactúan con el herbicida inhibidor de PPO), son respectivamente y de manera independiente  
20 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 homología con este; y

combinaciones de los mismos.

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido que codifica la variante de polipéptido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido, y una  
25 célula recombinante que comprende el vector recombinante. 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>",  
30 "<http://sg.idtdna.com/CodonOpt>" etc.).

En otra modalidad se proporciona una composición para conferir o mejorar la tolerancia a los herbicidas de plantas o algas, que comprende uno o más tipos seleccionados del grupo formado por la variante de polipéptido, un polinucleótido que codifica el polipéptido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido, una célula recombinante que comprende el vector recombinante y combinaciones de estos.

En otra modalidad, se proporciona un transformante con tolerancia a los herbicidas, transformado con el polinucleótido.

En otra modalidad, se proporciona un método para preparar una planta transgénica o un alga transgénica 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 un alga, o célula de planta, protoplasto, callo, hipocótilo, semilla, cotiledón, brote o la planta entera con el polinucleótido.

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

El polipéptido de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o su variante que se proporciona en la presente es una proteína PPO derivada de un procariota (por ejemplo, cianobacteria) y es una proteína PPO tolerante a los herbicidas con tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO. Específicamente, se proporciona una proteína PPO que deriva de *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, y se designa como CyPPO2, y su secuencia de aminoácidos está representada por la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la misma está representada por la SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, se proporciona una PPO que deriva de la cepa *Lyngbya* sp. PCC 8106, y se designa como CyPPO4, y su secuencia de aminoácidos está representada por la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la misma está representada por la SEQ ID NO: 4. Además, se proporciona una PPO que deriva de la cepa *Halotheca* sp. PCC 7418, y se designa como CyPPO8, y su secuencia de aminoácidos está representada por la

SEQ ID NO: 5 y una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la misma está representada por la SEQ ID NO: 6. 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 variante de 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 PPO tolerante a los herbicidas o a la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas, o al gen que codifica la proteína PPO tolerante a los herbicidas o al gen que codifica la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas mencionados anteriormente, o a todos ellos.

Las proteínas PPO derivadas de cianobacterias pueden tener conferida y/o mejorada la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO por comprender mutaciones (variaciones) de aminoácidos manteniendo la actividad enzimática de manera global en el mismo rango de las proteínas PPO de tipo silvestre. Tal mutación de aminoácidos puede comprender la sustitución, eliminación, adición y/o introducción de uno o más tipos de 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 aminoácidos seleccionados del grupo formado por aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 1 (CyPPO2) (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 1) 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 silvestre), 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: 1, que se elimina o sustituye con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (por ejemplo, uno o más residuos seleccionados del grupo formado por aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 1), puede ser uno o más seleccionados del grupo formado por S63 (que significa "S(Ser) en la 63ra ubicación"; siendo interpretada de la misma manera la expresión de los siguientes residuos de aminoácido), P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, y Y373 entre la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

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 S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, y Y373, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 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 en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre (por ejemplo, se sustituye 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), etc. y es diferente del aminoácido en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre), 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 Y373M (que significa que el "residuo de aminoácido en la 373ra ubicación se sustituye de Y(Tyr) a M(Met)"; siendo interpretada de la misma manera la expresión de las siguientes mutaciones de

aminoácidos), Y373V, Y373I, Y373T, Y373L, Y373C, F169A, A175C, A175L, A175I, P316A, P316L, V318M, V318T, V318L, G351A, S63T, P91L, R92A, V173S, V173C, V173T, V173L, E228A, L229F, F337V, L340T, L340I, L340V, T352V, I353T, I353L, I353V, y I353C, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

5 NO: 1; 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:

10 una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por mutaciones de aminoácidos de 373M, Y373V, Y373I, Y373T, Y373L, Y373C, F169A, A175C, A175L, A175I, P316A, P316L, V318M, V318T, V318L, G351A, S63T, P91L, R92A, V173S, V173C, V173T, V173L, E228A, L229F, F337V, L340T, L340I, L340V, T352V,  
15 I353T, I353L, I353V, I353C, S63T+Y373M (que significa un mutante o mutación que comprende todas las sustituciones del 63er residuo de S a T y las sustituciones del 373er residuo de Y a M; siendo interpretada de la misma manera la expresión de las siguientes dos o más mutaciones de aminoácidos), R92A+Y373M, V173S+Y373M, V173S+Y373I, V173S+Y373L, V173S+Y373V, V173C+Y373M,  
20 V173C+Y373I, V173T+Y373M, V173T+Y373I, V173L+Y373M, A175L+Y373M, A175L+Y373I, A175C+Y373M, A175C+Y373I, A175I+Y373M, E228A+Y373M, L229F+Y373T, V318M+Y373M, V318M+Y373I, V318M+Y373V, V318T+Y373I, L340I+Y373M, L340I+Y373I, L340V+Y373M, G351A+Y373M, I353T+Y373M, I353T+Y373I, I353T+Y373L, I353L+Y373M, I353V+Y373M, I353C+Y373M,  
25 S63T+V173S+Y373M, S63T+V173S+Y373I, S63T+I353T+Y373M, S63T+I353T+Y373I, V173S+V318M+Y373M, V173T+L340I+Y373M, V173S+A175C+Y373M, A175C+V318M+Y373M, A175L+V318M+Y373M, A175C+I353L+Y373M, A175C+I353V+Y373M, P316A+V318L, P316L+V318L, F337V+Y373M, T352V+Y373M, G351A+T352V+Y373M, y P91L+Y373M, en la  
30 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 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 aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 3 (CyPPO4) (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 3) son respectivamente y de manera independiente  
10 eliminados o sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (es decir, un aminoácido en la ubicación correspondiente del tipo silvestre), 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: 3, que se  
15 elimina o sustituye con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (por ejemplo, uno o más tipos seleccionados del grupo formado por 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 formado por N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231,  
20 P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, y R465, por ejemplo, uno o más seleccionados del grupo formado por A176, P318, V320, y Y375 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

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 N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, y R465, por ejemplo, uno o más seleccionados del grupo formado por A176, P318, V320, y Y375 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3  
30 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 en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre (por ejemplo, se sustituye con un  
5 aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), etc. y es diferente del aminoácido en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre), o

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

10 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 Y375M, Y375V, Y375I, Y375T, Y375C, A176C, A176L, P318L, V320L, V320M, y P318A, en la secuencia de  
15 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 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  
20 mutación de aminoácidos de Y375M, Y375V, Y375I, Y375T, Y375C, A176C, A176L, P318L+V320L, V320M, o P318A+V320L, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 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,  
25 consiste esencialmente en o consiste en:

una secuencia de aminoácidos donde uno o más seleccionados del grupo formado por aminoácidos que afectan la interacción entre los herbicidas inhibidores de PPO y el polipéptido de PPO, SEQ ID NO: 5 (CyPPO8) (por ejemplo, aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del  
30 polipéptido de la SEQ ID NO: 5), son respectivamente y de manera independiente

eliminados o sustituidos con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original, o

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

5 El residuo de aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 5, que se elimina o sustituye con otro aminoácido que es diferente del aminoácido original (por ejemplo, uno o más tipos seleccionados del grupo formado por aminoácidos ubicados en los sitios de unión a los herbicidas inhibidores de PPO del polipéptido de la SEQ ID NO: 5) pueden ser uno o más seleccionados del grupo formado por P84,  
10 R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, y F363, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

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  
15 formado por P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, y F363, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 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),  
20 Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), etc. y es diferente del aminoácido en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre (por ejemplo, se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), H(His), G(Gly), etc. y es diferente del aminoácido en la ubicación correspondiente en el tipo silvestre), o

25 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  
30 aminoácidos seleccionadas del grupo formado por P84L, R85A, R85C, R85H, R85L,

R85T, R85V, F363M, F363V, F363L, F363C, F363I, F363T, A162C, A162L, P306L, P306A, V308L, V308M, N362S, V160S, V160C, I343V, I343T, F156A, Q179G, F327V, y L330T, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o

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

Más específicamente, la variante del 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  
10 P84L, R85A, R85C, R85H, R85L, R85T, R85V, F363M, F363V, F363L, F363C, F363I, F363T, A162C, A162L, P306L, P306A, V308L, V308M, N362S, V160S, V160C, I343V, I343T, F156A, Q179G, F327V, L330T, P84L+F363M, R85A+F363M, R85A+F363I, R85C+F363M, R85H+F363M, R85L+F363M, R85T+F363M, R85V+F363M, R85A+A162L+F363M, R85A+A162L+F363I,  
15 R85A+A162C+F363M, R85A+A162C+F363I, R85A+V308M+F363M, V160S+F363M, V160S+F363I, V160S+V308M+F363I, A162L+F363M, A162C+F363M, A162C+F363I, A162C+F363L, A162C+V308M+F363M, A162C+V308L+F363M, A162L+Q179G+F363M, P306A+V308L, P306L+V308L, V308M+F363M, V308M+F363I, I343T+F363M, I343V+F363M, y N362S+F363M,  
20 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o

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, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácido con homología de secuencia (por ejemplo,  
25 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología de secuencia) descrita en la presente puede mantener una actividad enzimática equivalente 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), por ejemplo, 5% o más, 10% o más, 20% o más,  
30 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más

o 95% o una actividad enzimática mayor que la de un polipéptido con una 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 con tolerancia a los herbicidas o la variante de polipéptido que se describe en la presente pueden incluir todas las mutaciones de secuencia con la restricción de satisfacer la condición anterior (mantener la actividad enzimática y tener la función de conferir tolerancia a los herbicidas).

Los nombres de los aminoácidos que se usaron 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             |

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

Además, la variante de la proteína PPO tolerante a los herbicidas puede comprender mutaciones adicionales que presenten una actividad biológicamente igual respecto de un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos con la mutación de aminoácido descrita anteriormente. Por ejemplo, la mutación adicional puede ser una sustitución de aminoácidos que no modifica la actividad molecular de manera global, 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 ser modificada por uno o más reacciones seleccionadas 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 se aumenta o donde se aumenta la actividad de la proteína mediante variación (mutación) y/o modificación de aminoácidos.

El término "homología de secuencia" se refiere al grado de similitud con el tipo silvestre 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 a ojo o con la ayuda de programas de comparación fácilmente disponibles. Los programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el porcentaje (%) de homología entre dos o más secuencias, y la homología (%) puede calcularse en secuencias contiguas. El alineamiento de secuencia para la comparación puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA.

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 ser obtenida 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 recolección de proteína

5 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

10 generales de separación bioquímica, 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

15 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

20 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 frente a 9 familias representativas de herbicidas inhibidores de PPO clasificados según sus estructuras químicas en un sistema de

25 análisis de tolerancia a los herbicidas usando *E. coli* BT3( $\Delta$ PPO) con deficiencia de PPO. También se halló que las proteínas pueden expresarse en hojas de tabaco mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* y 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 *Arabidopsis*

30 *thaliana* ecotipo Columbia-0 (*A. thaliana*) 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 crecimiento de las plantas. Además, la transmisión por herencia de los rasgos tolerantes a herbicidas mencionados anteriormente hacia la siguiente generación se confirmó mediante un estudio de herencia.

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

Una modalidad proporciona una composición para conferir y/o mejorar la tolerancia de plantas o algas a los herbicidas, que comprende uno o más seleccionados del grupo formado por:

- (1) un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con 95% o más, 98% o más, o 99% o más de homología con las mismas;
- (2) las variantes de los polipéptidos descritas anteriormente;
- (3) un polinucleótido que codifica el polipéptido (1) o la variante del polipéptido (2);
- (4) un vector recombinante que comprende el polinucleótido; y
- (5) una célula recombinante que comprende el vector recombinante.

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 normalmente destruye una planta normal o de tipo silvestre 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 silvestre, y por lo tanto, la planta continúa creciendo. El herbicida incluye un herbicida que inhibe la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) de una planta o alga. Tales herbicidas inhibidores de PPO puede clasificarse de acuerdo con sus estructuras químicas como pirimidindionas, difeniléteres, fenilpirazoles, N-

fenilftalimidas, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidindionas, o otros herbicidas.

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

Entre los herbicidas tipo difeniléter se incluyen fomesafeno, oxifluorfenó, aclonifeno, acifluorfenó, bifenoxy, etoxifeno, lactofeno, clometoxifeno, clorintrofeno, fluoroglicofen-etilo y halosafeno, de modo no taxativo.

Entre los herbicidas tipo fenilpirazol se incluyen piraflufenetilo y fluazolato,  
10 de modo no taxativo.

Entre los herbicidas fenilftalimida se incluyen flumioxazina, cinidonetilo y flumicloracpentilo, de modo no taxativo.

Entre los herbicidas feniléster se incluyen fenopilato(2,4-diclorofenil 1-pirrolidincarboxilato) y análogos de carbamato de fenopilato (por ejemplo, análogos  
15 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”), etc., de modo no taxativo. En una modalidad, el análogo de carbamato de fenopilato puede ser uno o más del grupo  
20 formado por éster de fenilo de ácido pirrolidin-1-carboxílico (CAS No. 55379-71-0), ácido 1-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-propiniloxy)fenilo (9CI) (CAS No. 143121-07-7), ácido 1-pirrolidincarboxílico, éster de 2,4-dicloro-5-hidroxifenilo (CAS No. 143121-  
25 08-8), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(metoxycarbonil)fenilo (CAS No. 133636-94-9), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-[(propan-2-iloxy)carbonil]fenilo (CAS No. 133636-96-1), ácido 1-piperidincarboxílico, éster de 2,4-dicloro-5-(2-propiniloxy)fenilo (CAS No. 87374-78-5), pirrolidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(prop-2-in-1-iloxy)fenilo (CAS No. 87365-63-7), 4,4-  
30 difluoropiperidin-1-carboxilato de 2,4-dicloro-5-(prop-2-in-1-iloxy)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 tiadiazol se incluyen flutiacet y tidiazimina, de modo no  
5 taxativo.

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

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

10 Entre los herbicidas oxazolidindiona se incluyen pentoxazona, de modo no taxativo.

Dentro del grupo otros herbicidas se incluyen piraclonilo, flufenpiretilo y profluazolo, de modo no taxativo.

El gen de PPO tolerante a los herbicidas que se proporciona en la presente  
15 puede introducirse en una planta o alga mediante varios métodos conocidos en la 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  
20 para la introducción del gen en la planta. Por ejemplo, el promotor puede incluir un 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  
25 virus de commelina de mancha amarilla, un promotor inducible por luz de la subunidad 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 *A. thaliana*, un promotor de octopina sintasa y un promotor de BCB (proteína azul de unión de cobre), de modo no  
30 taxativo.

Adicionalmente, el vector puede incluir una secuencia de señal poli A que 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*, 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  $\alpha$ -amilasa de arroz y un terminador de faseolina, de modo no taxativo.

Además, puede usarse como promotor un promotor específico de cloroplastos, promotor de núcleo, promotor constitutivo o promotor inducible para la introducción del gen en el alga. 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 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 que sea apropiada para la transformación de algas. Puede integrarse un gen recombinante proveedor de tolerancia a los herbicidas al genoma del núcleo o al genoma del cloroplasto en un alga anfitriona, de modo no taxativo.

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 un gen que codifica un marcador seleccionable como molécula reportera, y un ejemplo del marcador seleccionable puede incluir antibióticos (por ejemplo, neomicina, carbenicilina, kanamicina, espectinomicina, higromicina, bleomicina, cloranfenicol, ampicilina, 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 carezca de una región de ADN-T, pero esté diseñado para expresarse en la planta. De ellos, por vector binario se entiende 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 el 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 región promotora y una secuencia de señal de poliadenilación para la expresión en plantas.

5 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 *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Adicionalmente, cuando se usa el vector sin región de ADN-T, pueden usarse  
10 electroporación, bombardeo de partículas, absorción mediada por polietilenglicol, etc., para introducir el plásmido recombinante en la planta.

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

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

Además, el alcance del transformante incluye un transformante en el que se  
20 ha introducido el gen así como un clon o progenie del mismo (generación T<sub>1</sub>, generación T<sub>2</sub>, generación T<sub>3</sub>, generación T<sub>4</sub>, generación T<sub>5</sub> 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  
25 sexual y asexual de la planta transformada en la que 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,  
30 una flor, un brote, una fruta, una hoja, una raíz, un tubérculo y/o una raíz tuberosa,

que se haya originado a partir de una planta transformada que fuera transformada con antelación 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 las familias 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 las familias 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, 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, 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, Staphyleaceae, Buxaceae, 5 Empetraceae, Rhamnaceae, Vitaceae, Elaeocarpaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Passifloraceae, Tamaricaceae, Elatinaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Lythraceae, Punicaceae, Onagraceae, Haloragaceae, Alangiaceae, Cornaceae, Araliaceae, y Umbelliferae(Apiaceae), de modo no taxativo.

10 En una modalidad específica, la planta puede ser uno o más tipos seleccionados del grupo formado por 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 15 ginseng, tabaco, 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, 20 clavel, crisantemo, lirio 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 tipos seleccionados del grupo formado por plantas dicotiledóneas tales como Arabidopsis, papa, berenjena, tabaco, pimienta roja, tomate, bardana, ojo de buey, lechuga, flor de 25 globo, espinaca, acelga, boniato, apio, zanahoria, nabo del diablo, perejil, col china, col, rábano, sandía, melón oriental, pepino, 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 30 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, 5 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, 10 Arthronema, 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), 15 Pleurocapsales phylum (por ejemplo, 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, 20 Westiellopsis), etc.

