

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 721**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2000** **E 09172695 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 2135504**

54 Título: **Plantas no transgénicas resistentes a los herbicidas**

30 Prioridad:

07.10.1999 US 158027 P
30.12.1999 US 173564 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.04.2013

73 Titular/es:

CIBUS INTERNATIONAL LP (50.0%)
Choorhoekseweg 8
4424NW Wemeldinge , NL y
INCIMA IPCO B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

BEETHAM, PETER R;
AVISSAR, PATRICIA L;
WALKER, KEITH A y
METZ, RICHARD A

74 Agente/Representante:

BLANCO JIMÉNEZ, Araceli

ES 2 401 721 T3

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

DESCRIPCIÓN**1. CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a la producción de una planta no transgénica resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato. La presente invención también se refiere al uso de una oligonucleobase recombinagénica para que se realice una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episómicas de una planta en el gen codificante con respecto a una 5-enol piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). La proteína mutada, que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo salvaje, permite una mayor resistencia o tolerancia de la planta frente a un herbicida de la familia de la fosfometilglicina, y permite el crecimiento o desarrollo sustancialmente normales de la planta, de sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta de tipo salvaje independientemente de la presencia o ausencia del herbicida. La presente invención también se refiere a una célula vegetal no transgénica en la que ha mutado el gen EPSPS, una planta no transgénica regenerada a partir de ahí, así como una planta obtenida mediante un cruce utilizando una planta regenerada no transgénica con un gen EPSPS mutado.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION**2.1 HERBICIDAS DE FOSFONOMETILGLICINA**

[0002] Las plantas tolerantes al herbicida pueden reducir la necesidad de trabajar el suelo para controlar las malas hierbas reduciendo así eficazmente la erosión del suelo. Un herbicida objeto de mucha investigación a este respecto es la N-fosfometilglicina, comúnmente denominada glifosato. El glifosato inhibe la vía ácida shiquímica que conduce a la biosíntesis de compuestos aromáticos incluyendo aminoácidos, hormonas y vitaminas. Específicamente, el glifosato frena la conversión de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y ácido 3-fosfoshiquímico en ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshiquímico por la inhibición del enzimático 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (a partir de ahora denominado sintasa EPSP o EPSPS). Para los objetivos de la presente invención, el término "glifosato" incluye cualquier forma eficaz herbicidamente de la N-fosfometilglicina (incluyendo cualquier derivado de sal, otras formas con las que se obtiene la producción del ión glifosato en plantas y cualesquiera otras herbicidas de la familia de la fosfometilglicina).

[0003] La tolerancia de las plantas al glifosato puede aumentar con la introducción de un gen mutante EPSPS que tiene una alteración en la secuencia codificante de los aminoácidos EPSPS en el genoma de la planta. Ejemplos de algunas de las mutaciones en el gen EPSPS para inducir la tolerancia al glifosato se describen en las siguientes patentes: patente EEUU n°. 5,310,667; patente EEUU n°. 5,866,775; patente EEUU n°. 5,312,910; patente EEUU n°. 5,145,783. Estas mutaciones propuestas habitualmente tienen un valor k_i más alto para el glifosato que la enzima EPSPS de tipo salvaje que confiere el fenotipo tolerante al glifosato, pero éstas variantes también se caracterizan por un K_m alto de PEP con el que la enzima cinéticamente se vuelve menos eficiente. (Kishore et al., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663; Schulz et Al., 1984, Arch. Microbiol. 137: 121-123; Sost et Al., 1984, FEBS.Lett 173: 238-241; Kishore et al., 1986, Fed.Proc. 45: 1506; Sost y Amrhein, 1990, Arch.Biochem. Biophys. 282: 433-436.) Muchas mutaciones del gen EPSPS son elegidas con el fin de producir una enzima EPSP que sea resistente a herbicidas, pero desafortunadamente, la enzima EPSPS que produce el gen EPSPS mutado tiene una actividad enzimática significativamente inferior al EPSPS de tipo salvaje. Por ejemplo, el K_m aparente de PEP y el K_i aparente de glifosato para el EPSPS de tipo salvaje de *E.coli* son de 10 μ M y 0.5 μ M, mientras que para un aislado tolerante al glifosato que tiene una sola sustitución de aminoácidos de alanina con respecto a la glicina en posición 96, estos valores son de 220 μ M y 4.0 mM, respectivamente. Un numero de genes EPSPS tolerantes al glifosato se han construido por mutagénesis. De nuevo, el EPSPS tolerante al glifosato presentaba una eficiencia catalítica inferior (V_{max}/K_m), como lo mostraba un incremento en el K_m de PEP, y una ligera reducción del V_{max} de la enzima vegetal de tipo salvaje (Kishore et al., 1988, Ann.Rev. Biochem. 57:627-663).

[0004] Como las constantes cinéticas de las enzimas variantes se deterioran con respecto al PEP, se han propuesto unos niveles altos de sobreproducción de la enzima variante, de 40 a 80 veces más, que serán necesarios para mantener una actividad catalítica normal en plantas en presencia de glifosato (Kishore et al., 1988, Ann.Rev. Biochem. 57:627-663). Se ha demostrado que se pueden producir plantas tolerantes al glifosato por inserción en el genoma de la planta de la capacidad para producir un nivel más alto de EPSP sintasa

en el cloroplasto de la célula (Shah et al., 1986, Science 233, 478-481), cuya enzima es preferiblemente tolerante al glifosato (Kishore et al. 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663).

[0005] La introducción de los genes EPSPS mutantes exógenos en plantas está bien documentada. Por ejemplo, según la patente EEUU n°. 4,545,060, para incrementar la resistencia de una planta al glifosato, un gen codificante para una variante EPSP que tiene al menos una mutación que hace que la enzima sea más resistente a su inhibidor competitivo, es decir, glifosato, es introducido en el genoma de la planta. No obstante, se asocian muchas complicaciones y problemas con estos ejemplos. Muchas de dichas mutaciones producen una expresión baja del producto genético EPSPS mutado o produce un producto genético EPSPS con una actividad enzimática significativamente inferior en comparación con el tipo salvaje. La expresión baja o actividad enzimática baja de la enzima mutada produce niveles anormalmente bajos de crecimiento y de desarrollo de la planta.

[0006] Mientras que estas variantes en las EPSP sintasas han demostrado ser útiles en la obtención de plantas transgénicas tolerantes al glifosato, sería mucho más beneficioso obtener una variante de producto genético EPSPS altamente tolerante al glifosato pero que siga eficiente cinéticamente para que la tolerancia mejorada pueda ser obtenida con un nivel de expresión de tipo salvaje.

2.2 OLIGONUCLEOBASES RECOMBINAGÉNICAS

[0007] Las oligonucleobases recombinagénicas y su uso para efectuar cambios genéticos en células eucarióticas se describen en la patente estadounidense n°. 5,565,350 de Kmiec (Kmiec I). Kmiec I enseña un método para la introducción de alteraciones genéticas específicas en un gen objetivo. Kmiec I divulga, entre otras cosas, oligonucleobases recombinagénicas que tienen dos cadenas, en las que la primera cadena contiene dos segmentos de al menos 8 nucleótidos de tipo ARN que son separados por un tercer segmento desde 4 hasta aproximadamente 50 nucleótidos de tipo ADN, llamado "segmento de ADN interpuesto." Los nucleótidos de la primera cadena en apareamiento de bases de nucleótidos de tipo ADN de una segunda cadena. Las primeras y segundas cadenas son enlazadas adicionalmente por un segmento de nucleótidos monocatenario de modo que las primera y segunda cadenas son

partes de una única cadena oligonucleótida. Kmiec I enseña además un método para la introducción de alteraciones genéticas específicas en un gen objetivo. Según Kmiec I, las secuencias de los segmentos RNA son seleccionadas para ser homólogas, es decir, idénticas, a la secuencia de un primer y de un segundo fragmento del gen objetivo. La secuencia del segmento interpuesto de ADN es homóloga a la secuencia del gen objetivo entre el primer y el segundo fragmento excepto para una región de diferencia, llamada "region heteróloga." La región heteróloga puede efectuar una inserción o delección, o puede contener una o más bases que no coinciden con la secuencia del gen objetivo con el fin de efectuar una sustitución. Según Kmiec I, la secuencia del gen objetivo es alterada en forma dirigida por la región heteróloga, de manera que el gen objetivo se vuelve homólogo con la secuencia de la oligonucleobase recombinagénica. Kmiec I enseña específicamente que los nucleótidos que contienen ribosa y 2'-O-metilribosa, es decir 2'-metoxiribosa, pueden ser usados en las oligonucleobases recombinagénicas y nucleótidos que contienen deoxiribosa de origen natural, pueden ser utilizados como nucleótidos de tipo ADN.

[0008] La patente EEUU n°. 5,731, 181 para Kmiec (Kmiec II) divulga específicamente el uso de oligonucleobases recombinagénicas para efectuar cambios genéticos en células vegetales y divulga otros ejemplos de análogos y derivados de nucleótidos tipo ARN y tipo ADN que se pueden utilizar para efectuar cambios genéticos en genes de objetivo específicos. Otras patentes que discuten el uso de oligonucleobases recombinagénicas incluyen: patentes EEUU n° 5,756,325, 5,871,984, 5,760,012, 5,888,983, 5,795,972, 5, 780,296, 5,945,339, 6,004,804; y 6,010,907 y en patente Internacional n° PCT/US00/23457; y en la Publicación Internacional de patentes n° WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789. Las Oligonucleobases recombinagénicas incluyen oligonucleótidos dúplex mezclados, moléculas sin contenido de nucleótidos mostradas en Kmiec II y otras moléculas que aparecen en las patentes y publicaciones de patentes mencionadas más arriba.

[0009] La citación o identificación de cualquier referencia en La Sección 2, o cualquier sección de esta solicitud no debe ser interpretada como una admisión

de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención se dirige a un método para producir una planta no transgénica o célula vegetal que tiene una o más mutaciones en el gen EPSPS, la cual planta ha incrementado resistencia o tolerancia a un elemento de la familia de la fosfometilglicina y que presenta un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, de sus órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo salvaje correspondiente.