Como otros ejemplos de algas se puede incluir a Chlorophyta, Chlamydomonas, Volvocales, Dunaliella, Scenedesmus, Chlorella, o Hematococcm.

Como otros ejemplos de algas se puede incluir a Phaeodactylum tricornutum, Amphiprora hyaline, Amphora spp., Chaetoceros muelleri, Navicula 25 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, 30 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.

5           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  
10 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  
15 codifica la misma descritos anteriormente 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 comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un  
20 gen que codifica la misma descritos 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 codifica la misma que se proporcionan en la presente pueden usarse en combinación  
25 con un polipéptido tolerante a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo.

          Por lo tanto, la planta o alga en la que se ha introducido la PPO tolerante a los herbicidas que se proporciona en la presente puede presentar tolerancia contra dos o 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  
30 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 del herbicida inhibidor de PPO en el mecanismo de acción se denomina "segundo herbicida".

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

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

15           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 codifica la misma; y el polipéptido tolerante a un segundo  
20 herbicida o un gen que codifica el mismo.

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 comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas descrita anteriormente, su variante o un gen que codifica la misma descrito anteriormente; y el polipéptido  
25 tolerante a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo 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  
30 un alga que comprende la proteína PPO tolerante a los herbicidas, su variante o un

gen que codifica la misma; y el polipéptido tolerante a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo 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 a un segundo herbicida o un gen que codifica el mismo, 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, triazol 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 a un segundo herbicida puede ejemplificarse como uno o más tipos 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 fenilurea; 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 puede ejemplificarse mediante uno o más tipos seleccionados del grupo formado por 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, 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.

#### 【Efectos ventajosos】

Una variante de proteína PPO tolerante a los herbicidas o un gen que codifica la misma que se proporciona en la presente es aplicada a plantas o algas y por lo tanto 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 acuáticos de forma más económica.

#### 20 【Descripción de las figuras】

La figura 1 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular en el caso del tratamiento con tiafenacilo en una concentración de 0μM (micromolar), 25μM, 50μM, 100μM y 400μM, después de la transformación de *E. coli* BT3 con deficiencia de PPO (BT3(ΔPPO)) con un vector vacío de pACBB (indicado por V), con un gen de PPO1 de *A. thaliana* (indicado por WT), con un gen CyPPO2 de tipo sivestre (indicado por Cy2), con un gen CyPPO4 de tipo sivestre (indicado por Cy4) o con un gen CyPPO8 de tipo sivestre (indicado por Cy8).

La figura 2 es el mapa del vector pET29b.

La figura 3 es el mapa del vector pACBB-eGFP.

30 La figura 4 es el mapa del vector pET303-CT-His.

La figura 5 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de *E. coli* BT3 con deficiencia de PPO (BT3( $\Delta$ PPO)) transformados con un gen CyPPO2 de tipo silvestre (indicado por Cy2 WT) o con varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con tiafenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 6 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con saflufenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 7 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con flumioxazina en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 8 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con fomesafeno en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 9 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con acifluorfenó en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 10 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformado con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con piraclonilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 11 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con sulfentrazona en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 12 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de

transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformado con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con pentoxazona en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 13 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy2 WT o varios genes CyPPO2 mutantes, tras tratamiento con piraflofenetilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 14 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con un gen CyPPO4 de tipo silvestre (indicado por Cy4 WT) o varios genes CyPPO4 mutantes, tras tratamiento con tiafenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 15 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy4 WT o varios genes CyPPO4 mutantes, tras tratamiento con saflufenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 16 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformado con Cy4 WT o varios genes CyPPO4 mutantes, tras tratamiento con flumioxazina en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M, respectivamente.

La figura 17 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con un gen CyPPO8 de tipo silvestre (indicado por Cy8 WT) o varios genes mutantes CyPPO8, tras tratamiento con tiafenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M y 400 $\mu$ M, respectivamente, donde el superior es un resultado que se obtuvo usando el vector pET303-CT-His y el inferior es un resultado que se obtuvo usando un vector pACBB.

La figura 18 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformado con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con saflufenacilo en una concentración de 0 $\mu$ M, 5 $\mu$ M,

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

La figura 19 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con fomesafeno en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 20 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con acifluorfenó en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 21 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con flumioxazina en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 22 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con sulfentrazona en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 23 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con pentoxazona en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 24 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con piraflufenetilo en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 25 es una fotografía que muestra el nivel de crecimiento celular de transformantes de BT3( $\Delta$ PPO) transformados con Cy8 WT o varios genes CyPPO8 mutantes, tras tratamiento con piraclonilo en una concentración de 0μM, 5μM, 25μM, 50μM, 100μM y 200μM, respectivamente.

La figura 26 es un diagrama esquemático que presenta un vector

recombinante para preparar una proteína de fusión donde se fusionan MBP (proteína de unión a maltosa) y la proteína PPO.

La figura 27 es el mapa del vector pMAL-c2X.

La figura 28 presenta el resultado de SDS-PAGE para aislar y purificar la proteína de tipo silvestre CyPPO2 y la proteína variante CyPPO2-Y373M.

La figura 29 presenta el resultado de SDS-PAGE para aislar y purificar la proteína de tipo silvestre CyPPO4 y la proteína variante CyPPO4-Y375M.

La figura 30 presenta el resultado de SDS-PAGE para aislar y purificar la proteína de tipo silvestre CyPPO8 y la proteína variante CyPPO8-F363M.

La figura 31 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 32 presenta el nivel de germinación de semillas de los transformantes de *A. thaliana* (T<sub>2</sub>) a los que se le introdujo un gen mutante de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8, con la germinación de las semillas siendo realizada en un medio con distintas concentraciones de tiafenacilo. Col-O reporta *A. thaliana*. no transgénica.

La figura 33 presenta los resultados de la transferencia western que muestran el nivel de expresión de las proteínas variantes de CyPPO en *A. thaliana* (T<sub>2</sub>) transflectada con gen mutante de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8. Col-0 reporta *A. thaliana*. no transgénica.

La figura 34 presenta el resultado observado en el día 7 después de pulverizar 5µM de tiafenacilo a *A. thaliana* (T<sub>3</sub>) transformada a la que se le introdujo el gen que codifica la variante CyPPO2 Y373M o la variante CyPPO8 F363M. Col-O reporta *A. thaliana*. no transgénica.

La figura 35 presenta el resultado observado en el día 7 después de pulverizar 5µM de saflufenacilo a *A. thaliana* (T<sub>3</sub>) transformada a la que se le introdujo el gen que codifica la variante CyPPO2 Y373M, la variante CyPPO4 Y375M o la variante CyPPO8 F363M. Col-O reporta *A. thaliana*. no transgénica.

La figura 36 presenta el resultado observado en el día 7 después de pulverizar 5µM de fomesafeno a *A. thaliana* (T<sub>3</sub>) transformada a la que se le

introdujo el gen que codifica la variante CyPPO2 Y373M o la variante CyPPO8 F363M. Col-O reporta *A. thaliana*. no transgénica.

La figura 37 presenta un resultado observado en el día 7 después de pulverizar 25 µM o 5 µM of tiafenacilo o 75 µM de saflufenacilo a *A. thaliana* (T<sub>3</sub> o T<sub>2</sub>) transformada, a la que se le introdujo el gen que codifica la variante Y373I, Y373L, Y373V, Y373C, Y373M, V318M+Y373I, V173S+A175C+Y373M, o A175C+V318M+Y373M de CyPPO2, respectivamente.

La figura 38 presenta un resultado observado en el día 7 después de pulverizar una concentración de 25 µM o 10 µM de tiafenacilo o 100µM de saflufenacilo a *A. thaliana* (T<sub>3</sub> o T<sub>2</sub>) transformada, a la que se le introdujo el gen que codifica la variante F363V, F363L, A162L, o A162C+V308M+F363M de CyPPO8.

La figura 39 es el mapa del vector pCAMBIA3301.

La figura 40 presenta un resultado observado en el día 7 después de pulverizar herbicida inhibidor de PPO a arroz Dongjin de tipo sivestre y la generación T<sub>0</sub> de transformantes de arroz Dongjin transformado con el gen mutante de CyPPO2 Y373M o el gen mutante de CyPPO8 F363M, donde A es una imagen después del tratamiento con 853g i.a./ha de tiafenacilo y B es una imagen después del tratamiento con 2087g i.a./ha de saflufenacilo.

La figura 41 presenta un resultado observado en la imagen del día 7 después de pulverizar herbicida inhibidor de PPO a la línea transformante no. 3 de CyPPO2 Y373M T<sub>2</sub> y la línea transformante no. 3 de CyPPO8 F363M T<sub>2</sub> de arroz Dongjin, donde A es una imagen después del tratamiento con 420g i.a./ha de tiafenacilo y B es una imagen después del tratamiento con 840g i.a./ha de saflufenacilo (1: hoja joven → 4: hoja madura). Dongjin reporta arroz no transgénico (cultivar).

La figura 42 es el resultado de la transferencia western que muestra la expresión de la proteína variante de CyPPO2 Y373M en las hojas del transformante de CyPPO2 Y373M del arroz Dongjin.

La figura 43 es el resultado de la transferencia western que muestra la expresión de la proteína variante de CyPPO8 F363M en las hojas del transformante de CyPPO8 F363M del arroz Dongjin.

La figura 44 es el resultado de transferencia southern que analiza si CyPPO8 F363M está presente en el transformante de CyPPO8 F363M del arroz Dongjin.

La figura 45 es una fotografía que muestra el nivel de tolerancia contra distintos herbicidas de transformantes de *A. thaliana* ( $T_3$ ) a los que se les introdujo respectivamente los genes mutantes Y373I de CyPPO2 y F363V de CyPPO8.

La figura 46 es una fotografía que muestra el nivel de tolerancia de la generación  $T_4$  de transformantes de *A. thaliana* al que se le introdujo los genes mutantes Y373I de CyPPO2 y F363V de CyPPO8 respectivamente.

La figura 47 es una fotografía que muestra el nivel de tolerancia a los herbicidas de la generación  $T_5$  de transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO2 Y373I y transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO8 F363V.

La figura 48 es el resultado de la transferencia western que muestra la expresión de la proteína PPO de la generación  $T_4$  de transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO2 Y373I y transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO8 F363V.

La figura 49 es el resultado de la transferencia western que muestra la expresión de la proteína PPO de la generación  $T_5$  de transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO2 Y373I y transformante de *A. thaliana* por introducción de CyPPO8 F363V.

La figura 50 es un diagrama estructural que presenta a modo de ejemplo la estructura del vector para la transformación de soja.

La figura 51 es el resultado de la transferencia southern que analiza si un gen mutante está presente en el transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de CyPPO8 F363M de soja.

La figura 52 es una fotografía que muestra el nivel de tolerancia a los herbicidas de la generación  $T_2$  del transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de CyPPO8 F363M de soja. Kwangan reporta soja no transgénica (cultivar).

La figura 53 es el resultado de la transferencia western que analiza si la

proteína CyPPO2 Y373M y la proteína CyPPO8 F363M se expresan en las hojas del transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de CyPPO8 F363M de la soja, respectivamente.

La figura 54 es una fotografía que muestra la imagen de crecimiento antes (superior) y después (inferior) del tratamiento con tiafenacilo en el transformante de CyPPO8 F363M de colza. Youngsan significa colza no transgénica (cultivar).

La figura 55 es una fotografía que muestra la imagen de crecimiento antes (superior) y después (inferior) del tratamiento con saflufenacilo en el transformante de CyPPO8 F363M de colza. Tipo sivestre reporta colza no transgénica (cultivar).

La figura 56 presenta el resultado de la transferencia western que analiza si la proteína CyPPO8 F363M se expresa en las hojas del transformante de CyPPO8 F363M de colza (superior) y muestra el resultado de la tinción con Coomassie (inferior).

## 【Modos de la invención】

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se presentan solo a efectos ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

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

El Institut Pasteur (Francia) proporcionó *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Lyngbya* sp. cepa PCC 8106 y *Halothece* sp. cepa PCC 7418 y de cada cepa se aislaron los genes de PPO. Cada gen de PPO se sintetizó usando información de secuencia con codones optimizados para un análisis eficaz de la resistencia a los herbicidas en BT3 *E. coli*. Los genes de PPO sintetizados se amplificaron usando los cebadores de la tabla 1.

Se mezcló un microlitro (1 µl) de cada plantilla (ADN genómico de cada cepa) , 5 µl de tampón 10X, 1 µl de mezcla de dNTP (cada 10 mM), 1 µl de un cebador directo (véase tabla 1; 10 µM), 1 µl de un cebador inverso (véase tabla 1; 10 µM), 40 µl de DDW, y 1 µl de Pfu-X (Solgent, 2,5 unidades/µl) para preparar 50 µl

de mezcla de reacción de PCR y se realizó la amplificación en condiciones de 94 °C durante 4 minutos, y 25 ciclos (a 94 °C durante 30 segundos, a 56 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 minuto sonday medio), a 72 °C durante 5 minutos.

La PPO aislada de *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112 se designó como CyPPO2, la PPO aislada de *Lyngbya* sp. cepa PCC 8106 se designó como CyPPO4, y la PPO aislada de *Halotheca* sp. cepa PCC 7418 se designó como CyPPO8.

Adicionalmente, se analizaron las secuencias de nucleótidos respectivas de CyPPO2, CyPPO4, y CyPPO8 y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias correspondientes y representadas por las SEQ ID NO: 1 a 6.

10 **【Tabla 1】**

| Cepa                                       | Cebador  | Secuencia                          | SEQ ID NO: |
|--------------------------------------------|----------|------------------------------------|------------|
| <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 | CyPPO2_F | CCCCGGATCCATGGAACCTTCTTGATACTCT    | 12         |
|                                            | CyPPO2_R | CCCCCTCGAGGATTGACC TGGTATCACTCT    | 13         |
| <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106                | CyPPO4_F | CCCCGGATCCATGACCCATGTTTGGATTC      | 14         |
|                                            | CyPPO4_R | CCCCCTCGAGCTGTCTAAAAATGATAAAATCTCG | 15         |
| <i>Halotheca</i> sp. PCC 7418              | CyPPO8_F | CCCCGGATCCATGATAGATACTCTTATAGTGGG  | 16         |
|                                            | CyPPO8_R | CCCCCTCGAGTCCTAAGTAATCTAAACTG      | 17         |

Se analizó la tolerancia a los herbicidas de CyPPO2, CyPPO4, y CyPPO8 preparados anteriormente usando *E. coli* (BT3 ( $\Delta$ PPO)) con deficiencia de PPO. La cepa de BT3 ( $\Delta$ PPO) fue proporcionada por la Universidad de Hokkaido (Japón) y es una cepa de *E. coli* con deficiencia de PPO de tipo hem-G y con tolerancia a kanamicina (véase "Watanabe et al., 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 al., Molecular Characterization and Subcellular Localization of Protoporphyrinogen Oxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Physiol. 2000 Sep;124(1):59-70").

BT3 ( $\Delta$ PPO) fue transformada con cada gen de CyPPO y fue cultivada en medio LB (Luria-Bertani) agar con herbicida inhibidor de PPO, y por lo tanto se analizó si se inhibió el crecimiento de la *E. coli* transformada.

El proceso de ensayo específico fue el siguiente.

Los genes CyPPO2, CyPPO4, y CyPPO8 preparados anteriormente se clonaron en el vector pACBB (Plásmido #32551; Addgene; véase la figura 3). Los

plásmidos clonados se agregaron a la célula competente BT3 respectivamente, transformándola así mediante un método de choque térmico. La *E. coli* transformada con cada gen de CyPPO se cultivó en medio agar LB con cloranfenicol (34 µg/ml, Duchefa).

5 Una única colonia de *E. coli* transformada con cada gen de CyPPO se cultivó en 3 ml de caldo de LB con cloranfenicol durante la noche (220 rpm, 37 °C), y después cada cultivo se volvió a cultivar con medio fresco hasta que la absorbancia (OD<sub>600</sub>) fuera de 0,5 a 1. Se diluyó con caldo de LB hasta una absorbancia (OD<sub>600</sub>) de 0,5. Nuevamente, la solución diluida se diluyó en serie 5 veces por un factor de un  
10 décimo. Después, se colocó 10 µl de cada solución diluida en el medio LB agar con cloranfenicol (34 µg/ml) y una concentración de 0~400 µM de tiafenacilo. El medio LB se cultivó a 37 °C en condiciones de luz y se evaluó el nivel de inhibición del crecimiento después de transcurridas 16 a 20 horas.

A efectos comparativos se realizó el mismo ensayo usando el transformante  
15 de BT3 *E. coli* transformado con vector pACBB-eGFP vector (Plásmido #32551; Addgene; véase figura 3) y transformante de BT3 *E. coli* al que se le introdujo el gen de PPO de tipo sivestre derivado de *A. thaliana* (AtPPO1 tipo sivestre) (SEQ ID NO: 8).

Como se muestra en la figura 1, los transformantes de BT3 *E. coli* de los  
20 genes CyPPO2, CyPPO4, y CyPPO8 presentaron mayor tolerancia a los herbicidas en comparación con los transformantes de *E. coli* del gen AtPPO1 en todas las concentraciones del herbicida analizadas.

25 **Ejemplo 2. Determinación de los residuos de aminoácido de PPO que interactúan con herbicidas inhibidores de PPO a partir del complejo de herbicida inhibidor de PPO y PPO**

Con el fin de confirmar la información de la estructura de unión de la proteína PPO y el herbicida, se usó tiafenacilo como ejemplo representativo de los herbicidas inhibidores de PPO.

Con el fin de obtener una proteína CyPPO2 soluble en agua, se sustituyeron 7 residuos de aminoácido hidrofóbicos posicionados en el dominio de unión de la membrana tilacoide en el aminoácido de CyPPO2 (SEQ ID NO: 1) con residuos hidrofílicos. El gen que codifica la proteína variante con los residuos de aminoácido sustituidos de CyPPO2 se clonó al vector pET29b (número de catálogo: 69872-3; EMD Biosciences; véase figura 2), y la proteína CyPPO2 se expresó usando el sistema de *E. coli*. La proteína CyPPO2 expresada se purificó a través de cromatografía de afinidad de níquel y se cristalizó. El complejo de CyPPO2 y tiafenacilo se obtuvo al remojar con 3 mM de tiafenacilo y fue usado para la obtención de la difracción de rayos x con un acelerador de radiación sincrotrón. Se obtuvieron los datos de difracción de rayos X con resolución 2,8 Å de los cristales del complejo de CyPPO2-tiafenacilo y se determinó la estructura tridimensional, y se analizó la posición de unión de tiafenacilo en la proteína de CyPPO2. Como resultado del análisis estructural del complejo de CyPPO2 y tiafenacilo, los aminoácidos de las posiciones S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353 y Y373 de la proteína CyPPO2 (SEQ ID NO: 1) interactuaron con tiafenacilo.

Y además, usando la información derivada de la estructura del complejo de CyPPO2-tiafenacilo, se determinaron mediante un análisis de homología de secuencia los residuos de aminoácido que interactúan con tiafenacilo en las proteínas CyPPO4 (SEQ ID NO: 3) y CyPPO8 (SEQ ID NO: 5) (NCBI BLAST, [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) presentados a continuación.

Los aminoácidos de la proteína CyPPO4 (SEQ ID NO: 3) que interactúan con tiafenacilo son N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, y R465. Los aminoácidos de la proteína CyPPO8 (SEQ ID NO: 5) que interactúan con tiafenacilo son P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, y F363.

**Ejemplo 3. Verificación de la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de variantes de PPO (ensayo en *E. coli*)**

Con el fin de mejorar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de CyPPO2, CyPPO4 y CyPPO8, se introdujeron una o varias mutaciones en las posiciones que interactúan con el herbicida obtenidas en el ejemplo 2, de manera respectiva. BT3 ( $\Delta$ PPO) se transformó con el gen de CyPPO mutado y se cultivó en condiciones de presencia de herbicida inhibidor de PPO, y por lo tanto se analizó si se inhibió el crecimiento de BT3 transformada. El tipo silvestre de cada gen se usó como control.

El método del experimento fue el siguiente:

Los genes CyPPO2 y CyPPO4 clonados en el vector pACBB (Plásmido #32551; Addgene; véase la figura 3) se mutaron usando cebadores de las tablas 2 a 3 y el CyPPO8 clonado en el vector pACBB o el vector pET303-CT-His (VT0163; Novagen; véase la figura 4) se mutaron usando cebadores de la tabla 4.

Se prepararon cincuenta microlitros de mezcla de reacción de PCR mezclando 1  $\mu$ l de plantilla, 5  $\mu$ l de tampón 10X, 1  $\mu$ l de mezcla de dNTP (cada 10 mM), 1  $\mu$ l de un cebador directo (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l de un cebador inverso (10  $\mu$ M), 40  $\mu$ l de DDW, y 1  $\mu$ l de Pfu-X (Solgent, 2,5 unidades/ $\mu$ l) para preparar 50  $\mu$ l de mezcla de reacción de PCR y se realizó la amplificación en condiciones de 94 °C durante 4 minutos, y 17~25 ciclos (a 94 °C durante 30 segundos, a 56~65 °C durante 30 segundos y a 72°C durante 3 minutos), a 72 °C durante 5 minutos. Se agregó 0,5  $\mu$ l de DpnI (New England Biolabs) en cada 5  $\mu$ l de producto de PCR y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La solución de la reacción se usó para transformar *E. coli* mediante el método de choque térmico. Cada transformante se cultivó en medio agar LB con cloranfenicol o ampicilina. Cada mutación se confirmó mediante secuenciamiento de ADN de plásmidos y cada plásmido fue usado para transformar BT3 ( $\Delta$ PPO).

**【Tabla 2】**

Cebador para la mutación de CyPPO2

| No. | Mutación de CyPPO2 | Cebador (Directo: superior; Inverso: inferior) (5'-> 3') |
|-----|--------------------|----------------------------------------------------------|
|-----|--------------------|----------------------------------------------------------|

|    |             |                                                                                                        |
|----|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Y373M       | GACCTCTATGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 18)<br>ACCAATCATAGAGGTCAAT 19)                              |
| 2  | Y373V       | GACCTCTGTGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 20)<br>ACCAATCACAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 21)       |
| 3  | Y373I       | GACCTCTATCATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 22)<br>ACCAATGATAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 23)       |
| 4  | Y373T       | GACCTCTACAATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 24)<br>ACCAATTGTAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 25)       |
| 5  | Y373L       | GACCTCTTTGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 26)<br>ACCAATCAAAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 27)       |
| 6  | Y373C       | GACCTCTTGTATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 28)<br>ACCAATACAAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 29)       |
| 7  | A175C       | GGTGTGTACTGTGGAGATCCTCAACAGCTC (SEQ ID NO: 30)<br>AGGATCTCCACAGTACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 31)       |
| 8  | A175L       | GGTGTGTACTTGGGAGATCCTCAACAGCTC (SEQ ID NO: 32)<br>AGGATCTCCCAAGTACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 33)       |
| 9  | V318M       | TATCCAACAATGGCTTCAGTTGTGTTGGCA (SEQ ID NO: 34)<br>AACTGAAGCCATTGTTGGATAAGTGAATGC (SEQ ID NO: 35)       |
| 10 | G351A       | CGCTGTCTCGCTACGATTGGACATCGAGT (SEQ ID NO: 36)<br>CCAAATCGTAGCGAGACAGCGAATTCCCTG (SEQ ID NO: 37)        |
| 11 | S63T        | GCCCGAACACTTTTTCGCCGACGCCGAATTG (SEQ ID NO: 38)<br>GGCGAAAAAGTGTTCCGGCCCTCCTCCAG (SEQ ID NO: 39)       |
| 12 | R92A        | CAAATTGCCTGCTTTTGTGTATTGGGAAAATAAG (SEQ ID NO: 40)<br>ATACACAAAAGCAGGCAATTTGCGATCGGC (SEQ ID NO: 41)   |
| 13 | V173S       | GTTTCTGGGAGTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 42)<br>CCGGCATAACTCCCAGAAACAAAAGGTTCC (SEQ ID NO: 43)      |
| 14 | V173C       | GTTTCTGGGTGTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 44)<br>CCGGCATAACACCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 45)    |
| 15 | V173T       | GTTTCTGGGACTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 46)<br>CCGGCATAAGTCCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 47)    |
| 16 | L229F       | ACTAAGCCGGGGGAGTTCGGTTCGTTCAAGCAG (SEQ ID NO: 48)<br>CTGCTTGAACGAACCGAACTCCCCCGGCTTAGT (SEQ ID NO: 49) |
| 17 | L340I       | TTTTGGAAATATAATTCCGAGGGGGCAGGG (SEQ ID NO: 50)<br>CTCGGAATTATATTTCCAAAACCCACTAATTTAC (SEQ ID NO: 51)   |
| 18 | I353T       | TCGGGACGACTTGGACATCGAGTTTATTTCC (SEQ ID NO: 52)<br>GATGTCCAAGTCGTCCCGAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 53)     |
| 19 | I353L       | CTCGGGACGCTTGGACATCGAGTTTATTT (SEQ ID NO: 54)<br>ATGTCCAAAGCGTCCCAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 55)         |
| 20 | I353V       | ACTAAGCCGGGGGAGTTCGGTTCGTTCAAGCAG (SEQ ID NO: 56)<br>CTGCTTGAACGAACCGAACTCCCCCGGCTTAGT (SEQ ID NO: 57) |
| 21 | I353C       | TCGGGACG TGT TGGACATCGAGTTTATTTCC (SEQ ID NO: 58)<br>GATGTCCA ACA CGTCCCGAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 59) |
| 22 | V318T       | TATCCTACGACTGCCTCCGTTGTCTTAGCA (SEQ ID NO: 60)<br>AACGGAGGCAGTCGTAGGATAAGTAAAAGC (SEQ ID NO: 61)       |
| 23 | E228A       | AAACTAAGCCGGGGGCGTTGGGTTTCGTTCAAG (SEQ ID NO: 62)<br>CTTGAACGAACCCAACGCCCCCGGCTTAGTTTT (SEQ ID NO: 63) |
| 24 | P91L        | AAACTTCTTAGATTCTGTATTGGGAAAAC (SEQ ID NO: 64)<br>ACGAATCTAAGAAGTTTCTATCTGCGAAT (SEQ ID NO: 65)         |
| 25 | P316A+V318L | GCTTTTACTTATGCTACGCTTGCCTCCGTT (SEQ ID NO: 66)<br>GACAACGGAGGCAAGCGTAGCATAAGTAAA (SEQ ID NO: 67)       |
| 26 | P316L+V318L | GCTTTTACTTATCTTACGCTTGCCTCCGTT (SEQ ID NO: 68)<br>GACAACGGAGGCAAGCGTAAGATAAGTAAA (SEQ ID NO: 69)       |
| 27 | F337V       | TTAGTGGGTGTTGGAAATTTAATTCGAGGGG (SEQ ID NO: 70)                                                        |

|    |       |                                                    |
|----|-------|----------------------------------------------------|
|    |       | TAAATTTCCAACACCCACTAATTTACCCTTGAC (SEQ ID NO: 71)  |
| 28 | T352V | TGTCTCGGGGTGATTTGGACATCGAGTTTATTT (SEQ ID NO: 72)  |
|    |       | GTCCAAATCACCCCGAGACAGCGAATTCCCTG (SEQ ID NO: 73)   |
| 29 | V173L | GTTTCTGGGCTTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 74)    |
|    |       | CGGCATAAAGCCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 75)    |
| 30 | A175I | GTTTCTGGGGTTTATATTGGCGATCCGCAA (SEQ ID NO: 76)     |
|    |       | TTGTTGCGGATCGCCAATATAAACCCAGAG (SEQ ID NO: 77)     |
| 31 | L340V | TTTTGGAAATGTTATTCCAAGAGGTCAAGGAATC (SEQ ID NO: 78) |
|    |       | CTTGGAATAACATTTCCAAAACCCACGAGTTT (SEQ ID NO: 79)   |
| 32 | L340T | TTTTGGAAATACTATTCCAAGAGGTCAAGG (SEQ ID NO: 80)     |
|    |       | CTTGGAATAGTATTTCCAAAACCCACGAGTTTTC (SEQ ID NO: 81) |
| 33 | F169A | CCAGAAACAGCAGGTTCCACCAACCGCTGCATC (SEQ ID NO: 82)  |
|    |       | GTGGAACCTGCTGTTTCTGGGGTTTATGCCG (SEQ ID NO: 83)    |

【Tabla 3】

Cebador para la mutación de CyPPO4

| No. | Mutación de CyPPO4 | Cebador (Directo: superior; Inverso: inferior) (5'-> 3') |
|-----|--------------------|----------------------------------------------------------|
| 1   | Y375M              | CTTACATCTATGATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 84)           |
|     |                    | CCACCAATCATAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 85)           |
| 2   | Y375V              | CTTACATCTGTTATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 86)           |
|     |                    | CCACCAATAACAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 87)           |
| 3   | Y375I              | CTTACATCTATCATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 88)           |
|     |                    | CCACCAATGATAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 89)           |
| 4   | Y375T              | CTTACATCTACCATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 90)           |
|     |                    | CCACCAATGGTAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 91)           |
| 5   | Y375C              | CTTACATCTTGTATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 92)           |
|     |                    | CCACCAATACAAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 93)           |
| 6   | A176C              | GGTGTGTATTGTGGAGATCCACAACAGCTT (SEQ ID NO: 94)           |
|     |                    | GGATCTCCCAAGTACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 95)            |
| 7   | A176L              | GGTGTGTATTTGGGAGATCCACAACAGCTT (SEQ ID NO: 96)           |
|     |                    | TGGATCTCCCAATAACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 97)           |
| 8   | P318L+V320L        | ATTCCTTATTTGCCATTGGCTTGTGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 98)        |
|     |                    | AACACAAGCCAATGGCAAATAAGGAATTTCTGTA (SEQ ID NO: 99)       |
| 9   | V320M              | TATCCTCCAATGGCTTGTGTTGTGCTCGCA (SEQ ID NO: 100)          |
|     |                    | AACACAAGCCATTGGAGGATAAGGAATTTTC (SEQ ID NO: 101)         |
| 10  | P318A+V320L        | ATTCCTTATGCTCCATTGGCTTGTGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 102)       |
|     |                    | AACACAAGCCAATGGAGCATAAGGAATTTCTGTA (SEQ ID NO: 103)      |

5 【Tabla 4】

Cebador para la mutación de CyPPO8

| No. | Mutación de<br>CyPPO8 | Cebador (Directo: superior; Inverso: inferior)           |
|-----|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| 1   | F363M                 | TTGACAAATATGATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 104)          |
|     |                       | CACCAATCATATTTGTCAAAAGGTGCCATC (SEQ ID NO: 105)          |
| 2   | F363V                 | CTT TTG ACA AAT GTT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 106) |
|     |                       | AGC TCC ACC AAT AAC ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 107) |
| 3   | F363L                 | CTT TTG ACA AAT CTT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 108) |
|     |                       | AGC TCC ACC AAT AAG ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 109) |
| 4   | F363C                 | CTT TTG ACA AAT TGT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 110) |
|     |                       | AGC TCC ACC AAT ACA ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 111) |
| 5   | A162C                 | TCTGGTGTGTAT TGT GGAGATGTTGATCAA (SEQ ID NO: 112)        |
|     |                       | ATCAACATCTCC ACA ATACACACCAGAAAC (SEQ ID NO: 113)        |
| 6   | A162L                 | TCTGGTGTGTAT CTT GGAGATGTTGATCAA (SEQ ID NO: 114)        |
|     |                       | ATCAACATCTCC AAG ATACACACCAGAAAC (SEQ ID NO: 115)        |
| 7   | P306L+V308L           | ATCTCATAT CTT CCA CTT GCTTGCGTTGTG (SEQ ID NO: 116)      |
|     |                       | AACGCAAGC AAG TGG AAG ATATGAGATTTC (SEQ ID NO: 117)      |
| 8   | V308M                 | TCATATCCTCCA ATG GCTTGCGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 118)        |
|     |                       | CACAACGCAAGC CAT TGGAGGATATGAGAT (SEQ ID NO: 119)        |
| 9   | P306A+V308L           | ATTTCTATGCCCCCTAGCTTGTGTGGTCTTAGCC (SEQ ID NO: 120)      |
|     |                       | CACACAAGCTAGGGGGGCATAGGAAATTCGTTTAAGG (SEQ ID NO: 121)   |
| 10  | V160S                 | GTGTCTGGGTCTTATGCAGGGGATGTGGATC (SEQ ID NO: 122)         |
|     |                       | CCTGCATAAGACCCAGACACAAACGGACTCAC (SEQ ID NO: 123)        |
| 11  | I343T                 | TTGGTACAACCTGGAGTTCAACACTCTTTCC (SEQ ID NO: 124)         |
|     |                       | GAACTCCAAGTTGTACCAAGAGTGCGGATTTC (SEQ ID NO: 125)        |
| 12  | F363I                 | CTT TTG ACA AAT ATT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 126) |
|     |                       | AGC TCC ACC AAT AAT ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 127) |
| 13  | F363T                 | CTT TTG ACA AAT ACT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 128) |
|     |                       | AGC TCC ACC AAT AGT ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 129) |
| 14  | R85A                  | GGACTTCCCGCTTATGTTTATTGGGAGGGG (SEQ ID NO: 130)          |
|     |                       | CAATAAACATAAGCGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 131)        |
| 15  | I343V                 | CTTGGTACAGTTTGGAGTTCAACACTCTTTC (SEQ ID NO: 132)         |
|     |                       | AACTCCAAACTGTACCAAGAGTGCGGATTTC (SEQ ID NO: 133)         |
| 16  | P84L                  | AGGTTTACTTAGGTATGTTTACTGGGAGGG (SEQ ID NO: 134)          |
|     |                       | CATACCTAAGTAAACCTCTATCTGCAAAGA (SEQ ID NO: 135)          |
| 17  | R85C                  | GACTTCCCTGTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 136)       |
|     |                       | TAAACATAACAGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 137)       |
| 18  | R85H                  | ACTTCCCCATTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 138)        |
|     |                       | CAATAAACATAATGGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 139)        |
| 19  | R85L                  | ACTTCCCCTTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 140)        |

|    |             |                                                       |
|----|-------------|-------------------------------------------------------|
|    |             | CAATAAACATAAAGGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 141)     |
| 20 | R85T        | GACTTCCCCTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 142)     |
|    |             | ATAAACATAAGTGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 143)   |
| 21 | R85V        | GACTTCCCCTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 144)     |
|    |             | ATAAACATAAACGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 145)   |
| 22 | F156A       | GTGAGTCCGGCTGTGTCTGGGGTTTATGCA (SEQ ID NO: 146)       |
|    |             | CCCAGACACAGCCGGACTACTAACCCTTG (SEQ ID NO: 147)        |
| 23 | V160C       | CCGTTTGTGTCTGGGTGCTATGCAGGGGATGTG (SEQ ID NO: 148)    |
|    |             | CACATCCCCTGCATAGCACCCAGACACAAACGG (SEQ ID NO: 149)    |
| 24 | Q179G       | TCCGCCAGTCCGGTAACCTCGTCCAAATGCAG (SEQ ID NO: 150)     |
|    |             | CGAGTTACCGGACTGGCGGATGTGGGCGGTG (SEQ ID NO: 151)      |
| 25 | F327V       | GTTTTCCCCTCAAAGGAGTGGGTAATCTTAACCCTC (SEQ ID NO: 152) |
|    |             | GAGGGTTAAGATTACCCACTCCTTTGAGGGGAAAAC (SEQ ID NO: 153) |
| 26 | L330T       | TTTGGTAATACTAACCCTCGCAGTCAAGGA (SEQ ID NO: 154)       |
|    |             | GCGAGGGTTAGTATTACCAAATCCTTTGAG (SEQ ID NO: 155)       |
| 27 | F363M+N362S | CTTTTGACATCAATGATTGGTGGAGCTACC (SEQ ID NO: 156)       |
|    |             | CCAATCATTGATGTCAAAAGGTGCCATCCT (SEQ ID NO: 157)       |

Una única colonia de *E. coli* transformada con cada gen de CyPPO se cultivó en 3 ml de caldo de LB con cloranfenicol durante la noche (220 rpm, 37 °C), y después cada cultivo se volvió a cultivar con medio fresco hasta que la absorbancia (OD<sub>600</sub>) fuera de 0,5 a 1. Se diluyó con caldo de LB hasta una absorbancia (OD<sub>600</sub>) de 0,5. Nuevamente, la solución diluida se diluyó en serie 5 veces por un factor de un décimo. Después, se colocaron 10 µl de cada solución diluida en el medio LB agar con cloranfenicol (34 µg/ml) y una concentración de 0~400 µM de tiafenacilo. El medio LB se cultivó a 37 °C en condiciones de luz y se evaluó el nivel de inhibición del crecimiento después de transcurridas 16 a 20 horas.