La presente invención también se dirige a un método para producir una planta no transgénica que tiene una mutación en el gen EPSPS, la cual planta es resistente o tiene una tolerancia incrementada a un elemento de la familia de la fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato, donde la proteína EPSPS mutada posee sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína EPSPS de tipo salvaje.

[0011] La presente invención también se dirige a un método para producir una planta no transgénica que tiene un gen EPSPS mutado que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo salvaje independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida de la familia de la fosfometilglicina. El método comprende la introducción de una célula vegetal en una oligonucleobase recombinagénica con una mutación específica en el gen EPSPS y la identificación de una célula, semilla, o planta que posee un gen EPSPS mutado.

[0012] Ejemplos ilustrativos de una oligonucleobase recombinagénica se encuentran en las siguientes publicaciones de patente, que se incorporan aquí en su integridad como referencia: en las patentes estadounidenses n° 5,565,350, 5,756,325, 5,871,984, 5,760,012, 5,731,181, 5,888,983, 5,795,972, 5,780,296, 5,945,339, 6,004,804; y 6,010,907 y en la patente internacional n° PCT/US00/23457; y en la publicación de patente internacional n° WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789.

[0013] La planta puede ser de cualquier especie de planta dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma, incluyendo cualquier especie de planta leñosa que crece como un árbol o arbusto, cualquier especie herbácea, o cualquier especie que produzca frutas comestibles, semillas o verduras, o

cualquier especie que produzca flores coloridas o aromáticas. Por ejemplo, la planta puede ser seleccionada a partir de una especie de planta del grupo que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, cebolla, especies de soja, azúcar de caña, guisante, habas, álamo, uva, cítrico, alfalfa, centeno, avena, césped y forraje, lino, colza, pepino, manto de cielo, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, tulipán, iris, lirio, y plantas que producen frutos de cáscara ya que no están mencionados específicamente.

[0014] La oligonucleobase recombinagénica puede ser introducida en una célula vegetal usando cualquier método usado habitualmente en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a éstos, microsoportes (entrega biolística), microfibras, electroporación, microinyección.

[0015] También se divulga un método para controlar selectivamente las malas hierbas en un campo, el campo comprendiendo plantas con las alteraciones del gen EPSPS y malas hierbas descritas, el método comprendiendo la aplicación de un herbicida al campo en el que dichas plantas se han vuelto resistentes.

[0016] También se divulgan nuevas mutaciones en el gen EPSPS que confieren resistencia o tolerancia a un elemento de la familia de la fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato, a una planta o donde el EPSPS mutado tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con el EPSPS de tipo salvaje.

3.1 DEFINICIONES

[0017] La invención debe ser entendida conforme a las siguientes definiciones.

[0018] Una oligonucleobase es un polímero de nucleobases, el cual polímero puede hibridarse por apareamiento de bases de Watson-Crick a un ADN que posee la secuencia complementaria.

[0019] Las nucleobases comprenden una base, que es una purina, pirimidina, o un derivado o análogo de ésta. Las nucleobases incluyen nucleobases de péptidos, las subunidades de ácidos nucleicos de péptidos, y nucleobases de morfina además de nucleósidos y nucleótidos. Los nucleósidos son nucleobases que contienen una fracción de pentosefuranosil, por ejemplo, una ribosida o 2'-deoxiribosida opcionalmente sustituida. Los nucleósidos pueden ser enlazados por una de las varias fracciones de enlace, que pueden o no

contener un fósforo. Los nucleósidos que son enlazados por medio de enlaces de fosfodiéster insustituibles son llamados nucleótidos.

[0020] Una cadena de oligonucleobase tiene un terminal 5' y 3' único, que son las nucleobases definitivas del polímero. Una cadena particular de oligonucleobase puede contener nucleobases de todo tipo. Un compuesto de oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobase que son complementarias e hibridizadas por el apareamiento de bases de Watson-Crick. Las nucleobases son del tipo deoxiribo o tipo ribo. Las nucleobases de tipo ribo son nucleobases con un contenido de pentosefuranosil donde el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidróxilo, alquilo o halógeno. Las nucleobases del tipo deoxiribo son nucleobases distintas a las nucleobases tipo ribo e incluyen todas las nucleobases que no contienen una fracción de pentosefuranosil.

[0021] Una cadena oligonucleobase incluye genéricamente ambas cadenas de oligonucleobase y segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobase. Una cadena de oligonucleobase tiene un extremo 3' y un extremo 5'. Cuando una cadena oligonucleobase es coextensiva con una cadena, los extremos 3' y 5' de la cadena también son terminales 3' y 5' de la cadena.

[0022] Según la presente invención, el crecimiento sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido vegetal o célula vegetal se define como un índice de crecimiento o nivel de división celular de la planta, órgano de planta, tejido vegetal, o célula vegetal que es de al menos 35%, al menos 50%, al menos 60%, o al menos 75% del índice de crecimiento o nivel de división celular en una planta, órgano de planta, tejido vegetal o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína EPSPS de tipo salvaje.

[0023] Según la presente invención, el desarrollo sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido vegetal o célula vegetal está definido como la incidencia de uno o más eventos de desarrollo en la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que son sustancialmente los mismos que los que se producen en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondiente expresando la proteína de tipo salvaje EPSPS.

[0024] Según la presente invención los órganos de la planta incluyen, pero no se limitan a éstos, hojas, tallos, raíces, yemas vegetativas, yemas florales, meristemas, embriones, cotiledones, endospermo, sépalos, pétalos, pistilos,

carpelos, estambres, anteras, microsporas, polen, tubos de polen, óvulos, ovarios y frutos, o secciones, rodajas o discos tomados de éstos. Los tejidos vegetales incluyen, pero no se limitan a éstos, tejidos callosos, tejidos térreos, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos de hojas, tejidos de vástago, tejidos de raíz, tejidos biliares, tejidos tumorales vegetales, y tejidos reproductivos. Las células vegetales incluyen, pero no se limitan a éstas, células aisladas con membranas celulares, agregados de varios tamaños de éstas, y protoplastos.

[0025] Las plantas son sustancialmente "tolerantes" al glifosato cuando son sometidas a éste y proveen una curva de dosis/respuesta que es desplazada hacia la derecha cuando se compara con la curva provista por plantas de tipo no tolerantes sometidas de forma similar. Tales curvas de dosis/respuesta presentan la indicación "dosis" indicada sobre el eje X y las indicaciones "porcentaje de muerte" "efecto de herbicidas", etc., indicadas sobre el eje Y.

Las plantas tolerantes requerirán más herbicida que las plantas de tipo no tolerante con el fin de producir un efecto de herbicida determinado. Las plantas que son sustancialmente "resistentes" al glifosato, exhiben pocas o ninguna lesión necrótica, lítica, clorótica, u otras, cuando son expuestas al glifosato en concentraciones e índices empleados típicamente por la comunidad agroquímica para eliminar las malas hierbas en el campo. Las plantas que son resistentes a un herbicida también son tolerantes al herbicida. Los términos "resistente" y "tolerante" deben entenderse como "tolerante y/o resistente" en el contexto de la presente solicitud.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1A es la secuencia de ADN del gen EPSPS *Arabidopsis thaliana* (SEC ID NO:1). Los residuos de nucleótidos subrayados en negrita son los residuos específicos.

La Fig. 1B es la secuencia de aminoácidos de *Arabidopsis thaliana* de la proteína EPSPS (SEC ID NO:2). Los residuos de aminoácidos subrayados en negrita son los residuos específicos.

La Fig. 2 es una lista del tipo salvaje de *Arabidopsis thaliana* y de nucleótido EPSPS mutante y de aminoácidos en la región de la posición 173 a 183; secuencia de nucleótidos de tipo salvaje (SEC ID NO:1) y

secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (SEC ID NO:2), secuencia de
 nucleótidos A₁₇₇ mutantes (SEC ID NO:3) y secuencia de aminoácidos
 (SEC ID NO:4); secuencia de nucleótidos mutantes I₁₇₈ (SEC ID NO:5) y
 secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:6); secuencia de nucleótidos
 mutantes A₁₇₇ I₁₁₈ (SEC ID NO:7) y secuencia de aminoácidos (SEC ID
 NO:8); secuencia de nucleótidos mutantes I₁₇₈ S₁₈₂ (SEC ID nº: 9) y
 secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:10); secuencia de nucleótidos
 mutantes A₁₇₇ S₁₈₂ (SEC ID NO:11) y secuencia de aminoácidos (SEC
 ID NO:12); secuencia de nucleótidos mutantes A₁₇₇ I₁₇₈ S₁₈₂ (SEC ID
 NO:13) y secuencia de aminoácidos (SEC ID nº: 14); secuencia de
 nucleótidos mutantes V₁₇₇ S₁₈₂ (SEC ID NO:15) y secuencia de
 aminoácidos (SEC ID nº: 16); secuencia de nucleótidos mutantes L₁₁₈
 S₁₈₂ (SEC ID nº: 17) y secuencia de aminoácidos (SEC ID nº: 18);
 secuencia de nucleótidos mutantes A₁₇₇ V₁₁₈ (SEC ID NO:19) y
 secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:20); secuencia de nucleótidos
 mutantes A₁₇₇ L₁₈₂ (SEC ID NO:21) y secuencia de aminoácidos (SEC ID
 NO:22)

La Fig. 3A-C es una alineación del ADN del gen EPSPS de *Arabidopsis*
Thaliana realizada por DNASTar (LaserGene), (SEC ID NO:1) con las
 secuencias de nucleótidos de *Brassica napus* (SEC ID NO:23); *Petunia*
Hybrida (SEC ID NO:24); y gen EPSPS de *Zea Mays* (SEC ID NO:25).
 Las secuencias se alinean utilizando el método J. Hein con una tabla de
 peso de residuos ponderados.

La Fig. 4 es una alineación de la secuencia EPSPS de aminoácidos de
Arabidopsis Thaliana (SEC ID NO:2) con las secuencias EPSPS de
 aminoácidos de *Brassica napus* (SEC ID NO:26); *petunia híbrida* (SEC
 ID NO:27); y *Zea Mays* (SEC ID NO:28). Las secuencias se alinean
 utilizando el método J.Hein con una tabla de peso de residuos
 ponderados.