Los herbicidas que se usaron en el ensayo figuran en la lista de la tabla 5.

【Tabla 5】

| Familia                             | Herbicida     |
|-------------------------------------|---------------|
| Herbicida a base de pirimidindiona  | Tiafenacilo   |
|                                     | Saflufenacilo |
| Herbicida a base de difeniléter     | Fomesafeno    |
|                                     | Acifluorfen   |
| Herbicida a base de N-feniltalimida | Flumioxazina  |

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| Herbicida a base de triazolinonas    | Sulfentrazona   |
| Herbicida a base de oxazolidindionas | Pentoxazona     |
| Herbicida a base de fenilpirazoles   | Piraflufenetilo |
| Otros                                | Piraclonilo     |

Los resultados se presentan en las tablas 6 a 8 y en las figuras 5 a 25.

【Tabla 6】

Nivel de tolerancia a herbicidas que confiere la mutación CyPPO2.

| <b>CyPPO2</b>          | <b>Tiafenacilo</b> | <b>Saflufenacilo</b> | <b>Flumioxazina</b> |
|------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| CyPPO2 (tipo sivestre) | -                  | -                    | -                   |
| Y373M+G351A            | +++++              | +++++                | +++++               |
| Y373C                  | ++++               | +++++                | +++++               |
| Y373I                  | ++++               | +++++                | +++++               |
| Y373L                  | ++++               | +++++                | +++++               |
| Y373M                  | ++++               | +++++                | +++++               |
| Y373T                  | ++++               | +++++                | +++++               |
| Y373V                  | +++                | +++++                | +++++               |
| A175C                  | +++                | ++++                 | +++++               |
| A175L                  | ++                 | +++++                | ++++                |
| V318M                  | ++                 | ++++                 | +++++               |
| P316A+V318L            | +                  | NT                   | NT                  |
| P316L+V318L            | +                  | NT                   | NT                  |
| F337V+Y373M            | ++                 | NT                   | NT                  |
| T352V+Y373M            | ++++               | NT                   | NT                  |
| G351A+T352V+Y373M      | +++                | NT                   | NT                  |
| P91L+Y373M             | ++                 | NT                   | NT                  |

5 (NT: no evaluado)

【Tabla 7】

Nivel de tolerancia a herbicidas que confiere la mutación CyPPO4.

| <b>CyPPO4</b> | <b>Tiafenacilo</b> | <b>Saflufenacilo</b> | <b>Flumioxazina</b> |
|---------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| CyPPO4        | -                  | -                    | -                   |
| Y375M         | +++++              | +++++                | +++++               |
| Y375V         | +++++              | +++++                | +++++               |
| Y375I         | +++++              | +++++                | +++++               |
| Y375T         | +++++              | +++                  | +++++               |
| Y375C         | +++++              | +++                  | NT                  |

|             |       |       |       |
|-------------|-------|-------|-------|
| A176C       | +++++ | +++++ | +++++ |
| A176L       | +++++ | ++++  | +++++ |
| P318L+V320L | +++++ | ++++  | NT    |
| V320M       | +++++ | ++++  | NT    |
| P318A+V320L | +++++ | ++++  | NT    |

(NT: no evaluado)

【Tabla 8】

Nivel de tolerancia a herbicidas que confiere la mutación CyPPO8.

| CyPPO 8     | Tiafen acilo | Saflufenacil o | Fomesafen o | Acifluorfen o | Flumioxazina | Sulfentrazone | Pentoxazona | Pirafufenetilo | Piracilonilo |
|-------------|--------------|----------------|-------------|---------------|--------------|---------------|-------------|----------------|--------------|
| CyPPO8      | -            | -              | -           | -             | -            | -             | -           | -              | -            |
| F363C       | ++++         | ++++           | ++++        | +++++         | +++          | ++++          | +++++       | +++<br>++      | ++++<br>+    |
| F363L       | +++          | +++            | +           | +++           | ++           | ++            | +++++       | +++<br>+       | ++++         |
| F363M       | +++          | +++            | +           | +++           | ++           | ++            | +++++       | +++<br>+       | ++++         |
| F363V       | +++          | +++            | -           | ++            | +++          | ++            | +++++       | +++<br>+       | ++++<br>+    |
| A162L       | ++           | ++             | +++         | ++++          | ++++         | ++++          | ++++        | +++<br>+       | +++          |
| V308M       | ++           | ++             | +++         | ++++<br>+     | +++          | ++++          | ++++        | +++<br>+       | ++++         |
| P306A+V308L | +            | +              | +           | ++++          | NT           | ++            | +++         | +++            | +            |
| P306L+V308L | +            | +              | ++          | ++++<br>+     | NT           | ++++          | +++         | +++<br>+       | +            |
| A162C       | NT           | NT             | NT          | ++            | NT           | +             | +++         | +++<br>+       | +            |
| P84L+F363M  | +++          | NT             | NT          | NT            | NT           | NT            | NT          | NT             | NT           |
| N362S+F363M | +++          | NT             | NT          | NT            | NT           | NT            | NT          | NT             | NT           |

(NT: no evaluado)

5 Las tablas 6 a 8 presentan los resultados de la evaluación de la tolerancia a herbicidas de variantes de PPO y de tipo sivestre. El nivel de tolerancia a los herbicidas del tipo sivestre se representó mediante "-", y el nivel de tolerancia a los herbicidas se calificó representando el mismo nivel de tolerancia mediante "-", y si era mayor, se representó agregando "+" a un máximo de "+++++".

10 Las figuras 5 a 25 presentan los resultados de *E. coli* transformada con los genes CyPPO (tipo sivestre y variantes) y la concentración del tratamiento con

herbicida se describe en la parte superior. La columna más a la izquierda es el resultado de la solución de cultivo de *E. coli* OD<sub>600</sub>=0,5 y las siguientes cinco columnas se diluyeron 5 veces por un factor de un décimo.

Tal como se muestra en la tabla 6 y las figuras 5 a 13, el transformante de  
5 CyPPO2 de tipo *sivestre* (de aquí en adelante representado como ‘Cy2 WT’; control) presentó una rápida inhibición del crecimiento a partir de 25µM o 50µM de tratamiento con herbicida tiafenacilo a base de pirimidindiona, pero la inhibición del crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M,  
10 G351A+Y373M, P316A+V318L, P316L+V318L, Y373M+F337V, Y373M+T352V, Y373M+G351A+T352V, y Y373M+P91L respectivamente, no se observó incluso en la concentración máxima (200 µM) (figura 5). Cuando se trató con otro herbicida saflufenacilo a base de pirimidindiona, Cy2 WT también presentó inhibición del crecimiento a la concentración 100 µM o mayor, pero en los transformantes donde se  
15 introdujeron los genes mutantes de Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M, y G351A+Y373M respectivamente no se observó incluso en la concentración máxima (200 µM) (figura 6). Cuando se trató con otro herbicida flumioxazina a base de N-fenilftalimidias, la inhibición de crecimiento de Cy2 WT comenzó a partir de una concentración de 25µM de tratamiento con herbicida, pero  
20 la inhibición del crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M, y G351A+Y373M respectivamente no se observó incluso en la concentración máxima (200 µM) (figura 7).

Tal como se muestra en la tabla 7 y las figuras 14 a 16, cuando se trató con  
25 tiafenacilo, el gen CyPPO4 de tipo *sivestre* (de aquí en adelante representado por ‘Cy4 WT’; control) presentó inhibición del crecimiento a partir de 100 µM del herbicida con el que se trató, pero la inhibición del crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de A176L, A176C, P318L+V320L, P318A+V320L, V320M, Y375I, Y375T, Y375V, Y375M, y Y375C  
30 respectivamente, no se observó en la concentración máxima (200 µM) (FIG. 14).

Cuando se trató con saflufenacilo, Cy4 WT presentó una inhibición del crecimiento a partir de 100  $\mu$ M del tratamiento con herbicida, pero la inhibición del crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de Y375C, Y375I, Y375M, Y375T, Y373V, A176C, A176L, P318L+V320L, P318A+V320L, y V320M respectivamente no se observó en la concentración máxima (200  $\mu$ M) (figura 15). Cuando se trató con flumioxazina, la inhibición del crecimiento de Cy4 WT se observó a partir de una concentración de 200  $\mu$ M del tratamiento con herbicida, pero la inhibición del crecimiento del transformante donde se introdujeron los genes mutantes de Y375I, Y375M, Y375T, Y373V, A176C, y A176L respectivamente no se observó (figura 16).

Tal como se muestra en la tabla 8 y las figuras 17 a 25, cuando se trató con tiafenacilo o saflufenacilo, el gen CyPPO8 de tipo sivestre (de aquí en adelante representado por "Cy8 WT"; control) no presentó crecimiento a partir de 5  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, y los transformantes donde se introdujeron genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162L, V308M, P306A+V308L, P306L+V308L, F363M+P84L, y F363M+N362S respectivamente se observó crecimiento incluso en la concentración mínima de 25  $\mu$ M o concentraciones mayores (figuras 17 y 18). Cuando se trató con herbicida fomesafeno a base de difeniléter, Cy8 WT no presentó crecimiento a partir de 25  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, A162L, V308M, P306A+V308L, y P306L+V308L respectivamente se observó en las concentraciones de 25  $\mu$ M o más (figura 19). Cuando se trató con herbicida acifluorfenó a base de difeniléter, Cy8 WT no presentó crecimiento a partir de 50  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, y P306L+V308L respectivamente se observó en las concentraciones de 50  $\mu$ M o más (figura 20). Cuando se trató con flumioxazina, Cy8 WT no presentó crecimiento a partir de 5  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se

introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162L y V308M, respectivamente se observó en las concentraciones de 25  $\mu$ M o más (figura 21). Cuando se trató con herbicida sulfentrazona a base de triazolinonas, Cy8 WT presentó crecimiento únicamente hasta 25  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, y P306L+V308L respectivamente se observó en las concentraciones de 50  $\mu$ M o más (figura 22). Cuando se trató con pentoxazona o piraflufenetilo, Cy8 WT no presentó crecimiento a partir de 5  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, y P306L+V308L respectivamente se observó en la concentración máxima (200  $\mu$ M) (figuras 23 y 24). Cuando se trató con piraclonilo, Cy8 WT no presentó crecimiento a partir de 25  $\mu$ M de concentración de tratamiento con herbicida, pero el crecimiento de los transformantes donde se introdujeron los genes mutantes de F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, P306L+V308L respectivamente se observó en la concentración máxima (200  $\mu$ M) (figura 25).

#### **Ejemplo 4: Medición de actividad enzimática y valor IC<sub>50</sub> por herbicidas de PPO de tipo sivestre y variantes**

Se analizó la actividad enzimática de las variantes donde se mutaron los aminoácidos de determinadas posiciones de la proteína PPO con el fin de aumentar la tolerancia a los herbicidas y se realizó un ensayo de inhibición para los herbicidas inhibidores de PPO. Se confirmó que la proteína PPO tenía baja solubilidad en agua, pero que cuando la proteína PPO se fusiona con MBP (proteína de unión a maltosa) (MBP-PPO) es soluble al agua y se expresa de forma estable. Por lo tanto, las proteínas de tipo sivestre y variante que se expresaron en la forma de proteína de fusión con MBP se usaron en los experimentos de la presente (véase figura 26).

Para clonar los genes de tipo silvestre y los genes variantes de CyPPO2, CyPPO4 y CyPPO8 (véanse ejemplo 1 y ejemplo 2), se introdujeron dichos genes en el vector pMAL-c2X (véase figura 27) respectivamente y después se expresaron en BL21-CondonPlus (DE3) *E. coli* (CodonPlus).

5 Las *E. coli* transformadas se cultivaron en las siguientes condiciones para expresar los genes de PPO que se introdujeron:

Inducción: OD<sub>600</sub>=0,2, adición de IPTG hasta 0,3 mM de concentración final:

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

10 Tiempo de expresión: 16 horas;

Escala de cultivo: matraz 200 ml/1000 ml.

La lisis celular y la extracción de proteínas se realizó mediante el siguiente proceso en las células cultivadas:

15 Tampón de extracción: Tampón para columna (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 200 mM NaCl) 5 ml tampón/g célula;

Sonicación: SONICS&MATERIALS VCX130 (130 watts);

15 segundos encendido, 10 segundos apagado durante 5 min sobre hielo;

20 Centrifugación en condiciones de 4°C durante 20 minutos (20 000 g); y el sobrenadante que se obtuvo mediante centrifugación se diluyó en una relación de 1:6 con tampón para columna.

Se realizó el siguiente proceso de purificación de la proteína de PPO en un salón frío a 4°C. Se colocó resina de amilosa (New England Biolabs) en una columna de 1,5x15cm (Bio-Rad Econo Columns 1,5 x 10 cm, columna de cromatografía de vidrio, vol. máx.) y los extractos de la proteína obtenidos se cargaron en la columna  
25 con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón y se monitoró la cantidad de proteína en la solución de lavado. Cuando ya no se detectó más la proteína, se finalizó el lavado . A continuación se eluyó la proteína MBP-PPO con aproximadamente dos volúmenes de tampón de columna con 20 mM de maltosa. Se determinó la concentración de proteína de cada  
30 eluyente y la elución se detuvo cuando la proteína ya no se detectó más. Se

analizaron diez microlitros de cada fracción para cuantificar las proteínas y realizar el análisis SDS-PAGE. Las fracciones altamente puras de variantes de proteínas PPO (por ejemplo, CyPPO2-Y373M, CyPPO4-Y375M, CyPPO8-F363M) se tomaron para el ensayo enzimático.

5 El análisis SDS-PAGE de cada PPO se presenta en las figuras 28 a 30. En lo relativo al resultado que se presenta en la figura 28, se tomaron las proteínas CYPPO2 de tipo sivestre (elución 7, vía 2) y CyPPO2-Y373M (elución 5, vía 7) y se usaron para el análisis de la actividad enzimática.

En lo relativo al resultado que se presenta en la figura 29, se tomaron las  
10 proteínas CyPPO4 de tipo sivestre (elución 3, vía 2) y CyPPO4-Y375M (elución 3, vía 6) y se usaron para el análisis de la actividad enzimática.

En lo relativo al resultado que se presenta en la figura 30, se tomaron las proteínas CyPPO8 de tipo sivestre (elución 9, vía 3) y CyPPO8-F363M (elución 4, vía 6) y se usaron para el análisis de la actividad enzimática.

15 La actividad enzimática de la proteína de tipo sivestre purificada y las proteínas variantes de CyPPO2, CyPPO4 y CyPPO8 se midió a través del siguiente proceso.

El proceso general fue llevado a cabo en condiciones de oscuridad y bajo una corriente de nitrógeno. Una vez que el protoporfirinógeno IX, un sustrato de la  
20 proteína PPO, no se encontraba comercialmente disponible, se sintetizó químicamente en el laboratorio. Se disolvieron seis microgramos de protoporfirina IX en 20 ml de EtOH 20% (v/v) y se agitaron en condiciones de oscuridad durante 30 minutos. La solución de protoporfirina IX que se obtuvo se colocó en un tubo roscado de 15 ml en una cantidad de 800 µl, y se sometió a arrastre con gas nitrógeno  
25 durante 5 minutos. A la solución se le agregó 1 g de amalgama de sodio y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Se abrió la tapa para liberar el gas hidrógeno del tubo. Después se cerró la tapa y se incubó durante 3 minutos. La solución de protoporfirinógeno IX se filtró usando una jeringa y un filtro de membrana de celulosa. a 600 µl de la solución de protoporfirinógeno IX obtenida, se le agregaron  
30 300 µl de 2M MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico] para ajustar el pH a

8,0. Para determinar la actividad enzimática de la proteína PPO, se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición (en base a 10 ml de mezcla): 50 mM Tris-Cl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,04% (v/v) Tween 20; 40 mM glucosa (0,072 g); 5 unidades de glucosa oxidasa (16,6 mg); y 10 unidades de catalasa (1 µl).