La Fig. 5 es una lista de los cebadores de mutagénesis utilizados, con
 los codones de objetivo en caracteres en negrita (cebador mutante A₁₇₇
 (SEC ID NO:29); cebador mutante I₁₇₈ (SEC ID NO:30); cebador mutante
 A₁₇₇ I₁₇₈ (SEC ID NO:31); cebador mutante I₁₇₈ S₁₈₂ (SEC ID NO:32);
 cebador mutante A₁₇₇ S₁₈₂ (SEC ID NO:34); cebador mutante A₁₇₇ I₁₇₈

S₁₈₂ (SEC ID NO:35); cebador mutante V₁₇₇ S₁₈₂ (SEC ID NO:35);
 cebador mutante L₁₇₈ S₁₈₂ (SEC ID NO:36); cebador mutante A₁₇₇ V₁₇₈
 (SEC ID NO:37); y cebador mutante A₁₇₇ L₁₈₂ (SEC ID NO:38).

La Fig. 6 es el crecimiento medido por densidad óptica a 600 nm de
 clones de *Arabidopsis* en presencia (+) y ausencia (-) de 17 mM de
 glifosato.

La Fig. 7 (panel superior) es una transferencia Western que muestra la
 expresión de *Bacillus* de histidina marcada, *Arabidopsis* de tipo
 salvaje(WT) y proteínas EPSPS (AS) mutantes aisladas de lisados (L) y
 eluatos (E) de células. La *Salmonella* no transformada como control
 negativo no muestra ninguna expresión EPSPS. El panel inferior es un
 gel duplicado teñido en plata.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0027] La presente invención se dirige a un método de producción de una
 planta o célula vegetal no transgénica que tiene una mutación en el gen
 EPSPS, la cual planta tiene una resistencia o tolerancia incrementada con
 respecto a un elemento de la familia de la fosfometilglicina y la cual planta
 exhibe un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, de sus
 órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo salvaje
 correspondiente. La presente invención también se dirige a una planta no
 transgénica que tiene una mutación en el gen EPSPS, la cual planta es
 resistente o tiene una tolerancia incrementada a un elemento de la familia de la
 fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato, donde la proteína EPSPS mutada
 tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la
 proteína EPSPS de tipo salvaje.

[0028] La presente invención se dirige también a un método para la producción
 de una planta no transgénica que posee un gen EPSPS mutado que mantiene
 sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo salvaje sin tener en
 cuenta la presencia o ausencia de un herbicida de la familia de la
 fosfometilglicina. El método comprende la introducción en una célula vegetal
 de una oligonucleobase recombinagénica con una mutación específica en el
 gen EPSPS y la identificación de una célula, semilla, o planta que tiene un gen
 EPSPS mutado.

[0029] Ejemplos ilustrativos de una oligonucleobase recombinagénica se encuentran en las siguientes publicaciones de patentes estadounidenses nº 5,565,350; 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,731,181; 5,888,983; 5,795,972; 5, 780,296; 5,945,339; 6, 004,804; y 6,010,907 y en la patente Internacional nº.PCT/US00/23457; y en la publicación internacional de patentes nº WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789.

[0030] La planta puede ser cualquier especie de plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas o gimnospermas incluyendo cualquier especie de planta leñosa que crece como un árbol o arbusto, cualquier especie herbácea, o cualquier especie que produzca frutos comestibles, semillas o verduras, o cualquier especie que produzca flores coloridas o aromáticas. Por ejemplo, la planta puede ser seleccionada a partir de una especie de planta del grupo que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, cebolla, especies de soja, azúcar de caña, guisante, habas, álamo, uva, cítrico alfalfa, centeno, avena, hierbas de turba y forraje, lino, colza oleaginosa, pepino, manto de cielo, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, tulipán, iris, lirio, y plantas que producen frutos de cáscara ya que no están mencionadas específicamente.

[0031] La oligonucleobase recombinagénica puede ser introducida en una célula vegetal usando cualquier método usado habitualmente en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a éstos, microsoportes (entrega biolística), microfibras, electroporación, microinyección.

[0032] Se divulga un método para controlar selectivamente las malas hierbas en un campo, el campo comprendiendo plantas con las alteraciones de gen EPSPS y malas hierbas divulgadas, el método comprendiendo la aplicación al campo de una herbicida con respecto al cual dichas plantas se han vuelto resistentes.

[0033] Además se divulgan nuevas mutaciones en el gen EPSPS que confiere resistencia o tolerancia a un elemento de la familia de la fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato, a una planta o donde el EPSPS mutado tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con el EPSPS de tipo salvaje.

5.1 OLIGONUCLEOBASE RECOMBINAGÉNICA

[0034] La invención puede ser practicada con oligonucleobases recombinagénicas que tienen las conformaciones y composiciones químicas descritas en la patente estadounidense nº 5,565,350 para Kmiec (Kmiec I) y el gen de la patente estadounidense nº 5,731,181 (Kmiec II). Kmiec I enseña un método de introducción de alteraciones genéticas específicas en un gen objetivo. Las oligonucleobases recombinagénicas en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos cadenas complementarias, de las cuales una contiene al menos un segmento de nucleótidos de tipo ARN (un "segmento de ARN") que son bases apareadas con nucleótidos de tipo ADN de la otra cadena.

[0035] Kmiec II divulga que los nucleótidos que contienen una base de purina y pirimidina pueden ser sustituidos por nucleótidos. Las patentes estadounidenses nº 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,888,983; 5,795,972; 5,780,296; 5,945,339; 6,004,804; y 6,010,907 y la patente internacional nº PCT/US00/23457; y las publicaciones de patentes internacionales nº WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789, divulgan moléculas recombinagénicas adicionales que pueden ser utilizadas en la presente invención. Los términos "oligonucleobase recombinagénica" se utiliza aquí para indicar las moléculas que se pueden utilizar en los métodos de la presente invención e incluyen oligonucleótidos dúplex mezclados, conteniendo moléculas no nucleótidos divulgados en Kmiec II, oligodeoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas recombinagénicas que se divulgan en las patentes y publicaciones de patentes citadas más arriba.

[0036] La oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido doble mezclado en el que los nucleótidos de tipo ARN de los oligonucleótidos dúplex mezclados son producidos resistentes a la ribonucleasa por sustitución del 2'-hidroxil con una función de fluoro, cloro o bromo o por aplicación de un sustituyente en el 2'-O. Sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes divulgados por Kmiec II. Sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes expuestos en la patente estadounidense nº. 5,334,711 (Sproat) y los sustituyentes expuestos por las publicaciones de patente EP 629 387 y EP 679 657 (colectivamente, solicitudes Martin). Como se utiliza aquí, un derivado de 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido con un sustituyente descrito en las solicitudes Martin o Sproat es

llamado "ribonucleótido 2'-sustituido." Como se utiliza aquí, el término "nucleótido de tipo ARN" define un 2'-hidroxil o nucleótido 2'-sustituido que se enlaza con otros nucleótidos de un oligonucleótido doble mezclado por un enlace de fosfodiéster no sustituido o cualquiera de los enlaces no naturales
 5 expuestos por Kmiec I o Kmiec II.

[0037] La oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido doble mezclado que es enlazado únicamente por enlaces de fosfodiéster no sustituidos. En una alternativa, el enlace se realiza por fosfodiésters sustituidos, derivados de fosfodiéster y enlaces sin base de fósforo como
 10 expuesto por Kmiec II. De manera alternativa, cada nucleótido de tipo ARN en el oligonucleótido doble mezclado es un nucleótido sustituido 2'. Los ribonucleótidos sustituidos 2' puede ser ribonucleótidos sustituidos 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxiletiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Los ribonucleótidos 2'-sustituidos
 15 preferidos son 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi, y nucleótidos sustituidos 2'-aliloxi. De forma alternativa el oligonucleótido doble mezclado es enlazado por enlaces de fosfodiéster sin sustituir.

[0038] Aunque el oligonucleótido doble mezclado que posee sólo un único tipo de nucleótido de tipo ARN sustituido en posición 2' sea sintetizado de manera
 20 más apropiada, los métodos pueden ser practicados con oligonucleótidos dúplex mezclados que poseen dos o más tipos de nucleótidos de tipo ARN. La función de un segmento de ARN puede no ser afectada por una interrupción causada por la introducción de un deoxinucleótido entre dos trinucleótidos de tipo ARN, por lo que, los términos segmento de ARN define tal "segmento de
 25 ARN interrumpido." Un segmento de ARN no interrumpido es llamado segmento de ARN contiguo. En una forma de realización alternativa un segmento de ARN puede contener nucleótidos alternantes resistentes a la ribonucleasa y 2'-OH no sustituidos. Los oligonucleótidos dúplex mezclados tienen preferiblemente menos de 100 nucleótidos y más preferiblemente menos
 30 de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. Las primera y segunda cadenas son pares de bases Watson-Crick. Las cadenas del oligonucleótido dúplex mezclado son unidas de forma covalente por un enlazador, tal como una hexa, penta o tetranucleótido monocatenario de modo que las primera y segunda cadenas son segmentos de una cadena de oligonucleótidos única con

un extremo 3' único y 5' único. Los extremos 3' y 5' pueden ser protegidos por la adición de un "tope de retorno" por el que los nucleótidos de terminales 3' y 5' son apareados Watson-Crick con nucleótidos contiguos. Un segundo tope de retorno puede, adicionalmente, estar dispuesto en la unión entre las primera y segunda cadenas lejos de las extremidades 3' y 5', de modo que el apareamiento Watson-Crick entre las primera y segunda cadenas sea estabilizado.

[0039] Los primeros y segundos hilos contienen dos regiones que son homólogas con dos fragmentos del gen EPSPS objetivo, es decir que tiene la misma secuencia que el gen objetivo. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y pueden contener uno o más nucleótidos tipo ADN de segmento de conexión de ADN y también pueden contener nucleótidos de tipo ADN que no se encuentran dentro del segmento de ADN intermedio. Las dos regiones de homología son separadas por, y cada una es contigua a, una región que posee una secuencia diferente a la secuencia del gen objetivo, denominada "región heteróloga." La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos desequilibrados. Los nucleótidos desequilibrados pueden ser contiguos o de forma alternativa pueden estar separados por uno o dos nucleótidos que son homólogos al gen objetivo. De forma alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción o uno, dos, tres o cinco, o menos nucleótidos. De forma alternativa, la secuencia de oligonucleótido dúplex mezclado puede diferir de la secuencia del gen objetivo sólo por delección de uno, dos, tres, o cinco o menos nucleótidos del oligonucleótido dúplex mezclado. La longitud y posición de la región heteróloga se define, en este caso, como la longitud de la delección, aunque ninguno de los nucleótidos del oligonucleótido dúplex mezclado se encuentran dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos del gen objetivo que son complementarios a las dos regiones homólogas es idéntica a la longitud de la región heteróloga cuando se prevé una sustitución o sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas son así más separadas en el oligonucleótido dúplex mezclado que sus fragmentos homólogos complementarios en el gen, y lo contrario es aplicable cuando la región heteróloga codifica una delección.

[0040] Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos dúplex mezclados son cada uno una parte de una región homóloga, es decir, una región que es idéntica en secuencia a un fragmento del gen objetivo, los cuales segmentos juntos contienen preferiblemente al menos 13 nucleótidos de tipo ARN y preferiblemente 16 a 25 nucleótidos de tipo ARN o aún más preferiblemente 18-22 nucleótidos de tipo ARN o mucho más preferiblemente 20 nucleótidos. En una forma de realización, los segmentos de ARN de las regiones de homología son separados por y contiguos a, es decir, "conectados por" un segmento de ADN intermedio. En una forma de realización, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN intermedio. Un segmento de ADN intermedio que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido dúplex mezclado se denomina "segmento mutador."

[0041] El cambio a introducir en el gen EPSPS objetivo es codificado por la región heteróloga. El cambio a introducir en el gen EPSPS puede ser un cambio en una o más bases de la secuencia de gen EPSPS o la adición o delección de una o más bases.

[0042] De forma alternativa, la oligonucleobase recombinagénica es un vector mutacional de oligodeoxinucleótido monocatenario o SSOMV, que se divulga en la solicitud de patente internacional PCT/US00/23457. La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales que se describen en las patentes estadounidenses nº 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,888,983; 5,795,972; 5, 780,296; 5,945,339; 6,004,804; y 6,010,907 y en las publicaciones internacionales nº WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas con la secuencia objetivo separada por una región que contiene la alteración genética deseada llamada región mutadora. La región mutadora puede tener una secuencia que presenta la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia objetivo, pero que posee una secuencia diferente. Tal región mutadora puede causar una sustitución. De forma alternativa, las regiones homólogas en el SSOMV pueden ser contiguas entre sí, mientras que las regiones en el gen objetivo que poseen la misma secuencia son separadas por uno, dos o más nucleótidos. Tal SSOMV causa una delección de los nucleótidos del gen objetivo que están ausentes del SSOMV. Finalmente, la secuencia del

gen objetivo que es idéntica a las regiones homólogas puede ser contigua en el gen objetivo pero separada por uno, dos o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Tal SSOMV causa una inserción en la secuencia del gen objetivo.

[0043] Los nucleótidos del SSOMV son desoxiribonucleótidos que son
5 enlazados por enlaces de fosfodiéster no modificados con la excepción de que el enlace internucleótido de terminal 3' y/o terminal 5' o de forma alternativa los dos enlaces internucleótidos de terminal 3' y/o terminal 5' pueden ser un fosforotioato o fosfoamidato. Como se utiliza aquí, un enlace internucleótido es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace entre el
10 nucleótido de extremo 3' o nucleótido de extremo 5' y un sustituyente de bloqueo, ver *supra*. La longitud del SSOMV está entre 21 y 55 deoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología son, por consiguiente, una longitud total de al menos 20 deoxinucleótidos y al menos dos de las regiones de homología deben tener cada una unas longitudes de al menos 8
15 deoxinucleótidos.

[0044] El SSOMV puede ser diseñado para ser complementario a cualquiera cadena codificante o no codificante del gen objetivo. Cuando la mutación deseada es una sustitución de base única, se prefiere que ambos nucleótido mutador sean pirimidina. En la medida en que se consigue obtener el resultado
20 funcional deseado se prefiere el hecho de que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido objetivo en la cadena complementaria sean pirimidinas. Se prefieren particularmente los SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir que un nucleótido mutador C o T es mal apareado, respectivamente, con un nucleótido C o T en la cadena complementaria.

[0045] Además del oligodeoxinucleótido, el SSOMV puede contener un
25 sustituyente de bloqueo 5' que es conectado con los carbonos de terminal 5' a través de un enlazador. La composición química del enlazador no es decisiva, a parte de su longitud que debe tener preferiblemente al menos 6 átomos de largo y de que el enlazador debe ser flexible. Una variedad de sustituyentes no
30 tóxicos como la biotina, colesterol u otros esteroides o un colorante fluorescente catiónico no intercalante, pueden ser utilizados. Los reactivos particularmente preferidos para producir SSOMV son los reactivos vendidos como Cy3™ y CyS™ por Glen Research, Sterling VA, que son fosforamiditas bloqueadas que durante su incorporación en un oligonucleótido producen

colorantes de indomonocarbocianina e indodicarbocianina sustituidos 3,3,3'.3'-tetrametil N,N'-isopropilo, respectivamente. Cy3 es el más preferido. Cuando la indocarbocianina es sustituida por N-oxialquilo, ésta puede ser enlazada adecuadamente al terminal 5' del oligodeoxinucleótido a través de un fosfodiéster con un fosfato de terminal 5'. La composición química del enlazador colorante entre el colorante y el oligodeoxinucleótido no es decisiva y se elige por conveniencia sintética. Cuando la fosforamidita Cy3 disponible comercialmente es usada tal y como se indica, la modificación 5' resultante consiste en un sustituyente de bloqueo y el enlazador juntos que son una indomonocarbocianina N-hidroxipropilo, N'-fosfatidilpropilo 3,3,3'.3'-tetrametilo.

[0046] El colorante de indocarbocianina puede ser tetra sustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitación en cuanto a la teoría, éstas sustituciones impiden que el colorante sea un colorante intercalante. La identidad de los sustituyentes en éstas posiciones no es decisiva. Los SSOMV pueden además tener un sustituyente de bloqueo 3'. De nuevo, la química del sustituyente de bloqueo 3' no es crítica.

5.2 UBICACIÓN Y TIPO DE MUTACIÓN INTRODUCIDA EN EL GEN EPSPS

[0047] En una forma de realización de la presente invención, el gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (ver figura 1A) y la enzima EPSPS correspondiente (ver figura 1B) comprende una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en Leu₁₇₃, Gli₁₇₇, Tr₁₇₈, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Pro₁₈₂, Ser₉₈, Ser₂₂₅ y Leu₁₉₈, o en un residuo de aminoácido análogo en un gen EPSP de otra especie, y la mutación produce una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la enzima EPSPS en comparación con la secuencia de tipo salvaje:

- (i) Leu₁₇₃ - Phe
- (ii) Gli₁₇₇ - Ala o Ile
- (iii) Tr₁₇₈ - Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₉ - Gly
- (v) Met₁₈₀ - Cys
- (vi) Arg₁₈₁ - Leu o Ser
- (vii) Pro₁₈₂ - Leu o Ser
- (viii) Ser₉₈ - Asp
- (ix) Ser₂₅₅ -Ala

(x) Leu₁₉₈ -Lys.

[0048] En otra forma de realización de la presente invención, dentro del producto genético EPSPS, el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Leu-Tyr-Leu-Gly-Asn (SEC ID NO:29) y es sustituido por Phe; o el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Gly dentro de la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEC ID NO:30) y es sustituido por Ala o Ile; o el aminoácido que debe ser sustituido es Thr dentro de la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEC ID NO:31) y es sustituido por Ile, Val o Leu; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ala dentro de la secuencia contigua Gly-Thr- Ala-Met-Arg (SEC ID NO:32) y es sustituido por Gly; o el aminoácido que debe ser sustituido es Met dentro de la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro (SEC ID NO:33) y es sustituido por Cys; o el aminoácido que debe ser sustituido es Arg dentro de la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEC ID NO:34) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Pro dentro de la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEC ID NO:35) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que sustituir es Ser dentro de un contiguo Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEC ID NO:36) y es sustituido por Asp; o el aminoácido que sustituir es Ser dentro de la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEC ID NO:37) y es sustituido por Ala; o el aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEC ID NO:38) y es sustituido por Lys. En otras versiones, una o más de las sustituciones precedentes pueden realizarse en la secuencia de aminoácidos EPSPS.

[0049] De forma alternativa, y/o adicionalmente, la mutación puede implicar la sustitución de cualquiera de los aminoácidos en posiciones correspondientes a 256, 284-288 y 353-356 con respecto a la proteína EPSPS representada en la figura 1B (SEC ID NO.2).

[0050] De forma alternativa, el gen EPSPS es mutado en la posición del aminoácido 177 en la que Gly es sustituido por Ala. De forma alternativa existe la sustitución de Thr en la posición del aminoácido 178 por Ile. De forma alternativa una mutación en la posición del aminoácido 177 en la que Gly es sustituido por Ala, más la sustitución adicional de Thr en la posición del aminoácido 178 por Ile. De forma alternativa mutaciones en la posición del aminoácido 178, en la que Thr es sustituido por Ile, más la mutación adicional

en la posición 182, en la que Pro es sustituido por Ser. De forma alternativa incluye la sustitución de Gly en la posición del aminoácido 177 por Ala, más la mutación adicional en la posición del aminoácido 182, en la que Pro es sustituido por Ser. Otras secuencias de EPSPS mutado comprenden la sustitución de Gly en la posición 177 por Ala, más la sustitución en la posición 178, en la que Thr es sustituido por Ile, más la sustitución adicional de Pro en la posición del aminoácido 182 por Ser. De forma alternativa la sustitución de Thr en la posición del aminoácido 178 por Val y la mutación adicional en la posición del aminoácido 182, en la que Pro es sustituido por Ser. De forma alternativa la sustitución de Thr en la posición 178 por Leu está incluida más la mutación en la posición del aminoácido 182, en la que Pro es sustituido por Ser. Otra forma de realización incluye, la sustitución en la posición del aminoácido 177 en la que Gly es sustituido por Ala, más la sustitución de Thr en la posición 178 por Val. La sustitución en la posición del aminoácido 177 en la que Gly es sustituido por Ala, más la sustitución de Thr en la posición del aminoácido 178 por Leu (ver figura 2).