5            Se colocaron doscientos microlitros 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 acoplada de glucosa oxidasa-catalasa. El aceite mineral depositó sobre la superficie para sellar la mezcla y a continuación se inició la reacción agregando el  
10            sustrato, la solución de protoporfirinógeno 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  
15            (durante la noche). A esta se agregó 2,7 N 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 sivestre obtenida y las variantes se  
20            presenta en las tablas 10 y 11.

              Se calcularon los valores de la constante Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de cada enzima para evaluar el estudio cinético de CyPPO2 y CyPPO8. Se midió la velocidad de reacción inicial donde a velocidad de reacción era proporcional a la concentración al variar la concentración del sustrato.  
25            La cantidad de protoporfirina IX que se produjo, que es un producto de la reacción enzimática se midió en el transcurso del tiempo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se calcularon los valores  $K_m$  y  $V_{max}$  con el programa de análisis cinético de enzimas de la ecuación Michaelis-Menten. Se usó AtPPO1 de tipo sivestre como control. El resultado se presenta en la Tabla 9.

30            **【Tabla 9】**

### Determinación de Km y Vmax de CyPPO2 y CyPPO8

|                                        | CyPPO2        | CyPPO8        | AtPPO1        |
|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Km( $\mu$ M)                           | 9,1 $\pm$ 0,5 | 7,7 $\pm$ 0,2 | 9,6 $\pm$ 1,8 |
| Vmax<br>( $\mu$ M mg proteína-1 min-1) | 285 $\pm$ 15  | 305 $\pm$ 10  | 135 $\pm$ 19  |

A partir de los resultados se concluye que los valores Km de CyPPO2 y CyPPO8 fueron menores que los de AtPPO1, lo que confirma que la afinidad entre la enzima y el sustrato era mejor, mientras que los valores Vmax de CyPPO2 y CyPPO8 eran más de dos veces más altos que los de AtPPO1. En conclusión, las proteínas PPO de CyPPO2 y CyPPO8 presentan una mejor capacidad como enzima PPO que AtPPO1 derivado de plantas.

Además se midió la concentración de los herbicidas inhibidores de PPO que inhibe la actividad enzimática de PPO de cada PPO de tipo silvestre y variantes en un 50% (IC<sub>50</sub>) para cada herbicida. Las concentraciones finales de cada herbicida fueron las siguientes:

- Tiafenacilo, saflufenacilo, fomesafeno, butafenacilo, flumioxazina y sulfentrazone: 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 nM

Se determinó IC<sub>50</sub> por cálculos a partir de la inhibición de la actividad enzimática medida a cada una de las concentraciones de pesticidas anteriores.

Los valores IC<sub>50</sub> de los distintos herbicidas se presentan en las tablas 10 y 11 siguientes.

**【Tabla 10】**

| CyPPO2<br>No. | Sitio de mutación | Actividad (%) | IC <sub>50</sub> (nM) |               |            |              |              |               |
|---------------|-------------------|---------------|-----------------------|---------------|------------|--------------|--------------|---------------|
|               |                   |               | Tiafenacilo           | Saflufenacilo | Fomesafeno | Butafenacilo | Flumioxazina | Sulfentrazone |
|               | WT                | 100           | 25                    | 50            | 182        | 13           | 122          | NT            |
| 1             | Y373M             | 90            | 250                   | 5,000         | 395        | 63           | 136          | NT            |
| 2             | Y373I             | 75            | 639                   | 5,000         | 70         | 1516         | 464          | NT            |
| 3             | Y373L             | 44            | 300                   | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 4             | Y373V             | 35            | 525                   | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 5             | Y373C             | 39            | 225                   | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 6             | Y373T             | 10            | 2500                  | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 7             | A175L             | 41            | 230                   | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 8             | S63T+Y373M        | 90            | 246                   | NT            | NT         | NT           | NT           | NT            |
| 9             | R92A+             | 50            | 219                   | NT            | NT         | NT           | 310          | NT            |

|    |                 |    |       |       |       |       |       |       |
|----|-----------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | Y373M           |    |       |       |       |       |       |       |
| 10 | V173S+<br>Y373M | 80 | 430   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 11 | V173S+<br>Y373I | 25 | 610   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 12 | V173S+<br>Y373L | 40 | 530   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 13 | V173S+<br>Y373V | 10 | 1,000 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 14 | V173C+<br>Y373M | 53 | 680   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 15 | V173C+<br>Y373I | 28 | 915   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 16 | V173T+<br>Y373M | 15 | 543   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 17 | V173T+<br>Y373I | 25 | 1,500 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 18 | V173L+<br>Y373M | 83 | 290   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 19 | A175L+<br>Y373M | 62 | 4,500 | 5,000 | 1,720 | 4,000 | 5,000 | 5,000 |
| 20 | A175L+<br>Y373I | 15 | 2,000 | 5,000 | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 21 | A175C+<br>Y373M | 83 | 3,700 | 5,000 | 770   | 2,500 | 372   | 5,000 |
| 22 | A175C+<br>Y373I | 31 | 2,000 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 23 | A175I+<br>Y373M | 52 | 2,500 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 24 | E228A+<br>Y373M | 85 | 214   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 25 | L229F+<br>Y373T | 10 | 1,800 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 26 | V318M+<br>Y373M | 73 | 456   | 5,000 | 523   | 708   | 210   | 3776  |
| 27 | V318M+<br>Y373I | 50 | 2,765 | 5,000 | 145   | 1,232 | 1,021 | 5,000 |
| 28 | V318M+<br>Y373V | 42 | 2,140 | 5,000 | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 29 | V318T+<br>Y373I | 25 | 1,500 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 30 | L340I+<br>Y373M | 80 | 259   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 31 | L340I+<br>Y373I | 85 | 584   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 32 | L340V+<br>Y373M | 80 | 257   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 33 | G351A+<br>Y373M | 23 | 706   | 5,000 | 300   | 36    | NT    | NT    |
| 34 | I353T+<br>Y373M | 32 | 1,152 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 35 | I353T+<br>Y373I | 20 | 1,300 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 36 | I353T+          | 10 | 3,000 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |

|            |                           |     |       |       |       |       |       |       |
|------------|---------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | Y373L                     |     |       |       |       |       |       |       |
| 37         | I353L+<br>Y373M           | 80  | 271   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 38         | I353V+<br>Y373M           | 63  | 445   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 39         | I353C+<br>Y373M           | 12  | 550   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 40         | S63T+<br>V173S+<br>Y373M  | 60  | 430   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 41         | S63T+<br>V173S+<br>Y373I  | 60  | 427   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 42         | S63T+<br>I353T+<br>Y373M  | 15  | 278   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 43         | S63T+<br>I353T+<br>Y373I  | 5   | 1200  | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 44         | V173S+<br>V318M+<br>Y373M | 5   | 3,000 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 45         | V173T+<br>L340I+<br>Y373M | 50  | 518   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 46         | V173S<br>+A175C<br>+Y373M | 38  | 5,000 | 5,000 | 758   | 2,591 | 5,000 | 5,000 |
| 47         | A175C+<br>V318M+<br>Y373M | 47  | 3,793 | 5,000 | 2,033 | 1,475 | 419   | 5,000 |
| 48         | A175L+<br>V318M+<br>Y373M | 40  | 3,100 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 49         | A175C+<br>I353L+<br>Y373M | 5   | 1,900 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 50         | A175C+<br>I353V+<br>Y373M | 69  | 2,310 | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 51         | R92A                      | 66  | 125   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 52         | F169A                     | 72  | 57    | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 53         | V173C                     | 68  | 79    | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 54         | A175C                     | 86  | 100   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 55         | A175L                     | 68  | 325   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 56         | V318M                     | 76  | 140   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 57         | F337V                     | 20  | 148   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 58         | L340T                     | 18  | 56    | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| 59         | I353T                     | 40  | 162   | NT    | NT    | NT    | NT    | NT    |
| CyPP<br>O4 |                           |     |       |       |       |       |       |       |
|            | WT                        | 100 | 22    | 33    | 28    | 10    | NT    | NT    |
| 1          | Y375M                     | 95  | 124   | 5,000 | 133   | 39    | NT    | NT    |

(NT: no evaluado)

【Tabla 11】

| CyP<br>PO8<br>No. | Sitio de<br>mutación        | Acti<br>vida<br>d<br>(%) | IC <sub>50</sub> (nM) |                   |                |                  |                  |                   |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------|
|                   |                             |                          | Tiafenacil<br>o       | Saflufena<br>cilo | Fomesafe<br>no | Butafenac<br>ilo | Flumioxa<br>zina | Sulfentra<br>zona |
|                   | WT                          | 100                      | 4                     | 11                | 13             | 2,8              | NT               | NT                |
| 1                 | F363M                       | 100                      | 183                   | 5,000             | 163            | 30               | 266              | NT                |
| 2                 | F363C                       | 17                       | 36                    | 500               | 38             | 53               | NT               | NT                |
| 3                 | F363V                       | 15                       | 2,000                 | 5,000             | 1,500          | 250              | 2,500            | NT                |
| 4                 | F363L                       | 54                       | 322                   | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 5                 | F363I                       | 62                       | 698                   | 5,000             | 133            | NT               | 1100             | NT                |
| 6                 | F363T                       | 5                        | 3,000                 | 5,000             | 1,500          | NT               | 2,500            | NT                |
| 7                 | R85A +<br>F363M             | 62                       | 700                   | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 8                 | R85A +<br>F363I             | 40                       | 2,350                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 9                 | A162L +<br>F363M            | 17                       | 5,000                 | NT                | NT             | NT               | 5,000            | NT                |
| 10                | A162C +<br>F363M            | 87                       | 2,500                 | 5,000             | NT             | NT               | 1,166            | NT                |
| 11                | V160S +<br>F363M            | 58                       | 500                   | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 12                | V160S +<br>F363I            | 26                       | 2,280                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 13                | V308M +<br>F363M            | 81                       | 1,017                 | 5,000             | NT             | NT               | 210              | NT                |
| 14                | V308M +<br>F363I            | 29                       | 1,810                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 15                | I343T +<br>F363M            | 10                       | 2,100                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 16                | I343V +<br>F363M            | 44                       | 288                   | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 17                | R85A +<br>V308M +<br>F363M  | 39                       | 2,347                 | 5,000             | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 18                | V160S +<br>V308M +<br>F363I | 5                        | 4,000                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 19                | A162C +<br>F363I            | 29                       | 2,450                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 20                | A162C +<br>F363L            | 6                        | 5,000                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 21                | R85A +<br>A162L +<br>F363M  | 11                       | 5,000                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 22                | R85A +<br>A162L +<br>F363I  | 15                       | 1,061                 | NT                | NT             | NT               | NT               | NT                |
| 23                | R85A +                      | 19                       | 5,000                 | 5,000             | 5,000          | 4,310            | 2,700            | 5,000             |

|    |                       |    |       |       |     |       |       |       |
|----|-----------------------|----|-------|-------|-----|-------|-------|-------|
|    | A162C + F363M         |    |       |       |     |       |       |       |
| 24 | R85A + A162C + F363I  | 16 | 5,000 | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 25 | A162C + V308M + F363M | 45 | 3,580 | 5,000 | 420 | 2500  | 697   | 5,000 |
| 26 | A162C + V308L + F363M | 53 | 2,041 | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 27 | R85C + F363M          | 28 | 2,500 | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 28 | R85H + F363M          | 30 | 622   | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 29 | R85L + F363M          | 19 | 892   | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 30 | R85T + F363M          | 24 | 1,356 | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 31 | R85V + F363M          | 18 | 875   | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 32 | A162L + Q179G + F363M | 39 | 5,000 | 5,000 | 630 | 4,000 | 5,000 | 5,000 |
| 33 | R85A                  | 98 | 80    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 34 | F156A                 | 85 | 28    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 35 | V160C                 | 80 | 44    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 36 | A162C                 | 76 | 75    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 37 | A162L                 | 82 | 219   | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 38 | V308M                 | 93 | 76    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 39 | F327V                 | 22 | 81    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 40 | L330T                 | 27 | 69    | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |
| 41 | I343T                 | 18 | 365   | NT    | NT  | NT    | NT    | NT    |

(NT: no evaluado)

Tal como se muestra en las Tablas 10 y 11, se demostró que en el caso de las variantes de proteínas CyPPO, los valores  $IC_{50}$  de cada herbicida aumentaron significativamente en comparación con el tipo sivestre. Tales resultados muestran que la tolerancia a los herbicidas aumentó por la mutación de aminoácidos en determinadas posiciones de la proteína PPO. Aunque los datos de la presente muestran que las variantes de proteínas CyPPO tienen una menor actividad enzimática en comparación con el tipo sivestre, esto 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 producidas en *E. coli* son hidrofílicas y contienen una MBP como compañera de fusión. Por lo tanto, cuando las variantes de PPO se ensamblen y expresen de forma adecuada en los cloroplastos de las plantas, la actividad enzimática no se verá afectada drásticamente.

### **Ejemplo 5. Generación de transformantes de *A. thaliana* usando variantes de CyPPO y prueba de tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO**

#### **5-1. Construcción de vectores transformantes de *A. thaliana* y generación de transformantes de *A. thaliana***

*A. thaliana* fue transformada con vectores binarios de cada gen de mutación de aminoácidos de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8, que contenían cada uno un marco abierto de lectura (ORF) de cada gen de mutación de aminoácidos de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8 y todos un ORF de un marcador seleccionable, un gen Bar (gen tolerante a glufosinato). La planta transgénica se analizó para determinar la tolerancia cruzada respecto del 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 las variantes de CyPPO2, variantes de CyPPO4 y variantes de CyPPO8 respectivamente en una planta se usó un promotor CaMV35S y un terminador NOS. Además, con el fin de transitar la proteína al cloroplasto se insertó un péptido de tránsito (TP) del gen AtPPO1 (SEQ ID NO: 8) frente al 5' del gen insertado usando enzimas de restricción XbaI y XhoI. Adicionalmente, 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 SacI. La región del péptido de tránsito que se insertó en el vector está representada por la SEQ ID NO: 10 y la secuencia de etiqueta HA que se insertó está representada por la SEQ ID NO: 11. Se insertaron genes de codificación de variantes de CyPPO4, variantes de CyPPO4 o variantes de CyPPO8 entre el péptido de tránsito y la etiqueta HA usando

enzimas de restricción XhoI y BamHI. El terminador NOS se insertó después de la etiqueta HA, terminando así la transcripción del gen de PPO. Un diagrama esquemático del vector binario de transformación de la planta se presenta en la figura 31.

5           Cada vector construido se usó para la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediante un método de congelación-descongelación. Para preparar la célula competente de *Agrobacterium* 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. La solución de cultivo se vertió en 200 ml de  
10 medio LB y después se cultivó en condiciones de 30 °C y 200 rpm durante 3~4 y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos. El granulado celular se lavó con agua destilada estéril y se volvió a suspender en 20 ml de medio LB. 200µl de alícuotas congeladas instantáneamente con nitrógeno líquido se almacenaron en un congelador profundo.

Cada *Agrobacterium* transformada se cultivó en un medio antibiótico (LB  
15 agar con espectinomicina) y se cribó. La colonia cribada se cultivó en líquido en un caldo de LB. Después de recuperar la célula de *Agrobacterium* de la solución de cultivo, se volvió a suspender en una solución de 5% (p/v) de sucrosa, 0,05% (p/v) de Silwet L-77 (empresa Momentive Performance Materials) en una absorbancia (OD<sub>600</sub>) de 0,8. *A. thaliana* de tipo sivestre (ecotipo Col-0) fue transformada  
20 mediante el método de sumergimiento floral y a continuación se recolectó la semilla (T<sub>0</sub>) 1~2 meses después.

Se usó el gen Bar en el vector binario para analizar los transformantes individuales. Las semillas T<sub>0</sub> obtenidas se sembraron en medio 1/2 MS (2,25 g/l sal de MS, 10 g/l sucrosa, 7 g/l agar) complementadas con 25 µM de glufosinato y las  
25 plantas sobrevivientes se seleccionaron después de 7 días del sembrado y se trasplantaron a tierra y se cultivaron para obtener plantas T<sub>1</sub>.

Para analizar la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO de las plantas transgénicas, se pulverizó plantas de 4 semanas de forma uniforme con 100 ml de 1uM solución de tiafenacilo (0,05% Silwet L-77) cada 40 x 60 cm de superficie (0,24  
30 m<sup>2</sup>). Encuanto *A. thaliana* de tipo sivestre (ecotipo Col-0) murió completamente en

un período de 7 días después del tratamiento, ningún transformante presentó daños a causa del tratamiento con herbicida inhibidor de PPO.

Las semillas T<sub>2</sub> se sembraron en medio 1/2 MS (2,25 g/l sal de MS, 10 g/l sucrosa, 7 g/l agar) complementado con 25 µM de glufosinato y después de 1  
5 semana, las plantas que sobrevivieron se trasplantaron a la tierra.

Se usó *A. thaliana* de tipo sivestre PPO1 (AtPPO1 de tipo sivestre) como control negativo con sensibilidad a los herbicidas inhibidores de PPO (número de acceso de GenBank AX084732 (la secuencia de nucleótidos del gen está representada por la SEQ ID NO. 8 y la secuencia de aminoácidos está representada  
10 por la SEQ ID NO: 7)). Se usó AtPPO1 mutante con sustituciones de aminoácidos de Y426M (el aminoácido 426o, tirosina se sustituyó con metionina) y S305L (el aminoácido 305o, serina se sustituyó con leucina) en la secuencia de aminoácidos de tipo sivestre AtPPO1 como control positivo (la secuencia de aminoácidos estaba representada por laSEQ ID NO. 9) (Li et ál. Development of protoporphyrinogen  
15 oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiol. 2003 133:736-747).

Las variantes de CyPPO que se usaron en la generación de los transformantes de *A. thaliana* figuran en la lista de la Tabla 12:

**【Tabla 12】**

| Mutación de CyPPO2 | Línea No. | Mutación de CyPPO4 | Línea No. | Mutación de CyPPO8    | Línea No. |
|--------------------|-----------|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| Y373M              | 32        | Y375M              | 14        | F363M                 | 22        |
|                    | 34        |                    | 31        |                       | 51        |
|                    | 38        |                    |           |                       | 52        |
|                    | 39        |                    |           | F363V                 | 1         |
|                    | 40        |                    |           |                       | 18        |
| Y373V              | 34        |                    |           | F363L                 | 1         |
| Y373I              | 23        |                    |           |                       | 33        |
|                    | 34        |                    |           | A162L                 | 1         |
| Y373L              | 23        |                    |           |                       | 5         |
|                    | 43        |                    |           | A162C + V308M + F363M | 46        |

|                   |    |  |  |  |    |
|-------------------|----|--|--|--|----|
| Y373C             | 40 |  |  |  | 48 |
| V318M+Y373I       | 1  |  |  |  |    |
|                   | 3  |  |  |  |    |
| V173S+A175C+Y373M | 3  |  |  |  |    |
|                   | 4  |  |  |  |    |
|                   | 51 |  |  |  |    |
|                   | 72 |  |  |  |    |
|                   | 84 |  |  |  |    |
| A175C+V318M+Y373M | 4  |  |  |  |    |
|                   | 8  |  |  |  |    |

## 5-2. Germinación de las semillas

La tolerancia de *A. thaliana* al tiafenacilo fue confirmada usando semillas T<sub>2</sub> que sobrevivieron a la pulverización con 1 µM de tiafenacilo en la generación T<sub>1</sub>. En los transformantes se había introducido el mutante Y373M de CyPPO2, el mutante Y375M de CyPPO4, o el mutante F363M de CyPPO8 (transformante de CyPPO2 Y373M, transformante de CyPPO4 Y375M y transformante de CyPPO8 F363M respectivamente). La tolerancia al glufosinato de los transformantes se confirmó sembrando semillas de *A. thaliana* en un medio suplementado con glufosinato (50 µM PPT).

El resultado se presenta en la figura 32.

Las semillas identificadas con los números 32, 34, y 28 de los transformantes de CyPPO2 Y373M germinaron, los números 14 y 31 de los transformantes de CyPPO4 Y375M y los números 22, 51 y 52 de los transformantes de CyPPO8 F363M germinaron incluso en medios 1/2 MS con 1 µM o más de concentración de tiafenacilo. Además, las semillas de *A. thaliana* de tipo sivestre (Col-0) que se usaron como control negativo no germinaron en el medio 1/2 MS con 70 nM de tiafenacilo y los transformantes de AtPPO1 mutantes (AtPPO1 SLYM) que se usaron como control positivo germinaron incluso en medios 1/2 MS con 1 µM de tiafenacilo.

**5-3. Confirmación de la relación de segregación del rasgo de tolerancia en las semillas de la generación T<sub>2</sub>**

Con el fin de determinar la herencia, se analizaron las relaciones de segregación con semillas T<sub>2</sub>. Los resultados se presentan en las tablas 13 a 15.

5 **【Tabla 13】**

| Transformantes de CyPPO2 (T <sub>2</sub> ) |           |                         |
|--------------------------------------------|-----------|-------------------------|
| Mutación                                   | Línea No. | Relación de segregación |
| Y373M                                      | 32        | 2,53:1                  |
|                                            | 34        | 3,21:1                  |
|                                            | 38        | 3,18:1                  |
|                                            | 39        | 3,17:1                  |
| Y373V                                      | 34        | 3,13:1                  |
| Y373I                                      | 23        | 2,70:1                  |
|                                            | 34        | 3,55:1                  |
| Y373L                                      | 5         | 2,7:1                   |
|                                            | 23        | 2,96:1                  |
|                                            | 43        | 3,3:1                   |
| Y373C                                      | 40        | 3,32:1                  |
| V318M+Y373I                                | 1         | 2,95:1                  |
|                                            | 3         | 2,95:1                  |
| V173S+A175C+Y373M                          | 3         | 3,27:1                  |
|                                            | 4         | 2,5:1                   |
|                                            | 72        | 3,08:1                  |
|                                            | 84        | 2,95:1                  |
|                                            | 51        | 3,32:1                  |
| A175C+V318M+Y373M                          | 4         | 2,8:1                   |
|                                            | 8         | 2,57:1                  |

**【Tabla 14】**

| Transformantes de CyPPO4 (T <sub>2</sub> ) |           |                         |
|--------------------------------------------|-----------|-------------------------|
| Mutación                                   | Línea No. | Relación de segregación |
| Y375M                                      | 14        | 2,53:1                  |
|                                            | 31        | 3:1                     |

**【Tabla 15】**

| Transformantes de CyPPO5 (T <sub>2</sub> ) |           |                         |
|--------------------------------------------|-----------|-------------------------|
| Mutación                                   | Línea No. | Relación de segregación |

|                          |    |        |
|--------------------------|----|--------|
| F363M                    | 22 | 3,08:1 |
|                          | 51 | 3,54:1 |
|                          | 52 | 3,04:1 |
| F363V                    | 1  | 2,52:1 |
|                          | 18 | 2,57:1 |
| F363L                    | 1  | 2,54:1 |
|                          | 33 | 2,77:1 |
| A162L                    | 1  | 2,5:1  |
|                          | 5  | 3,5:1  |
| A162C + V308M +<br>F363M | 46 | 2,6:1  |
|                          | 48 | 2,59:1 |

Tal como se muestra en la tabla 13, en el caso del transformante al que se le insertó el gen mutante de CyPPO2, las líneas número 32, 34, 38 y 39 de la variante Y373M, la línea número 34 de la variante Y373V, las líneas número 23 y 34 de la variante Y373I, las líneas número 23 y 43 de la variante Y373L, la línea número 40 de la variante Y373C, las líneas número 1 y 3 de la variante V318M+Y373I, las líneas número 3, 4, 72, 84 y 51 de la variante V173S+A175C+Y373M , y las líneas número 4 y 8 de la variante A175C+V318M+Y373M presentaron aproximadamente 3:1 de tolerancia en comparación con los individuos susceptibles y por lo tanto se demostró que una única copia de transgenes se integró al genoma de *A. thaliana* de acuerdo con la ley de Mendel.

Tal como se muestra en la tabla 14, en el caso del transformante al que se le insertó el gen mutante de CyPPO4, las líneas número 14 y 31 de la variante Y375M presentaron aproximadamente 3:1 de tolerancia en comparación con los individuos susceptibles y por lo tanto se demostró que una única copia de transgenes se integró al genoma de *A. thaliana*.

Tal como se muestra en la tabla 15, en el caso del transformante al que se le insertó el gen mutante de CyPPO8, las líneas número 22, 51 y 52 de la variante F363M, las líneas número 1 y 18 de la variante F363V, las líneas número 1 y número 33 de la variante F363L, las líneas número 1 y 5 de la variante A162L, y las líneas número 46 y 48 de A162C+V308M+F363M presentaron aproximadamente 3:1 de

tolerancia en comparación con los individuos susceptibles, y por lo tanto se demostró que una única copia de transgenes se integró al genoma de *A. thaliana*.

#### **5-4. Análisis de la expresión de la proteína CyPPO en *A. thaliana***

##### **5 tolerante a los herbicidas (T<sub>2</sub>)**

La expresión de CyPPO2 Y373M, CyPPO4 Y375M o CyPPO8 F363M a nivel de proteína fue analizada para determinar la expresión de los genes introducidos. Después de moler aproximadamente 100 mg de hojas del transformante de *A. thaliana* T<sub>2</sub> junto usando nitrógeno líquido, fue realizada una extracción de proteínas agregando 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). Se realizó transferencia western usando la proteína extraída. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) y a continuación se realizó la transferencia western usando un anticuerpo anti-Ha (Santacruz) y un anticuerpo anti-actina (control de carga, comparación de la cantidad de proteína experimental; Abcam).

El resultado se presenta en la figura 33.

El nivel de expresión de la proteína PPO mutante fue similar en el transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de CyPPO8 F363M, mientras que CyPPO4 Y375M presentó un nivel bajo de expresión de la variante de PPO.

Las líneas de los transformantes fueron desarrolladas una generación más (generación T<sub>3</sub>) y se confirmó que cada línea de transformantes tenía tolerancia a los herbicidas (véase ejemplo 5-5). Esto indica que la expresión de los genes que se introdujeron se mantiene a medida que avanza la generación y otorgan tolerancia a los herbicidas.

#### **5-5. Verificación de la tolerancia a los herbicidas de *A. thaliana* transformada**

Con el fin de demostrar la tolerancia a los herbicidas de los genes que codifican las variantes de aminoácidos de CyPPO2, CyPPO4 y CyPPO8 en una planta, se evaluó

la tolerancia a los herbicidas de la generación T<sub>2</sub> o la generación T<sub>3</sub>. Todas las pruebas de pulverización se realizaron justo antes del espigado, aproximadamente 4 semanas después del trasplante. Se pulverizaron cien mililitros de herbicidas con la solución (0,05% Silwet L-77) por 40 x 60 cm de superficie (0,24 m<sup>2</sup>)

5 El resultado que se observó al séptimo día tras la pulverización en la variante Y373M de CyPPO2, la variante Y375M de CyPPO4 y la variante F363M de CyPPO8 se presenta en la figura 34 (resultado del tratamiento con tiafenacilo), figura 35 (resultado del tratamiento con saflufenacilo), y la figura 36 (resultado del tratamiento con fomesafeno). El tipo silvestre mostrado en Col-0 (control negativo) 10 murió, mientras que AtPPO1 SLYM (control positivo) y los grupos experimentales, las líneas número 38, 39 y 34 del transformante Y373M de CyPPO2 y las líneas número 22, 51 y 52 del transformante F363M de CyPPO8 presentaron un crecimiento continuo en presencia de tiafenacilo 5 µM, saflufenacilo 5 µM como fomesafeno 5 µM. La línea número 14 del transformante Y375M de CyPPO4 15 presentó un crecimiento continuo con saflufenacilo 5 µM y fomesafeno 5 µM.

Se trataron transformantes T<sub>3</sub> de los genes mutantes Y373C, Y373I, Y373L, Y373M y Y373V de CyPPO2 con 25 µM de tiafenacilo o 75 µM de saflufenacilo. Se pulverizaron 25 µM de tiafenacilo o 100 µM de saflufenacilo a un transformante T<sub>3</sub> de los genes mutantes F360L, F360V y A162L de CyPPO8.

20 Se pulverizó 5 µM de tiafenacilo a un transformante T<sub>2</sub> de genes mutantes V318M+Y373I, V173S+A175C+Y373M y A175C+V318M+Y373M de CyPPO2 Se pulverizó 10 µM de tiafenacilo a la generación T<sub>2</sub> del transformante del gen mutante de A162C+V308M+F363M de CyPPO8.

25 El resultado que se observó en el séptimo día después de la pulverización se presenta en la tabla 16 (índice de daño) y la figura 37 (variante CyPPO2; generación T<sub>3</sub> (superior / inferior)/ generación T<sub>2</sub> (medio)) y la figura 38 (variante CyPPO8; generación T<sub>3</sub> (superior / medio)/ generación T<sub>2</sub> (inferior)).

**【Tabla 16】**

Índice de daño

|  |               |             |               |
|--|---------------|-------------|---------------|
|  | Línea No.     | Tiafenacilo | Saflufenacilo |
|  | Concentración | 5 µM        | 5 µM          |

|                                       |       |       |        |
|---------------------------------------|-------|-------|--------|
| Col-0 (tipo silvestre)                |       | 5     | 5      |
| CyPPO2                                |       | 5     | NT     |
| Variantes de CyPPO2 (T <sub>3</sub> ) |       | 25 µM | 75 µM  |
| Y373M                                 | 40-4  | 2,5   | NT     |
| Y373C                                 | 40-3  | 2     | 1,5    |
| Y373I                                 | 23-2  | 0     | 1      |
|                                       | 34-2  | 0     | 0,75   |
| Y373L                                 | 23-9  | 1,5   | 1,6    |
|                                       | 43-1  | 1,5   | 3      |
| Y373V                                 | 34-10 | 2     | 2      |
| Variantes de CyPPO2 (T <sub>2</sub> ) |       | 5 µM  | 75 µM  |
| V318M+Y373I                           | 1     | 0     | NT     |
|                                       | 3     | 0     | NT     |
| V173S+A175C+Y373M                     | 3     | 1,5   | NT     |
|                                       | 4     | 2     | NT     |
|                                       | 51    | 2     | NT     |
|                                       | 72    | 2     | NT     |
|                                       | 84    | 3     | NT     |
| A175C+V318M+Y373M                     | 4     | 0     | NT     |
|                                       | 8     | 3     | NT     |
| CyPPO8                                |       | 5     | 5      |
| Variantes de CyPPO8 (T <sub>3</sub> ) |       | 5 µM  | 75 µM  |
| F363M                                 | 22    | 0     | NT     |
|                                       | 51    | 0     | NT     |
|                                       | 52    | 0     | NT     |
|                                       |       | 25 µM | 100 µM |
| F363L                                 | 33-7  | 1,5   | 2,5    |
|                                       | 1-3   | 2,5   | 1,5    |
| F363V                                 | 1-7   | 0,5   | 0      |
|                                       | 18-1  | 0,5   | 0      |
| A162L                                 | 1-6   | 3,4   | 4      |
|                                       | 5-4   | 3,4   | 3,8    |
|                                       | 5-7   | 3,9   | 3,8    |
| Variantes de CyPPO8 (T <sub>2</sub> ) |       | 10 µM | 100 µM |
| A162C + V308M + F363M                 | 46    | 1     | NT     |
|                                       | 48    | 1     | NT     |
| Variantes de CyPPO4                   |       | 5µM   | 5µM    |
| Y375M                                 | 14    | 4     | 2      |

NT: No se probó

El índice de daño de la Tabla 16 se evaluó según los criterios de la tabla 17 que sigue (esto se aplicó de igual forma al índice de daño que se proporcionó en el

contexto):

【Tabla 17】

| Índice de daño | Síntoma                                               |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| 0              | Sin daño                                              |
| 1              | Extremo seco de la hoja                               |
| 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.                       |

Tal como se muestra en la tabla 16 y las figuras 37, todos los transformantes de las variantes de CyPPO2 crecieron respectivamente de forma continua con no sólo 5  $\mu$ M sino también 25  $\mu$ M de tiafenacilo.

Tal como se muestra en la tabla 16 y las figuras 38, los transformantes de cada variante de CyPPO8 crecieron de forma continua no solo con 10  $\mu$ M, sino también con 25  $\mu$ M de tiafenacilo y crecieron de forma continua con 100  $\mu$ M de saflufenacilo.

Además, el nivel de tolerancia de los transformantes ( $T_3$ ) en los cuales se había introducido CyPPO2 Y373I CyPPO8 F363V respectivamente se confirmó en cada uno con 50  $\mu$ M de herbicidas (flumioxazina, sulfentrazona, tiafenacilo o saflufenacilo). AtPPO1 SLYM se usó como grupo de control de la tolerancia (control positivo). Tiafenacilo, saflufenacilo, flumioxazina o sulfentrazona fueron administrados con una concentración de 50  $\mu$ M respectivamente y después de 7 días se evaluó el índice de daño. El resultado se presenta en la figura 45 y Tabla 18. A modo de referencia, el peso molecular (MW) de tiafenacilo es 511,87, y el peso molecular de saflufenacilo es 500,85, y el peso molecular de flumioxazina es 354,34 y el peso molecular de sulfentrazona es 387,18. Se pulverizó cada herbicida en una concentración de 50  $\mu$ M de forma uniforme con 100 ml en una superficie de 40 x 60 cm (0,24m<sup>2</sup>). 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, respectivamente.

【Tabla 18】

5 Índice de daño

|               | AtPPO1<br>SLYM | CyPPO8<br>F363V | CyPPO2<br>Y373I |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Tiafenacilo   | 4              | 2               | 2               |
| Saflufenacilo | 0-1            | 0-1             | 0-1             |
| Flumioxazina  | 4-5            | 2               | 3               |
| Sulfentrazona | 0-1            | 0-1             | 0-1             |

Tal como se muestra en la figura 45 y la tabla 18, la tolerancia de los transformantes de genes mutantes era similar o mayor en comparación con la de AtPPO1 SLYM , conocida por su tolerancia a los herbicidas.

10 Mientras que *A. thaliana* de tipo silvestre murió después de un tratamiento con 0,8  $\mu$ M de tiafenacilo, los transformantes mutantes de PPO presentaron crecimiento continuo en 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 25  $\mu$ M de tratamiento con tiafenacilo.

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*.

15

## 5-6. Confirmación de la estabilidad de los transgénicos durante el paso por generaciones

20 Este ensayo tiene como fin confirmar que los genes que se introdujeron en *A. thaliana* se heredaron y se expresaron de forma estable incluso con el avance de las generaciones.