[0051] Las mutaciones precedentes en el gen EPSPS se describieron utilizando el gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (SEC ID NO:1) y proteína (SEC ID NO:2). La presente invención también incluye genes EPSPS mutantes de otra especie. No obstante, debido a variaciones en los genes EPSPS de diferentes especies, el número del residuo de aminoácido que debe ser sustituido por una especie puede ser diferente en otra especie. Sin embargo, la posición análoga es identificada fácilmente por un experto en la técnica por homología secuencial. Por ejemplo, la figura 3A-C muestra las secuencias de nucleótidos alineadas y la figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos alineadas de cuatro genes EPSPS de *Arabidopsis Thaliana*, *Zea Mays*, *Petunia hybrida*, y *Brassica napus*. Así, las posiciones análogas en *Zea Mays* son Leu₉₇, Gli₁₀₁, Tr₁₀₂, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Pro₁₀₆, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂. Por lo que la secuencia de aminoácidos EPSPS de *Zea Mays* es mutada en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- (i) Leu₉₇ - Phe
- (ii) Gly₁₀₁, - Ala o Ile
- (iii) Tr₁₀₂ - Ile o Val o Leu

- (iv) Ala₁₀₃ - Gly
- (v) Met₁₀₄ - Cys
- (vi) Arg₁₀₅ - Leu o Ser
- (vii) Pro₁₀₆ - Leu o Ser
- 5 (viii) Ser₂₃ -Asp
- (ix) Ser₁₇₉ -Ala
- (x) Leu₁₂₂ -Lys.

- [0052] Dentro del producto de gen EPSPS de *Zea mays* el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua
- 10 Leu-Phe-Leu-Gly-Asn (SEC ID NO:39) y es sustituido por Phe; o el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Gly dentro de la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEC ID NO:30) y es sustituido por Ala o Ile; o el aminoácido que debe ser sustituido es Thr dentro de la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEC ID NO:31) y es sustituido por Ile, Val o Leu; o el
- 15 aminoácido que debe ser sustituido es Ala dentro de la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEC ID nº: 32) y es sustituido por Gly; o el aminoácido que debe ser sustituido es Met dentro de la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-pro (SEC ID NO:33) y es sustituido por Cys; o el aminoácido que debe ser sustituido es Arg dentro de la secuencia contigua Ala-Met- Arg-Pro-Leu (SEC
- 20 ID NO:34) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Pro dentro de la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEC ID NO:35) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser dentro de una secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEC ID NO:36) y es sustituido por Asp; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser dentro
- 25 de la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEC ID NO:37) y es sustituido por Ala; o el aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEC ID NO:38) y que debe ser sustituido por Lys. De forma alternativa, una o más de las sustituciones precedentes pueden ser realizados en la secuencia EPSPS de los aminoácidos.
- 30 [0053] En *Brassica napus*, las posiciones análogas de aminoácidos son Leu₁₆₉, Gli₁₇₃, Tr₁₇₄, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Pro₁₇₈, Ser₉₄, Ser₂₅₁, y Leu₁₉₄. Así, la secuencia de aminoácidos EPSPS de *Brassica napus* es mutada en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- (i) Leu₁₆₉ - Phe
- (ii) Gli₁₇₃ - Ala o Ile
- (iii) Tr₁₇₄ - Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₅ - Gly
- 5 (v) Met₁₇₆ - Cys
- (vi) Arg₁₇₇ - Leu o Ser
- (vii) Pro₁₇₈ - Leu o Ser
- (viii) Ser₉₄ -Asp
- (ix) Ser₂₅₁ -Ala
- 10 (x) Leu₁₉₄ -Lys

[0054] Dentro del producto genético EPSPS de *Brassica napus* el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Leu-Tyr-Leu-Gly-Asn (SEC ID NO:29) y es sustituido por Phe; o el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Gly dentro de la secuencia contigua

15 Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEC ID NO:30) y es sustituido por Ala o Ile; o el aminoácido que debe ser sustituido es Thr dentro de la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEC ID NO:31) y es sustituido por Ile, Val o Leu; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ala dentro de la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEC ID nº: 32) y es sustituido por Gly; o el que debe ser

20 sustituido es Met dentro de la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-pro (SEC ID NO:33) y es sustituido por Cys; o el aminoácido que debe ser sustituido es Arg dentro de la secuencia contigua Ala-Met- Arg-pro-Leu (SEC ID NO:34) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Pro dentro de la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEC ID NO:35) y es sustituido

25 por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser dentro de un contiguo Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEC ID NO:36) y es sustituido por Asp; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser dentro de la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEC ID NO:37) y es sustituido por Ala; o el aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-

30 Gly (SEC ID NO:38) y es sustituido por Lys. De forma alternativa, una o más de las sustituciones precedentes pueden realizarse en la secuencia de aminoácidos EPSPS.

[0055] En *Petunia hybrida* las posiciones análogas son Leu₁₆₉, Gli₁₇₃, Tr₁₇₄, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Pro₁₇₈, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄. Así, la secuencia de

aminoácidos EPSPS de *Petunia hybrida* es mutada en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- 5 (i) Leu₁₆₉ - Phe
- (ii) Gli₁₇₃ - Ala o Ile
- (iii) Tr₁₇₄ - Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₅ - Gly
- (v) Met₁₇₆ - Cys
- 10 (vi) Arg₁₇₇ - Leu o Ser
- (vii) Pro₁₇₈ - Leu o Ser
- (viii) Ser₉₄ -Asp
- (ix) Ser₂₅₁ -Ala
- (x) Leu₁₉₄ -Lys
- 15 [0056] Dentro del producto genético EPSPS de *Petunia hybrida* el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Leu-Phe-Leu-Gly-Asn (SEC ID NO:39) y es sustituido por Phe; o el residuo de aminoácido que debe ser sustituido es Gly dentro de la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEC ID NO:30) y es sustituido por Ala o Ile; o el
- 20 aminoácido que debe ser sustituido es Thr dentro de la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEC ID NO:31) y es sustituido por Ile, Val o Leu; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ala dentro de la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEC ID nº: 32) y es sustituido por Gly; o el aminoácido que debe ser sustituido es Met dentro de la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro
- 25 (SEC ID NO:33) y es sustituido por Cys; o el aminoácido que debe ser sustituido es Arg dentro de la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEC ID NO:34) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Pro dentro de la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEC ID NO:35) y es sustituido por Leu o Ser; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser
- 30 dentro de una secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEC ID NO:36) y se cambia a Asp; o el aminoácido que debe ser sustituido es Ser dentro de la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEC ID NO:37) y es sustituido por Ala; o el aminoácido que debe ser sustituido es Leu dentro de la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEC ID NO:38) y es sustituido por Lys. De forma

alternativa, una o más de las sustituciones precedentes pueden realizarse en la secuencia de aminoácidos EPSPS.

5.3 LA ENTREGA DE OLIGONUCLEOBASES RECOMBINAGÉNICAS A CÉLULAS VEGETALES

- 5 [0057] Cualquier método comúnmente conocido puede ser usado en los métodos de la presente invención para transformar una célula vegetal con una oligonucleobase recombinagénica. Se enumeran métodos ilustrativos a continuación.

5.3.1 MICROSOPORTES Y MICROFIBRAS

- 10 [0058] El uso de microsoportes metálicos (microesferas) para la introducción de grandes fragmentos de ADN en células vegetales que tienen paredes celulares de celulosa por penetración de proyectiles es bien conocida por los expertos en la técnica (a partir de ahora, entrega biolística). Las patentes estadounidenses nº 4,945,050, 5,100,792 y 5,204,253 describen técnicas generales para
15 seleccionar microsoportes y dispositivos para su proyección.

- [0059] Condiciones específicas para el uso de microsoportes en los métodos de la presente invención se describen en la Publicación Internacional WO 99/07865. En una técnica ilustrativa, microsoportes congelados (60 mg/ml), oligonucleótido dúplex mezclado (60 mg/ml) 2.5 M de CaCl_2 y 0.1 M de
20 espermidina son agregados en ese orden; la mezcla es agitada suavemente, por ejemplo, en forma de remolino, durante 10 minutos y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, con lo cual los microsoportes son diluidos en 5 volúmenes de etanol, centrifugados y resuspendidos en 100% de etanol. Se pueden obtener buenos resultados con una concentración en la
25 solución de adherencia de 8-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de microsoportes, 14-17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligonucleótido dúplex mezclado, 1.1-1.4 M de CaCl_2 y 18-22 mM de espermidina. Se observaron resultados óptimos en las condiciones de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de microsoportes, 16.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligonucleótido dúplex mezclado, 1.3 M de CaCl_2 y 21 mM de espermidina.

- 30 [0060] Las oligonucleobases recombinagénicas también se pueden introducir en células vegetales para la práctica de la presente invención utilizando microfibras para penetrar en la pared celular y membrana celular. La patente EEUU nº 5,302,523 de Coffee et al. describe el uso de 30 X 0.5 μm y 10 X 0.3 μm de fibras de carburo de silicona para facilitar la transformación de cultivos

de malz de suspensión de Black Mexican Sweet. Cualquier técnica mecánica que puede se utilizar para introducir ADN para la transformación de una célula vegetal ser puede usada para la entrega de oligonucleobase recombinagénica para su transmutación.

- 5 [0061] Una técnica ilustrativa para la entrega de microfibras de una oligonucleobase recombinagénica es la siguiente: microfibras estériles (2 µg) son suspendidas en 150 µl de medio de cultivo vegetal comprendiendo aproximadamente 10 µg de un oligonucleótido dúplex mezclado. Se deja reposar un cultivo en suspensión y unos volúmenes iguales de células
- 10 empaquetadas y la suspensión de fibras/nucleótidos estéril son removidas durante 10 minutos y dispuestas en placas. Unos medios selectivos son aplicados inmediatamente o con un retraso de hasta aproximadamente 120 horas según lo apropiado para la característica particular.

5.3.2 ELECTROPORACIÓN DE PROTOPLASTO

- 15 [0062] En una forma de realización alternativa, la oligonucleobase recombinagénica puede ser entregada a la célula vegetal por electroporación de un protoplasto derivado de una parte de planta. Los protoplastos son formados por tratamiento enzimático de una parte de planta, particularmente una hoja, según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Ver,
- 20 por ejemplo, Gallois et al., 1996, en Methods in Molecular Biology 55:89-107, Humana Press, Totowa, NJ; Kipp et Al., 1999, en Methods in Molecular Biology.133:213-221, Humana Press, Totowa, NJ. Los protoplastos no necesitan ser cultivados en medios de crecimiento antes de la electroporación. Unas condiciones ilustrativas para la electroporación son 3×10^5 protoplastos
- 25 en un volumen total de 0.3 ml con una concentración de oligonucleobase recombinagénica de entre 0.6 - 4 µg/ml.

5.3.3 TRIQUITOS Y MICROINYECCIÓN

- [0063] También en otra forma de realización alternativa, la oligonucleobase recombinagénica puede ser entregada a la célula vegetal por triquitos o
- 30 microinyección de la célula vegetal. La técnica de triquitos se realiza esencialmente tal y como se describe en Frame et al., 1994, Plant J. 6:941-948. La oligonucleobase recombinagénica es añadida a los triquitos y es usada para transformar las células vegetales. La oligonucleobase recombinagénica puede ser coincubada con plásmidos que comprenden secuencias de

codificación de proteínas capaces de formar complejos de recombinasa en células vegetales de tal forma que la recombinación es catalizada entre el oligonucleótido y la secuencia objetivo en el gen EPSPS.

5.4 SELECCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES AL GLIFOSATO

- 5 [0064] Las plantas o células vegetales pueden ser evaluadas por resistencia o tolerancia a una herbicida utilizando métodos comúnmente conocidos en la técnica, por ejemplo, por crecimiento de la planta o célula vegetal en presencia de un herbicida y medición del nivel de crecimiento en comparación con el índice de crecimiento en la ausencia del herbicida.

10 6. EJEMPLO

[0065] Los siguientes experimentos demuestran la producción de genes EPSPS de *Thaliana arabidopsis* mutantes que son resistentes al glifosato herbicida y que permite que las células vegetales mantengan un índice de crecimiento.

15 6.1 MATERIAL Y METODOS

6.1.1 AISLAMIENTO DEL ADNc DE EPSPS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

- 20 [0066] Un fragmento de ADN de 1.3 kb se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de *Arabidopsis* utilizando los cebadores AtEXPEXPM1 y AtEXPEXP2CM-2. Los dos cebadores se diseñaron para amplificar el ADNc desde el péptido maduro hasta el codón de terminación. El cebador 5'AtEXPEXPM1 contiene un sitio XbaI (subrayado) y el cebador 3' AtEXPEXP2CM-2 contiene un sitio BglII, (subrayado), sitios que serán útiles para la clonación del fragmento en el vector de expresión.

AtEXPEXPM1

- 25 5'-GCTCTAGAGAAAGCGTCGGAGATTGTACTT-3' (SEC ID NO:40)

AtEXPEXP2CM-2

5'-GCAGATCTGAGCTCTTAGTGCTTTGTGATTCTTTCAAGTAC-

3'(SEC ID NO:41)

- 30 [0067] La banda de PCR fue extirpada del gel de agarosa y purificada (GeneClean, Biol). Su secuencia fue confirmada entonces como la secuencia peptídica madura del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana*.

6.1.2 PREPARACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN

[0068] La región de codificación EPSPS del gen de *AroE bacillus subtilis* se obtuvo por PCR usando los siguientes cebadores:

BsAroE5'Xba

5'-GCGTCTAGAAAAACGAGATAAGGTGCAG-3' (SEC ID NO:42) y

5

BsAroE3'BamHI

5'-GCGGATCCTCAGGATTTTTTCGAAAGCTTATTTAAATG-3' (SEC ID NO:43).

10

[0069] El fragmento de PCR, sin codón iniciador (ATG), fue clonado en el marco del vector pACLacIMH6RecA por sustitución del ORF de *RecA* por digestión con XbaI y BamHI. pACLacIMH6RecA contenía la región LacI de Pet21 en las posiciones 1440 a 3176, el MH6 RecA en posiciones 3809 a 5188, gen resistente al cloranfenicol en posiciones 5445 218 (5446 a 5885 y 1 a 218), y el origen p15A de replicación en posiciones 581 1 a 1424. El gen RecA de la

15

6.1.3 CLONACIÓN DEL GEN EPSPS DE ARABIDOPSIS EN EL VECTOR DE EXPRESION BACTERIANA

20

[0070] El fragmento de PCR 1.3 kb de *Arabidopsis* fue digerido con XbaI y BamHI (compatible con BglII) y clonado en el plásmido pACiCLacIMH6EPSPS, en lugar del gen de *Bacillus*.

25

[0071] Los clones obtenidos (seleccionados en cloranfenicol) fueron secuenciados después y positivos confirmados. Uno de los clones confirmados (pAtEPS-12) fue seleccionado y las uniones entre el ADNc y el plásmido de la clonación también fueron confirmadas como idénticas a las secuencias esperadas.

6.1.4 MUTUACIONES PUNTUALES NUEVAS EN EL GEN EPSPS

30

[0072] Diez mutantes diferentes del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* fueron diseñados, (ver figura 2). Para los experimentos de mutagénesis, se diseñaron cebadores de PCR con una, dos o tres mutaciones. Las reacciones PCR se realizaron usando un cebador flanqueador ordinario (5'ATEPS-198: 5'-GAAAGCGTCGGAGATTGTAC-3' (SEC ID NO:44)) y uno de los cebadores de soporte de mutación (ver figura 5).

[0073] Los fragmentos de PCR de 353bp obtenidos fueron purificados (kit de purificación de PCR Qiagen) y su secuencia confirmada. Los fragmentos fueron digeridos después con PstI (subrayado en las secuencias de cebador) y BamHI y ligados al vector pAtEPS-12, el cual había sido previamente digerido con PstI y células competente BamHI.JM 109 (Promega) fueron usadas para la transformación y dispuestas en placas en placas LB comprendiendo cloranfenicol. Unos clones de cada experimento de mutagénesis fueron aislados después y su secuencia fue confirmada.

6.1.5 ENSAYOS DE RESISTENCIA AL GLIFOSATO

[0074] Unas células electrocompetentes de SA4247, una cepa de *Salmonella tifi* LacZ, fueron preparadas según unos procesos bien conocidos.(ver Current Protocols en Molecular Biology, (Wiley and Sons, Inc.)). 30 µl de células competentes SA4247 fueron electroporados con 20 ng de cada proteína de ADN de plásmido codificante de *Arabidopsis* de tipo salvaje y de EPSPS mutantes, EPSPS tipo salvaje de *Bacillus*, junto con una transfección simulada en forma de control. Los ajustes para la electroporación fueron de 25µF, 2.5KV y 200 ohmios. Después de la electroporación, las células fueron transferidas a tubos de cultivo de 15 ml y se les añadió 970µl de medio SOC. Los cultivos fueron incubados durante 1 hora y media a 37°C a 225 r.p.m.. 50 µl de cada cultivo fueron dispuestos en placas en placas LB con 17 µg/ml conteniendo cloranfenicol (en duplicados) e incubados durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, 5 colonias de cada placa fueron seleccionadas y trasladadas a placas M9 e incubadas durante toda la noche a 37°C.

[0075] Las colonias de la incubación durante toda la noche en M9 sólido, fueron inoculadas en 4 ml de liquido medio M9 y dispuestas en crecimiento toda la noche a 37°C. Al día siguiente, 25 ml de medio M9 liquido conteniendo cloranfenicol, IPTG y 17 mM o 0 mM de Glifosato (Aldrich, 33775-7) fueron inoculados con 1-2 ml de cada cultivo durante toda la noche (en duplicados), el OD de inicio (a 600 nm) fue medido y todos los cultivos fueron normalizados para iniciarse en el mismo OD. Una medición de OD fue tomada cada hora durante siete horas. Como un control del crecimiento bacteriano, un cultivo de *Salmonella* no transformado fue inoculado también en un medio LB simple. En dos experimentos independientes, los clones A₁₇₇ I₁₇₈, A₁₇₇ V₁₇₈ A₁₇₇

L178 y L177 no crecieron en medio M9, por lo que no se pudieron realizar los ensayos de resistencia al glifosato.

6.1.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EXPRESADA A PARTIR DE CLONES BACTERIANOS

[0076] Un mililitro de cultivo durante toda la noche de cada uno de los clones bacterianos es inoculado en 100 ml de medio LB líquido conteniendo cloranfenicol. Las células pudieron crecer a 37°C hasta alcanzar un OD de 0.5-0.7 (aproximadamente 3 horas y media). Se añadió después IPTG a los cultivos en una concentración de 1.0 mM. Las células fueron dispuestas en crecimiento durante cinco horas más. Y éstas fueron después granuladas a 4000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C.

[0077] El aislamiento y la purificación de las proteínas marcadas con histidina se realizaron siguiendo el sistema Qiagen Ni-NTA Protein Purification System. Lisatos y eluatos de células fueron formados en duplicados en geles de archilamida a 12.5%. Uno de los geles era teñido con plata para su visualización inmediata, el segundo gel fue transferido sobre una membrana Millipore Immobilon-P, y bloqueado durante toda la noche en 5% de leche en TBS-T. La membrana fue expuesta después a la solución de anticuerpos primarios Anti-His (Amersham Pharmacia Biotech, cat# 37-4710), seguido de una exposición a la solución de anticuerpos secundarios Anti-Mouse-IgG. (NIF825, de sistema de análisis por transferencia Western ECL de Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN2108). Se realizaron lavados y reacciones de detección según las instrucciones del fabricante. Se desarrollaron autoradiogramas después de 5 minutos de exposición.

6.2 RESULTADOS

[0078] Unas células conteniendo una mutación en el gen EPSPS produjo células que eran a la vez resistentes al glifosato herbicida, y que tenían un índice de crecimiento sustancialmente similar en ausencia o presencia de glifosato, en comparación con las células de tipo salvaje, sin tener en cuenta la presencia de glifosato (ver figura 6).