25 Los transformantes mutante Y373I de CyPPO2 y mutante F363V de CyPPO8 fueron desarrollados hasta la generación T<sub>4</sub>, o T<sub>5</sub> de la siguiente forma; las líneas T<sub>3</sub> 23-2, 23-7, 34-2 de CyPPO2 Y373I y 1-7, 18-1, 18-7 de CyPPO8 F363V. La tolerancia a los herbicidas se mantuvo a través de las generaciones T<sub>3</sub> a T<sub>5</sub> de cada línea, lo que indica la estabilidad del transgén a lo largo de las generaciones.

Específicamente se trataron las líneas T<sub>4</sub> o T<sub>5</sub> con 15  $\mu$ M de tiafenacilo o

150  $\mu$ M de saflufenacilo y después de 7 días del tratamiento con herbicida se evaluó el daño. El resultado se presenta en la figura 46 (línea T<sub>4</sub>) y la figura 47 (línea T<sub>5</sub>).

Además, se realizó la transferencia de western para confirmar la expresión de proteínas. Las proteínas se extrajeron de los transformantes. Después de 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. Tras someter la proteína extraída a electroforesis, fue transferida a una membrana de PVDF y le fue realizada transferencia western con anticuerpo anti-HA (Santacruz). Se detectaron las proteínas que se expresaron en el transformante. El resultado se presenta en la figura 48 (línea T<sub>4</sub>) y la figura 49 (línea T<sub>5</sub>).

Tal como se muestra en la figura 46 a la figura 49, la tolerancia a los herbicidas de todas las generaciones de T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> se mantuvo y también se confirmó la expresión de la proteína PPO. Específicamente, si bien Col-0 (control negativo) murió completamente cuando se trató con 15  $\mu$ M de tiafenacilo o 150  $\mu$ M de saflufenacilo, los transformantes T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> se mantuvieron sin daño (índice de daño 0). A modo de referencia, cuando se trató con 25  $\mu$ M de tiafenacilo o 75  $\mu$ M de saflufenacilo en la generación T<sub>3</sub>, el nivel del índice de daño fue 0~1.

## **Ejemplo 6. Generación de transformantes de arroz usando variantes de CyPPO y prueba de tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO**

### **6-1. Construcción del vector de transformación de arroz y generación de los transformantes de arroz**

Fueron construídos vectores binarios de cada gen de mutación de aminoácidos de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8, conteniendo cada uno un marco abierto de lectura (ORF) de cada gen de mutación de aminoácidos de CyPPO2, CyPPO4 o CyPPO8 y todos un ORF de gen Bar (gen tolerante a glufosinato) gen Bar y fueron usados para la transformación de arroz. Cada gen se clonó en el vector pCAMBIA3301 (véase la figura 39). Se usó el promotor CaMV 35S para la expresión del gen Bar y el terminador 35S para la terminación de la transcripción.

Con el fin de expresar genes mutantes de CyPPO2 o CyPPO8 en una planta, se usó el promotor de ubiquitina de un maíz y el terminador NOS. Además, se fusionó el péptido de tránsito (TP) de AtPPO1 en la región N-terminal del mutante de CyPPO2 o CyPPO8. Cada vector construido fue usado para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Takara) mediante un método de choque eléctrico.

La *Agrobacterium* transformada se usó para transformar arroz Dongjin (cultivar de tipo sivestre). Después de eliminar la cáscara de la semilla del arroz Dongjin, desinfectarla y cultivarla en oscuridad en medio N6D a 32 °C durante 5 días, las semillas de arroz se mezclaron con la solución de *Agrobacterium* transformada y después se trasplantaron sobre medio 2N6-AS100. Se incubó a 28 °C durante 1 día a la oscuridad y después se incubó a 23,5 °C durante 4 días en la oscuridad. Las semillas se incubaron en medio N6D cf500 ppt4 complementado con concentración apropiada de fosfinotricina (Duchefa) a 28 °C durante 10 días a la luz y los callos transformados se seleccionaron entre las semillas infectadas. Los callos seleccionados se pasaron a medio REIII cf500 ppt4 complementado con una concentración apropiada de fosfinotricina (Duchefa), de esta forma induciendo una planta.

La composición del medio que se usó figura en la tabla 19:

20 **【Tabla 19】**

| Nombre del medio | Ingrediente                                  | Uso         |
|------------------|----------------------------------------------|-------------|
| N6D              | Polvo N6                                     | 4 g         |
|                  | Sucrosa                                      | 30 g        |
|                  | L-prolina                                    | 2,878 g     |
|                  | Ácido casamino                               | 0,3 g       |
|                  | Mioinositol                                  | 0,1 g       |
|                  | 2,4-diclorofenoxi (disolver en etanol)       | 2 mg        |
|                  | Phytigel                                     | 4 g         |
|                  | Agua destilada hasta                         | 1L (pH 5,8) |
| 2N6-AS100        | Polvo N6                                     | 4 g         |
|                  | Sucrosa                                      | 30 g        |
|                  | D-glucosa (monohidrato)                      | 10 g        |
|                  | Ácido casamino                               | 0,3 g       |
|                  | 2,4-diclorofenoxi (disolver en etanol)       | 2 mg        |
|                  | Phytigel                                     | 4 g         |
|                  | Acetosiringona (20 mg/ml, disolver en DMSO). | 1 ml        |
|                  | Agua destilada hasta                         | 1L (pH 5,2) |
| N6D cf500 ppt4   | Polvo N6                                     | 4 g         |

|                  |                                       |             |
|------------------|---------------------------------------|-------------|
|                  | Sucrosa                               | 30 g        |
|                  | L-prolina                             | 2,878 g     |
|                  | Ácido casamino                        | 0,3 g       |
|                  | Mioinositol                           | 0,1 g       |
|                  | 2,4-diclorofenoxi (2 mg/ml en etanol) | 1 ml        |
|                  | Phytigel                              | 4 g         |
|                  | Cefotaxima sódica                     | 500 mg      |
|                  | Agua destilada hasta                  | 1L (pH 5,8) |
|                  | Polvo vitamínico MS                   | 4,41 g      |
| REIII cf500 ppt4 | Sucrosa                               | 30 g        |
|                  | Sorbitol                              | 30 g        |
|                  | Ácido casamino                        | 2 g         |
|                  | NAA (1mg/ml)                          | 20 ul       |
|                  | Cinetina                              | 2 mg        |
|                  | Mioinositol                           | 0,1 g       |
|                  | Phytigel                              | 4 g         |
|                  | Cefotaxima sódica                     | 500 mg      |
|                  | Agua destilada hasta                  | 1L (pH 5,8) |

## **6-2. Verificación de la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO del arroz transformado**

Con el fin de analizar el nivel de tolerancia a los herbicidas de los transformantes de los genes mutantes CyPPO2 y CyPPO8 en un cultivo monocotiledóneo, se evaluó la tolerancia a los herbicidas en una planta de generación T<sub>0</sub> de cada arroz Dongjin en el que se transformó el gen.

Después de colectar brotes de arroz de 5 semanas de la generación T<sub>0</sub> del transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de CyPPO8 F363M, se los dejó crecer y se trataron con tiafenacilo o saflufenacilo, respectivamente. Se trató con doscientos mililitros de 200 µM de tiafenacilo (correspondiente a 853 g i.a./ha) o 500 µM de saflufenacilo (correspondientes a 2085 g i.a./ha) en la superficie de 40 x 60 cm. A modo de referencia la dosificación de tratamiento recomendada de tiafenacilo para el control de malezas es aproximadamente 150 g i.a./ha y la dosificación de tratamiento recomendada de saflufenacilo para el control de malezas es menor que 145 g i.a./ha.

Los transformantes T<sub>2</sub> de CyPPO2 Y373M y CyPPO8 F363M se usaron para el tratamiento con herbicida en el 47o día después de la siembra. Se pulverizaron 100 mililitros de 200 µM de tiafenacilo (correspondientes a 420 g i.a./ha) y 400 µM saflufenacilo (correspondientes a 840 g i.a./ha) respectivamente en el área de 40 x 60

cm. El resultado observado en el séptimo día después de la pulverización se presenta en la figura 40 (el resultado muestra las plantas de generación T<sub>0</sub> de la línea 1 y 3 del transformante de CyPPO2 Y373M y la línea 2 y 3 del transformante de CyPPO8 F363M después del tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo) y la figura 41 (muestra las plantas de generación T<sub>2</sub> de la línea 3 del transformante de CyPPO2 Y373M y la línea 3 del transformante de CyPPO8 F363M después del tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo), respectivamente. "Sin modificación genética" en la figura 40 indica arroz Dongjin de tipo sivestre no transformado y se usó como control negativo.

Tal como se muestra en la figura 40 y la figura 41, hubo graves daños en el control negativo, el arroz Dongjin de tipo sivestre, después del tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo, pero no se observó daño o se observó un daño débil en las plantas de generación T<sub>0</sub> de la línea número 1 y 3 del transformante de CyPPO2 Y373M (representado por "CyPPO2YM") y las plantas de generación T<sub>2</sub> de #3-1 del transformante de CyPPO2 Y373M. No se observó daño en las plantas de generación T<sub>0</sub> de la línea 1 y 3 del transformante de CyPPO8 F363M (representado por "CyPPO8FM") y las plantas de generación T<sub>2</sub> de las líneas #3-1 del transformante CyPPO8 F363M en comparación con el arroz Dongjin de tipo sivestre después del tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo.

Todas las plantas de arroz del transformante de CyPPO2 Y373M y el transformante de F363M presentaron tolerancia tras el tratamiento con tiafenacilo o saflufenacilo con una concentración mayor que la concentración recomendada para el control de malezas. Esto indicó que los genes que se introdujeron a las plantas de arroz se heredaron y expresaron de forma estable, lo que demuestra la tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO a través de las generaciones.

### **6-3. Verificación de la expresión de proteína en los transformantes de arroz**

Con el fin de confirmar que la proteína mutante (CyPPO2 Y373M o CyPPO8 F363M) se expresó en el transformante de CyPPO2 Y373M y

transformante de CyPPO8 F363M, fue realizada extracción de proteínas en una hoja de cada línea del transformante y se realizó transferencia western.

Para esto, se agregaron 5 ml/ g de tejido de tampón de extracción (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40) e inhibidor de proteasa (Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution, GenDepot) al tejido de hojas molido de cada transformante. La proteína extraída se cargó en gel SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con anticuerpo primario específico de péptidos de CyPPO2 o CyPPO8 (GenScript) en la relación de 1:1000. La proteína fue detectada por el anticuerpo secundario conjugado con HRP usando reactivo ECL y luminógrafo (Atto).

Las imágenes que se obtuvieron se presentan en la figura 42 (expresión CyPPO2 Y373M ) y la figura 43 (CyPPO8 F363M). La proteína CyPPO se detectó en la línea 1 y 3 del transformante de CyPPO2 Y373M y la línea 2 y 3 del transformante de CyPPO8 F363M

#### **6-4. Análisis de cantidad de copias de los genes que se introdujeron en el arroz transformado**

Se extrajo el ADN genómico de los tejidos de las hojas del transformante de CyPPO8 F363M para analizar la cantidad de copias del transgén.

El ADN se extrajo de la siguiente forma. Después de moler tejido de hojas del arroz transformado con un mortero en nitrógeno líquido, se agregaron 5 ml/g de tejido de tampón de aislamiento de ADN (2% (p/v) CTAB, 1,5 M NaCl, 25 mM EDTA, 0,2% (v/v) betamercaptoetanol, 100 mM Tris-Cl (pH 8,0)) y se sometieron a vórtex. Después de calentar a 60 °C durante 1 hora, se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló con inversión. Después de centrifugación en las condiciones de 7000 g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol. Después de centrifugación a 5000 g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el granulado se disolvió en tampón TE (LPSS). Después de agregar 20 µg/ml de Rnasa A (Bioneer) se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de

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 pasó a un tubo nuevo y después se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló. Después de centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se agregó 0,1 volúmenes de NaOAc (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol y se mezcló. Después, se centrifugó a 5 000 g durante 5 minutos a 4 °C, y el granulado se lavó con 70% de etanol. Después de secarse al aire, el ADN genómico se disolvió en una cantidad apropiada de tampón TE.

Los 10~40 µg de ADN que se extrajeron 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 HCl, 15 minutos de agitación
- 2) desnaturalización: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, 30 minutos de agitación
- 3) neutralización: 0,5 M Tris (pH 7,5), 1,5 M NaCl, 20 minutos de agitación

A continuación, los fragmentos de ADN se pasaron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) usando un método de transferencia capilar, y se reticuló con reticulador UV (UVC-508; ULTRA LUM Inc.).

Se realizó hibridación mediante el siguiente método: La membrana de nitrocelulosa se sumergió en solución de EasyHybridization (Roche) y se incubó a 42°C durante 3 horas. A continuación se descartó la solución, se sustituyó con una nueva solución DIG EasyHybridization y se incubó durante la noche a 42°C.

La sonda (sonda de CyPPO8-M etiquetada con DIG) se fue usada para marcar el ADN mediante reacción de PCR de la siguiente forma:

#### 25 Materiales

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Plantilla (ADN de plásmido de CyPPO8) | 0,5µl |
| Tampón 10X                            | 3µl   |
| DIG-dNTP                              | 2µl   |
| cebador directo (10µM)                | 3µl   |
| 30 cebador inverso (10µM)             | 3µl   |

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| DDW                             | 18µl  |
| e-Taq polimerasa (Solgent Inc.) | 0,5µl |
| total 30µl                      |       |

【Tabla 20】

5 Condiciones para la reacción de PCR

|      |        |          |
|------|--------|----------|
| 94°C | 3 min  | 35cycles |
| 94°C | 30 sec |          |
| 58°C | 30 sec |          |
| 72°C | 1 min  |          |
| 72°C | 5 min  |          |

Secuencias para los cebadores

|    |                                        |         |      |    |       |    |        |        |
|----|----------------------------------------|---------|------|----|-------|----|--------|--------|
|    | Cebador                                | directo | para | la | sonda | de | CyPPO8 | F363M: |
|    | GCGTTAACGGGTGCATTAGGC (SEQ ID NO: 158) |         |      |    |       |    |        |        |
| 10 | Cebador                                | inverso | para | la | sonda | de | CyPPO8 | F363M: |
|    | TGGAAAGAGTGTGAACTCC (SEQ ID NO: 159)   |         |      |    |       |    |        |        |

Tras someter el producto de PCR a electroforesis en gel de agarosa, se extrajo la banda de la sonda etiquetada.

Después de la hibridación con la sonda etiquetada, la membrana se lavó con  
 15 tampón de lavado de baja rigurosidad (2X SSC, 0,1% SDS) seguido de tampón de lavado de alta rigurosidad (0,5X SSC, 0,1% SDS). La señal de transferencia southern se detectó de la siguiente manera:

- 1) agitación durante 30 minutos después de agregar tampón de bloqueo (Roche) a la membrana
- 20 2) agitación durante 30 minutos tras agregar anticuerpo DIG (fragmentos Fab de anti-digoxigenina-AP, Roche)
- 3) agitación durante 15 minutos en tampón de lavado (Roche)
- 4) agitación durante 3 minutos tras agregar tampón de detección (Roche)
- 5) Después de aplicar CDP-Star listo para su uso (Roche) sobre la  
 25 membrana, desarrollar la transferencia en placa de rayos x.

El resultado se presenta en la figura 44. La línea 3 de CyPPO Fr63M presenta una banda, que indica que se insertó una única copia del gen en el genoma del arroz.

**Ejemplo 7. Generación de transformantes de soja usando variantes de CyPPO y prueba de tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO**

**7-1. Generación de transformantes de soja**

5           Se construyeron vectores para transformar la planta de soja con gen de CyPPO2 Y373M o CyPPO8 F363M.

La secuencia del péptido de tránsito de *A. thaliana* PPO1 se fusionó en la región 5' de CyPPO2 Y373M o CyPPO8 F363M (véase figura 31) y el gen fusionado se amplificó y aisló para la construcción de vectores.

10           Se preparó mezcla de reacción de PCR (total 50 µl) mezclando 1 µl de plantilla (el vector que se usó para la transformación de *A. thaliana*), 5 µl de tampón 10X, 1 µl de mezcla de dNTP (cada 10 mM), 1 µl de cebador TOPO-cTP\_F (10 µl), 1 µl de cebador TOPO-CyPPO2\_R o TOPO-CyPPO8\_R (10 µM), 40 µl de DDW y 1 µl de Pfu-X (Solgent, 2,5 unidades / µl) y la amplificación se realizó en  
15           condiciones de 1 ciclo de 94 °C durante 4 minutos y 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante un minuto y medio y 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Los cebadores que se usaron se resumen en la tabla 21:

**【Tabla 21】**

| Cebador       | Secuencia                                   |
|---------------|---------------------------------------------|
| TOPO-cTP_F    | CAC CAT GGA GTT ATC TCT TC (SEQ ID NO: 160) |
| TOPO-CyPPO2_R | TCA GAT CGA TCG AGT ATC TG (SEQ ID NO: 161) |
| TOPO-CyPPO8_R | TTA ACC CAA ATA ATC TAA CA (SEQ ID NO: 162) |

20           Cada producto amplificado se ligó al vector pENTR-TOPO (Invitrogen, véase figura 50) usando kits de clonación pENTR Directional TOPO (Invitrogen) y el producto de ligación fue usado para transformar célula competente Dh5 alpha (Invitrogen).