[0079] También se demostró que los clones de *Arabidopsis* conteniendo un gen EPSPS mutante expresaba la proteína mutante sustancialmente al mismo nivel que la proteína de tipo salvaje (ver figura 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0080]

<110> VALIGEN (US), INC

<120> PLANTAS NO TRANSGÉNICAS RESISTENTES AL HERBICIDA

<130> 7991-086-228

<150> 60/158,027

<151> 1999-10-07

<150> 60/173,564

<151> 1999-12-30

<160> 44

<170> FastSEQ para versión Windows 3.0

<210> 1

<211> 2763

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400>1

cccttcatgt	cccttctaga	aaaccattta	tctttcttag	ggcccaattg	aaaaccacac	60
ttttctttca	cctaaccac	caagccttg	caratgttga	cgtgaacacc	aaactaacac	120
gtgtcatact	gccagtggtt	atgataaatg	cctacacac	accagagtc	tagagttttt	180
gggtgggtgaa	agatttgacg	gatgccttct	tctcatttct	caacaaacct	ctccaaacct	240
aaacaaatgt	ttatattagc	aaagccgcca	aagtgtaaac	gaaggtttat	aaacttcatt	300
tctgtgatct	taogtaattg	gagggaagtc	aaaattttca	atccccattc	tccgattgct	360
tcaattgaag	ttcttcogac	ggcgcaagtc	agcagaaact	gcaatgggtg	gcagaaacca	420
tctcttatct	ccaactcttc	gaatccagtc	caacgcacac	ctcccttctc	gggtttctctg	480
aagacgcagc	agcatccacg	agcttatccg	attctgtcgt	cgtggggatt	gaagaagagc	540
gggattgacgt	taattgggtc	tgagcttcgt	cctcttaagg	tcatgtcttc	tgcttccacg	600
gcggagaaag	cgtcggggat	tgtacttcaa	cccattagag	aaatctccgg	tcttattaaq	660
cttctctggc	ccaagctctc	atcaaatcgg	atcctgtctc	tggctgctct	gtctgaggtc	720
tatatcactc	cgttctcgtc	ttctctgtta	tctgaactta	gattataaag	attgataatt	780
taccattttg	ctgtgggttc	atagggaaca	actgtagtcg	acaacttggt	gaatagcgat	840
gacatcaatt	acatgcttga	tgogttgaag	agattgggac	tcaatgtgga	aactgaacgt	900
gaaataatc	gtcgtgtagt	tgaaaggtct	ggcgggatat	tccagccttc	catagattca	960
aagagtgtata	tgaacttca	cctcggtaac	gcagggaacag	caatgcgttc	acttaacgct	1020
gcggtoactg	ctgcaggtgg	aaacgttaagg	tagattgaag	gagttgatgc	ttcttgggtat	1080
ctgatgttta	aggaaatggag	ctttctgtga	tgcctttatga	tccattttat	ccagtcacgt	1140
gcttgatggg	gtgcctcgtg	tgagagaaag	acctataggg	gatttgggtg	ttggtctcaa	1200
gcagcttggc	gctgatgttg	aatgtactct	tggaaactaac	tgocctctcg	ttcgtgtcaa	1260
cgttaattgg	ggccttcccg	gtggaaaggc	tagatcttgc	aaatggcatg	tgaatatgta	1320
atctcgttcc	ttactctatg	aaactctgca	gaatgtgtg	ttcatcatag	ccctagcctg	1380
acaagatctc	agctttttaa	ctactctcaa	cggatggatc	ctaaantaga	atcggatttg	1440
gtgattgggt	ttcgttctcg	attacccgtt	tctgtgtatg	atctcttgat	taacanttag	1500
gagacatgct	atgcatttgc	aggtgaagct	ttctggatca	attagtagtc	agtacttgac	1560
tgtctcgtct	atgtctgtct	ccttagctct	tggagaagtc	gagattgaga	ttgtcgataa	1620
atttaattct	gttccatctg	ttgaastgac	attgaagctg	atggaaacgt	tcgggggttag	1680
tgtcagacat	agtgtatgct	gggatcgttc	cttctgtcaag	ggcgggcaaa	aatacaagta	1740
ggagttatct	ttttcttctc	cttctgaaat	caacatccct	agcttgacaa	tataatgact	1800
aaaaggtgaa	tgattcaggt	ctccgggtcaa	tgcgtatgta	gaaggtgatg	cttctagctg	1860
atgttatctc	ttggctgggtg	ctgccattac	cgggtgaact	gtcacagtcg	aaaggttgtg	1920
aactaccagc	ctgcaggtaa	catctgtaca	ctgaatcacc	gacgaggtcg	ttaagtttat	1980

agtgaattcc	gtctagggtca	aagtttccatc	ttttgacaaq	tgttatataa	catatccgca	2040
agartccaaq	ctcaattttt	gtgatgaatc	ttcggggaga	tgtaaaattc	gccgaggtcc	2100
ttgagaaatc	gggatgtata	gtgtccctga	cagagaaacg	tgtgaactgt	acaggagccac	2160
ctagagatgc	ttctgggaatg	agacacttgc	gggtctattga	tgtcaacatg	aaacaaatgc	2220
ctgatgtagc	catgaccctt	gccgtcgttg	ctctctttgc	tgacgggtcca	accacattta	2280
gagatgggtca	gtaaaaagct	ctctcttata	attaaaggtt	ctcaatcttc	atgatcactt	2340
aattctgttt	gggttaacta	gtggctagct	ggagagtaaa	ggagacagaa	aggtatgattg	2400
ccatttgcac	agagctttaga	aaagtaagag	attcttctct	ctctctttct	gtctcttgac	2460
agtgtcatt	ctaagtaatt	agctcataaa	ttctgtgtgt	tgtgtccagc	tgaggagctac	2520
agtggaaaga	gggttcagatt	attgtgtgat	aactccgccc	aaaaaggtga	aaacggcaga	2580
gattgataca	tatgatgac	atagaatggc	aatggcattc	ctctcttgca	cttgtgctga	2640
tgttccaatc	accatcaacg	actctggctg	caccaggaaa	accttccccg	actaactcca	2700
agtacttgaa	agaatcaaaa	agcaactaac	ataaaactct	gtttcttctt	ctgatccaaq	2760
ctt						2763

<210> 2

<211> 520

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

Met Ala Gln Val Ser Arg Ile Cys Asn Gly Val Gln Asn Pro Ser Leu
1      5      10      15
Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Ser Gln Arg Lys Ser Pro Leu Ser Val
20     25     30
Ser Leu Lys Thr Gln Gln His Pro Arg Ala Tyr Pro Ile Ser Ser Ser
35     40     45
Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Met Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Arg
50     55     60
Pro Leu Lys Val Met Ser Ser Val Ser Thr Ala Glu Lys Ala Ser Glu
65     70     75     80
Ile Val Leu Gln Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Leu Pro
85     90     95
Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser
100    105    110
Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Asn
115    120    125
Tyr Met Leu Asp Ala Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asn Val Glu Thr Asp
130    135    140
Ser Glu Asn Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro
145    150    155    160
Ala Ser Ile Asp Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala
165    170    175
Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly
180    185    190
Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro
195    200    205
Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu
210    215    220
Cys Thr Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Ala Asn Gly
225    230    235    240
Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln
245    250    255
Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ser Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val
260    265    270
Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met
275    280    285

```



```

Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Val Glu His Ser Asp
290                295                300
Ser Trp Asp Arg Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro
305                310                315                320
Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Cys Tyr Phe Leu
325                330                335
Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly
340                345                350
Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys
355                360                365
Met Gly Cys Lys Val Ser Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly
370                375                380
Pro Pro Arg Asp Ala Phe Gly Met Arg His Leu Arg Ala Ile Asp Val
385                390                395                400
Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala
405                410                415
Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg
420                425                430
Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys
435                440                445
Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro
450                455                460
Pro Lys Lys Val Lys Thr Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg
465                470                475                480
Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Ile Thr
485                490                495
Ile Asn Asp Ser Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln
500                505                510
Val Leu Glu Arg Ile Thr Lys His
515                520

```

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 3

```

ctc ggt aat gca gca acg gca atg cgt cca ctt
Leu Gly Asn Ala Ala Thr Ala Met Arg Pro Leu
1          5          10

```

33

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Leu Gly Asn Ala Ala Thr Ala Met Arg Pro Leu
1 5 10

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (33)

<400>5

ctc ggt aat gca gga ata gca atg cgt cca ctc
Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Pro Leu
1 5 10

11

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>6

Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Pro Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (33)

<400> 7

```

ctc ggt aat gca gca ata gca atg cgt cca ctt      33
Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Pro Leu
1           5           10

```

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>8

```

Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Pro Leu
1           5           10

```

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 9

```

ctc ggt aat gca gga ata gca atg cgt tca ctt      33
Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu
1           5           10

```

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>10

Leu	Gly	Asn	Ala	Gly	Ile	Ala	Met	Arg	Ser	Leu
1				5					10	

<210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400>11

ctc	ggt	aat	gca	gca	aca	gca	atg	egt	tea	ctt
Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Met	Arg	Ser	Leu
1				5					10	

33

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>12

Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Met	Arg	Ser	Leu
1				5					10	

<210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (33)

<400>13

```
ctc ggt aat gca gca ata gca atg cgt tca cct
Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Ser Leu
  1              5              10
```

33

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>

14

```
Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Ser Leu
  1              5              10
```

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400>15

ctc ggt aat gca gga gta gca atg cgt tca ctc
 Leu Gly Asn Ala Gly Val Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10

33

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400>16

Leu Gly Asn Ala Gly Val Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10

<210> 17

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (33)

<400>17

ctc ggt aat gca gga tta gca atg cgt tca ott
 Leu Gly Asn Ala Gly Leu Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10

33

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

Leu Gly Asn Ala Gly Leu Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10

<210> 19

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

<400>19

```

ctc ggt aat gca gca gta gca atg cgt oca ctt
Leu Gly Asn Ala Ala Val Ala Met Arg Pro Leu
  1               5               10
    