El gen clonado en el vector pENTR-TOPO se transfirió al vector binario  
25           pB2GW7.0 para transformar plantas. Se usó kit de mezcla de enzimas Gateway LR Clonase II (Invitrogen) para la construcción del vector pB2GW7.0. Después de mezclar el vector pENTR/D-TOPO en el cual se había inserido el gen de CyPPO2YM o CyPPO8FM, con tampón TE y con mix de enzimas LR Clonase II, la

mezcla se incubó a 25 °C durante 1 hora. Tras agregar solución de proteinasa K (Invitrogen) a la mezcla de reacción, se incubó a 37 °C durante 10 minutos y fue usada para transformar célula competente DH5 alpha.

Se transformó eléctricamente *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood et al., New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). Trans Res. 1993 2:208-218) con las construcciones de vectores binarios mencionados anteriormente. Para la transformación fue usada planta de soja "Kwangan". Tras eliminar el recubrimiento de semilla de la semilla de soja, el hipocótilo se cortó y se hirió 7-8 veces con un bisturí quirúrgico (hoja número 11). Se mezclaron aproximadamente 50 unidades de explantes con *Agrobacterium* EHA105 transformada y la mezcla se sonicó durante 20 segundos y después se incubó durante 30 minutos para la inoculación. Se colocó en medio CCM (medio de cocultivo; 0,32 g/l Gamborg B5, 4,26 g/l MES, 30 g/l sucrosa, 0,7% agar). Después se cocultivó en una cámara de crecimiento (25 °C, 18 hr luz/ 6 hr oscuridad) durante 5 días.

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

Los explantes con brotes inducidos se trasplantaron a SIM-1 (medio SIM complementado con 10 mg/l DL-fosfinotricina, pH 5,6). Los brotes con amarronamiento se trasplantaron a SEM (medio de alargamiento de brotes; 4,4 g/l sal de MS, 3 mM MES, 0,5 mg/l GA3, 50 mg/l asparagina, 100 mg/l ácido piroglutámico, 0,1 mg/l IAA, 1 mg/l zeatina, 3% (p/v) sucrosa, 0,8% (p/v) agar, 250 mg/l cefotaxima, 50 mg/l vancomicina, 100 mg/l ticarcillina, 5 mg/l DL-fosfinotricina, pH 5,6). Los brotes alargados de más de 4 cm de altura se transfirieron sobre RIM (medio de inducción de raíces; 4,4 g/l sal de MS, 3 mM MES, 3% sucrosa, 0,8% agar, 50 mg/l cefotaxima, 50 mg/l vancomicina, 50 mg/l ticarcillina, 25 mg/l asparagina, 25 mg/l ácido piroglutámico, pH 5,6).

Cuando las raíces crecieron lo suficiente, las plantas se pasaron a lecho de

tierra (Bioplug No. 2, Farmhannong) y mezclado con vermiculita en 2:1 (v/v). Tras 10 días, las plantas se pintaron con 100 mg/l de DL-fosfinotricina.

## 7-2. Análisis de los genes que se introdujeron en los transformantes de soja

Con el fin de analizar la cantidad de copias de los genes introducidos en las plantas T<sub>0</sub> de soja transformada con CyPPO2 Y373M (línea número 12, 14, 16, 24, 25, 27, 28, 34, y 41) y planta T<sub>1</sub> de soja transformada con CyPPO8 F363M (línea número 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 36, y 44), se extrajo ADN genómico de 250 mg de tejido de hojas de cada planta transformada con referencia al ejemplo 6-4.

Los 10~40 µg de ADN genómico se digirieron con EcoRI (Enzynomics) durante la noche y se realizó una transferencia southern mediante el método del ejemplo 6-4.

La sonda de ADN de Bar para la hibridación se preparó mediante marcado con DIG (digoxigenina)-dNTP por reacción de PCR. La mezcla de reacción de PCR (total 50 µl) se preparó mezclando 0,5 µl de plantilla (el vector que se usó para la transformación de soja), 5 µl de tampón 10X, 10 µl de mezcla de DIG-dNTP (dATP, dCTP, dGTP, respectivamente, 0,5 mM, dTTP 0,32 mM, DIG-11-dUTP 0,18 mM), 0,5 µl de cebador directo (100 µM), 0,5 µl de cebador inverso (100 µM), 33 µl of DDW, y 0,5 µl de e-Taq (Solgent, 2,5 unidades/µl), y la amplificación se realizó en condiciones de 1 ciclo de 94 °C durante 4 minutos, y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos y 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos.

Cebador de sonda de Bar:

Cebador directo para la sonda de CyPPO2 Y373M: 5'- TTC CGT ACC GAG CCG CAG GA -3' (SEQ ID NO: 163)

Cebador inverso para la sonda de CyPPO2 Y373M: 5 '- CGT TGG GCA GCC CGA TGA CA -3' (SEQ ID NO: 164)

A efectos comparativos, el ADN genómico de soja Kwangan no transformada (WT) se usó como control negativo.

El resultado se presenta en la figura 51. La cantidad de bandas que se muestran en la película en la figura 51 representa la cantidad de genes que se insertaron. En el caso de la soja Kwangan no transformada (WT), no se detectó ninguna banda y se demostró que una copia del gen de CyPPO se integró al genoma de la soja Kwangan en las líneas 14, 25, 34 y 41 del transformante de CyPPO2 Y373M y las líneas 3, 5, 7, 11, 14 y 17 del transformante de CyPPO8 F363M.

A continuación, usando las líneas del transformante con una copia única insertada, se evaluó la tolerancia a los herbicidas y se analizó la expresión de la proteína CyPPO.

10

### 7-3. Verificación de la tolerancia a los herbicidas de soja transformada

Con el fin de analizar el nivel de tolerancia a los herbicidas de plantas de soja transformadas con CyPPO2 Y373M o CyPPO8 F363M, se aplicó el herbicida a los transformantes de soja (generación T<sub>2</sub>)

15 Se pulverizaron veinte micromolares de tiafenacilo (correspondiente a 42 g i.a./ha) o 150  $\mu$ M (correspondiente a 315 g i.a./ha) o 300  $\mu$ M (correspondiente a 630 g i.a./ha) de saflufenacilo respectivamente a la soja en la etapa V2~3. Los 100 ml de herbicida de la concentración anterior se pulverizaron de manera uniforme en la superficie de 40 x 60 cm y después de 5 días se evaluó la tolerancia al herbicida. La soja no transformada (representada por la soja Kwangan) se usó como control.

20 La figura 52 presenta el resultado.. Si bien la soja Kwangan no transformada murió en cada tratamiento con herbicida con un índice de daño de 9, el índice de daño de los transformantes de CyPPO2 Y373M o CyPPO8 F363M fue de 1~3 cuando se trató con 20  $\mu$ M de tiafenacilo. Y el índice de daño de los transformantes de CyPPO2 Y373M fue de 0 cuando se trató con 150  $\mu$ M de saflufenacilo y el de los transformantes de CyPPO8 F363M fue de 0 cuando se trató con 300  $\mu$ M de saflufenacilo. El índice de daño se determinó mediante los siguientes criterios:

【Tabla 22】

| Índice de daño | Descripción del daño causado por el tratamiento con herbicida |
|----------------|---------------------------------------------------------------|
| 0              | Sin daño                                                      |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Nivel muy débil, se observa una parte muy pequeña de las hojas dañada o con clorosis.                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 2 | Síntomas de daño débiles con clorosis poco grave, sin efecto en la condición de crecimiento general.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3 | Sin efecto sobre la hoja principal y punto de crecimiento, un daño poco grave se observa en el tejido de las hojas secundarias.                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4 | La forma de la planta en general cambió un poco. No hay efecto en el brote, pero se observa clorosis y necrosis en el punto de crecimiento secundario y los tejidos de las hojas. Se considera que la recuperación es posible en una semana.                                                                                                                               |
| 5 | La forma de la planta en general cambió sin dudas. Se observa clorosis y necrosis en varias hojas y puntos de crecimiento. El punto de crecimiento primario no está dañado y el brote es de color verde. Se considera que la recuperación es posible en una semana.                                                                                                        |
| 6 | Se observa un gran daño en el crecimiento de una pequeña hoja que brotó recientemente. Se considera que la planta podría sobrevivir por el crecimiento en el punto de crecimiento distinto. Se observa clorosis y necrosis en la mayoría de las hojas y el brote es de color verde. Se considera que la recuperación es posible, pero se observan graves síntomas de daño. |
| 7 | La clorosis está presente en la mayoría de los puntos de crecimiento. La recuperación en un punto de crecimiento podría ser posible y dos hojas son de color verde parcialmente. Clorosis , necrosis y color verde parcial. El resto de la parte de las plantas, inclusive el brote, presenta necrosis.                                                                    |
| 8 | Todos los puntos de crecimiento necrosados y las plantas probablemente mueran. Una hoja tiene color verde parcialmente.                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 9 | Planta necrosada.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

El resultado muestra que si bien la soja Kwangan de tipo sivestre murió con el tratamiento con herbicida en cada concentración, los transformantes presentaron daño débil con el tratamiento con tiafenacilo y casi no presentaron daños con el tratamiento con saflufenacilo. Como referencia, el valor  $IC_{50}$  de tiafenacilo o saflufenacilo de CyPPO2 Y373M fue de 250 nM o 5000 nM respectivamente, y el valor  $IC_{50}$  de tiafenacilo o saflufenacilo de CyPPO8 F363M fue de 183 nM o 5000 nM respectivamente (tablas 10 a 11).

#### 10            **7-4. Verificación de la expresión de proteína en los transformantes de soja**

Se analizó la expresión de la proteína CyPPO Y373M o CyPPO8 F363M en las plantas transformadas.

15            Con el fin de analizar la expresión de la proteína, se extrajo la proteína total en cada transformante ( $T_1$ ) y se realizó un análisis de transferencia western. Después de triturar el tejido de las hojas de cada transformante con nitrógeno líquido, se

agregó tampón de extracción de proteína (0,8% SDS, 4% glicerol, 2% beta-mercaptoetanol, 0,0008% bromofenol azul, 0,125M Tris-Cl, pH 7,4) y se extrajo la proteína total.

La proteína que se extrajo se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE y se transfirió a una membrana PVDF. La membrana se etiquetó con anticuerpos específicos a cada proteína que se insertó (anticuerpo específico de CyPPO2 para el transformante de CyPPO2 Y373M, anticuerpo específico de CyPPO8 para el transformante de CyPPO8 F363M; GenScript).

El resultado demostró que la proteína CyPPO2 Y373M o CyPPO8F363M se expresó en todos los individuos transformantes (figura 53). Indica que la tolerancia a los herbicidas de los transformantes fue conferida por la expresión de la proteína CyPPO2 Y373M o la proteína CyPPO8 F363M.

### **Ejemplo 8. Generación de transformantes de colza usando variantes de CyPPO y ensayo de tolerancia a los herbicidas inhibidores de PPO**

#### **8-1. Generación de transformantes de colza**

El vector, en el cual se insertó el gen de CyPPO8 F363M, que se construyó en el ejemplo 5-1 se usó para generar transformantes de colza.

Las semillas de colza fueron esterilizadas con 70% (v/v) de etanol durante 4 minutos y después con 1,3% (v/v) de ácido de hipoclorito de sodio durante 30 minutos. Después de lavar 5 veces con agua estéril, la humedad se eliminó sobre un papel de filtro estéril y las semillas se trasplantaron al medio MSO (4,43 g/l sal de MS, 30 g/l sucrosa, 3 g/l Phytigel, pH 5,8), y fueron cultivadas durante 5 días en un salón de cultivo a 25±1°C en condiciones de luz (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, 25 000 Lux).

Tras transformar *Agrobacterium* con el vector con el gen de CyPPO8 F363M inserido, se inoculó en medio LB complementado con espectinomicina (100 mg/l) y rifampicina (50 mg/l) y se cultivó durante 16 horas en una incubadora de agitación a 28 °C. Los cotiledones e hipocótilos de una planta de colza se cortaron y cocultivaron con *Agrobacterium* durante 3 días (condiciones de oscuridad, 25±1°C).

Los tejidos de la planta inoculada se transfirieron a un medio de selección (4,43 g/l sal de MS, 20 g/l sucrosa, 0,2 mg/l NAA, 8  $\mu$ M TDZ, 0,01 mg/l GA3, 50  $\mu$ M tiosulfato de plata, 10 mg/l PPT, 500 mg/l carbenicillina, 4 g/l Phytigel, pH 5,8) y se cultivaron en una cámara de crecimiento (25 $\pm$ 1 °C, 16 h luz/8 h oscuridad).

5 Los tejidos de las plantas inoculadas se subcultivaron cada dos semanas y después los brotes rediferenciados de los callos se transfirieron a un medio de inducción de raíces (4,43 g/l sal de MS, 30 g/l sucrosa, 3 g/l Phytigel, carbón activado 3 g/l, pH 5,8), por lo que se indujeron raíces. Las plantas pequeñas con las raíces inducidas se transfirieron a macetas y a continuación se confirmó ser  
10 transformantes usando hojas extirpadas.

## 8-2. Verificación de la tolerancia a los herbicidas de los transformantes

Después de esterilizar las semillas de los transformantes de colza (T<sub>1</sub>) y colza Youngsan (colza de tipo sivestre, control) con 50% (v/v) de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, se lavaron 5 veces con agua estéril. Los transformantes se  
15 sembraron en un medio de selección (1/2 MS, 50 nM tiafenacilo, pH 5,8) y las colzas de tipo sivestre se sembraron en medio 1/2 MS. Los individuos que sobrevivieron después de 7 días se trasplantaron a macetas y se cultivaron en una cámara de crecimiento (25 $\pm$ 1°C, 16 h luz/8 h oscuridad). 35 días después del trasplante, se  
20 trató cada bandeja donde estaban las macetas con 100 mL (0,05% de Silwet L-77) 10  $\mu$ M de tiafenacilo y 10  $\mu$ M de saflufenacilo respectivamente cada por bandeja (40 x 60 cm, 0,24 m<sup>2</sup>).

Los resultados de 7 días después del tratamiento con el herbicida se presentan en la figura 54 (tratamiento con tiafenacilo) y figura 55 (tratamiento con saflufenacilo). En la Figura 54 y FIG. 55, "Youngsan" representa la colza Youngsan  
25 de tipo sivestre. El nivel de daño se presenta en la Tabla 23 mediante la evaluación con el índice de daño 0-5 (sin daños - muerte; véase tabla 17):

【Tabla 23】

|                  | 10 $\mu$ M tiafenacilo | 10 $\mu$ M saflufenacilo |
|------------------|------------------------|--------------------------|
| WT (Youngsan)    | 4                      | 4                        |
| CyPPO8 F363M 2-4 | 2                      | NT                       |
| CyPPO8 F363M 2-7 | 2                      | NT                       |

|                   |    |    |
|-------------------|----|----|
| CyPPO8 F363M 2-8  | 1  | NT |
| CyPPO8 F363M 2-6  | NT | 0  |
| CyPPO8 F363M 2-9  | NT | 0  |
| CyPPO8 F363M 2-10 | NT | 0  |

(NT: no evaluado)

Si bien Youngsan (colza de tipo sivestre, control) presentó un nivel de daño 4, las líneas de CyPPO8 F363M-2 presentaron tolerancia al nivel de daño 1-2 con 10  $\mu$ M de tiafenacilo (figura 54). Además, después del tratamiento con 10  $\mu$ M de saflufenacilo, las líneas de CyPPO8 F363M-2 no presentaron daños (figura 55).

### 8-3. Verificación de la expresión de proteína de la colza transformada

Se confirmó la expresión de los genes que se insertaron en los transformantes de colza de CyPPO8 F363M. Entre las líneas CyPPO8 F363M, 5 individuos (2-1, 2-2, 2-6, 2-9, y 2-10) con tolerancia a los herbicidas confirmada se seleccionaron para realizar una transferencia western.

Después de moler aproximadamente 200 mg de hojas de cada transformante de colza con nitrógeno líquido y un mortero, se agregó 0,8 ml de fenol (amortiguado con Tris, pH 8,0) y 0,8 ml de tampón SDS denso (30% (p/v) sucrosa, 2% (p/v) SDS, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0, 5% (v/v) beta-mercaptoetanol) y se mezcló en vórtex durante 30 segundos y se realizó centrifugación a 10 000 g durante 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 5 volúmenes de metanol (4 °C, 0,1 M acetato de amonio) y se mezcló y después se dejó a -20°C durante 30 minutos. Las proteínas se precipitaron por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos y se lavaron con 1 ml de metanol (4 °C, 0,1 M de acetato de amonio) dos veces y 80% de acetona (4 °C) dos veces, y se secaron. Las proteínas secas se disolvieron con 2% (p/v) tampón SDS (50 mM Tris-Cl, pH 6,8, 1 mM DTT).

Ya que el vector de CyPPO8 F363M se construyó con etiqueta HA (véase ejemplo 5-1), se realizó la transferencia western con el anticuerpo HA (Santa Cruz) para confirmar la expresión de la proteína CyPPO8 F363M.

El resultado de la transferencia western se presenta en la parte superior de la figura 56. Se demostró que la proteína CyPPO8 se expresó en todos los individuos

excepto Youngsan (colza de tipo sivestre, control). Tal resultado indica que la tolerancia a los herbicidas fue otorgada por la expresión de la proteína de los genes que se introdujeron.

5      Adicionalmente, el resultado de la tinción con Coomassie azul de la membrana PVDF se presenta en la parte inferior de la figura 56. Se demostró que la cantidad de proteína de cada muestra fue casi igual