```

33

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400>20

```

Leu Gly Asn Ala Ala Val Ala Met Arg Pro Leu
  1               5               10
    
```

<210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (33)

<400> 21

ctc ggt aat gca gca tta gca atg cgt cca ctt
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10

33

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400 > 22

Leu Gly Asn Ala Ala Leu Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10

<210> 23

<211> 3831

<212> ADN

<213> Brassica napus

<220>

<221> base-modificada

<222> 1...3831

<223> n=a, c, g, or t

<400> 23

agatcttcaa	ggctottttc	cagtctcacc	taccasmact	ataagaaat	ccacttgctg	60
tctgaatatg	cggacgtgga	taaagtactt	sagacgtggc	acattattat	tggctactag	120
aaaaaaaact	catcacccat	cgtaggagtt	ggggctgggtg	aagaatttga	tgggtgcttc	180
ccccccccc	atccaccas	ctcatgttct	ctgtaangcc	gtcactacaa	caacaaagga	240
gacgacagtt	ctatagaaaa	gctttcaaat	tcaatcaatg	gcgcaatcta	gcagaatctg	300
ccatggcgts	cagaaacctat	gtgttatcat	ctccaatctc	tccaatcca	accanaacaa	360
atcaccttct	tccgtctcct	tgaagacgca	tcagcctcga	gcttcttcgt	ggggattgaa	420
gaagagtgga	acgatgctaa	acggttctgt	aattcgcccg	gttaaggtaa	cagcttctgt	480
ttccacgtcc	gagaaagctt	cagagatctg	gcttcaacca	atcagagaaa	tctcgggtct	540

cactaagcta	cccgatcca	aattctcttc	caatcggatc	ctcttctctg	ccgtctctac	600
tgaggtaacat	atacttggct	agtgttaggc	ctttgtctgt	agattttggg	aactatagac	660
aatttagtaa	gaatttatat	ataattttct	taaaaaaat	cagaagccta	tatatattta	720
aatttttcca	aaatcttctg	aggtctatag	cttatgttac	accattctag	tctgcattct	780
tcggcttctg	actgaagaat	tttatctttt	aaaaaattac	catagggaac	tactgtgtgt	840
gacaacttct	tgaaacgtga	tgacatcaac	tacatgtctg	atgcgttgaa	gaagctgggg	900
cttaacgttg	aacgtgacag	tgtaaaccaac	cgtgcggctg	tcgaaggatg	cggctggaata	960
ttcccgagct	octtagatcc	caagagtgat	attgagttct	accttgggaa	tgagggaaca	1020
gocattgctc	cactcacccg	tgaggttaca	gctgcaggct	gcaacgcgag	gttaaggctaa	1080
cgagtttttt	gttactgtca	agaatttgat	cttctgtctg	atgctcttag	tttgggtctg	1140
tttctagttt	tgtacttgat	gggtgacctc	gaatgaggga	aagacctata	ggagatttgg	1200
ttgttgggtc	taagcagctc	ggtgtgtgat	ttgagtgtag	tcttggcact	aactgtcttc	1260
ctgttctgtg	caatgctaat	ggtggccttc	cgggtggaaa	ggtgatcttc	acatttacct	1320
tatgaattgt	ttgcagcagt	ctttgttcat	cacagccctt	gcttcacatt	atttcatctt	1380
ttagtctgtt	gttatattac	ttgalggatc	tttaaaaagg	aattgggtct	ggtgtgaaag	1440
tgattagcaa	tcttctctga	ttcttctgag	ggcggctggc	attactaagt	gaacatttag	1500
cttatcaacc	cccaaatctt	ctgaaaaaaa	tttagtatat	ggcccccmaa	tagtttttta	1560
aaaaattaga	aaaactctta	ataaatcgtc	tacagtcccn	naaatcttag	agccggccct	1620
gcttcttatg	ttctctgatt	gatataattg	actatgtctt	gaattttcag	gtgaagcttt	1680
ctggatcgat	cagtagtcag	tacttgactg	ccctcctcat	ggcagctcct	ttagctcttg	1740
gagacgtgga	gatttgagac	attgataaac	tgatattctg	tccatattgt	gaaatgacat	1800
tgaaattgat	ggagcgtctt	ggtgttagtg	ccgagcatag	tgatagcttg	ggtcgtttct	1860
ttgtcaaggg	cggctcgaaa	tacaagtta	gagttctctt	aagttgagag	ttagattgaa	1920
gaatgaatga	ctgatttaac	aaatggcaaa	actgattcag	gtcgcctggt	aatgcttatg	1980
tagaagggtg	tgcttctagt	gctagctatt	tcttggcctg	tgctgccatt	actgggtgaa	2040
ctgttactgt	cgaagggtgt	ggaaacaact	gocctccagg	agtttatcca	ctctgaatca	2100
tcamaattta	ttctcccttc	gtttctatgt	aagtgtcatt	agctttttaa	ttttgtttca	2160
ttaaaagtgt	catttttcat	tttcatgca	tatatataat	aaattttcca	gtttttacta	2220
attcattaat	tagcaaaatc	aaacaaaaat	tatatataat	aatgtaaaat	togtaatttg	2280
tgtgcaaatc	ccttaaacct	catgaaacgg	aaaccttatg	aaacagaggg	agtaactaat	2340
ttataataaa	atttgettag	ttcaaaagct	tgtataacat	gttttcttaa	aatctaaagt	2400
catctctctt	ttattttttg	tgtatgaatc	aaaggagatg	gtgaattctg	cagaggtctt	2460
tgagaaaatg	ggatgtaaa	tgtcatggac	agagaaacag	gtgactgtga	ctggaccatc	2520
aagagatgot	tttggaaatg	ggcacttgct	tgtctgtgat	gtcaactatg	acaaaatgcc	2580
tgatgtagcc	atgactctag	cgttctgtgc	tctctttgcc	gatgggtocaa	ccacocatcag	2640
agattggttaa	gcaaaaacct	ctcttctgaat	cagcgtgttt	taaaagattc	atggtttgct	2700
aaactctatt	tggctcaatg	agtggctagc	tggagagtta	aggagacaga	gaggatgatt	2760
gocattttga	cagagcttag	aaaggtaagt	ttctctttct	ctcatgctct	ctcatctgaa	2820
gttaantcgt	gcataacttt	tttgggtttt	ttcttttctg	ttcagcttgg	agctacagtg	2880
gaagaagggt	cagattattg	tgtgataact	ccaccagcaa	agggtgaacc	ggcggagatt	2940
gatacgtatg	atgatcatag	aatggcgatg	gcgttctctg	ttgcagcttg	tgtgatgttt	3000
ccagtcacaa	tcaaggatcc	tggctgaccc	aggaaagact	tccctgacct	cttccaagtc	3060
cttgaaagta	tcacaaagca	ttaaaagacc	cttctctctg	atccaaatgt	gagaaatctg	3120
tgtctttctt	ttgttgcac	tgttaacatt	attagaagaa	caaaagtgtg	gtgttaagag	3180
tgtgtttgtt	tgtaatgaac	tgaatgagat	gcaatcgttg	aatcagtttt	gggctttaat	3240
aaagggttta	ggaagctgca	gcgagatgat	tgttttctg	cgtatcatct	tgaaaatgtg	3300
tttgttctg	taatttttct	agggtttgag	tgattacact	agaaaacact	ttttgatttt	3360
ctattacacc	catagacact	tcttcatagt	gacacacttt	gttcttggca	agcaacagat	3420
tgtgtgcaat	tttgccttta	atggaaagaa	cadagtttgt	gatgggtgat	ttgtggaaga	3480
ttccatgtgt	ggttagggtg	atttctggac	ggatgatgtg	tagatgagtg	atgagttaatg	3540
tgtgaactat	tgatgttaat	gtgttttatg	tagataagtg	gacaaactct	ctgtcttctg	3600
tcataaaaac	tatacaacaa	tacgtggaca	tggactcatg	ttactaaaat	tataccgtta	3660
aacgtggaca	cggactctgt	atctccaaat	caaacacttg	gcttcttctg	ctcaattgat	3720
aaattctctg	cagttcaaac	tcaatcaaga	tgaagaagag	atgatattgt	gaatatgagc	3780
ggagagagaa	atcgaagaa	cgtttacctt	ttgtgggaga	gtaatagatc	t	3840

<210> 24

<211> 1944

<212> ADN

<213> Petunia hybrida

<400> 24

gaattccctc	antcttctact	ttcaagaatg	gcacaaatta	acaatcatggc	tcaaggagata	60
caaaaccccca	atcccaattc	caatttccat	aaaccccag	ttcccaaatc	ttcaagtcttc	120
cttgtttttt	gntctaaaaa	actgaanast	tcagcaaat	ctatgttgg	ttcgaaaaaa	180
gattcaattt	ttatgcacaa	gttttgttcc	tttaggattt	cagcatcagt	ggctacagca	240
cagaagccct	ctgagatagt	gttgcacccc	attaaagaga	tttcaggcac	tgttaaatctg	300
cctggctcra	aatcattatc	caatagaatt	ctctctcttg	ctgccttacc	tgaaggaaaca	360
actgtgggtg	acaattttact	aagttagtgat	gataatccat	acatgctcgg	tgccttgaaa	420
acacttggac	tgcattgtaga	agaagacagt	gcacaccaa	gagctgttgg	tgaagggttgg	480
gggtgggtct	tccctgttgg	taagaggtcc	aaggaaayaa	ttcaactggt	ccttgganaac	540
gcaggaaacag	caatgugggc	actancagca	gcagtctactg	tagcttggctg	aaattcaagg	600
tatgtactttg	atggaggttcc	togaatgaga	gagagaccaa	ttagtgtatt	ggctgttggc	660
cttaaacagc	ttgggtgcaga	gggtgatctg	ttctctggta	cgaaatgtcc	tcctgttcga	720
attgttcagca	agggaggtct	ttctggaggg	aagggtcaagc	ctctgtggatc	catlagcagc	780
caatacttga	ctgctctgct	taaggctgct	ccactggctc	taggagatgt	ggagactgaa	840
atcatttgaca	aactaatctg	tgtaccttat	gtcggagatga	cattgaagtt	gatggagcga	900
tttggctattt	ctgctggagca	cagtatgtagc	tgggacaggt	ctcttgcctg	aggaggtcag	960
aaatcaaatg	ctcctggaaa	agctcttctg	gaaggctgatg	cttcaagtgc	tagctacttc	1020
ctggctgggtg	cagaagtcaa	aggtggaaat	atcaactgttg	aaggctcgttg	gacaaacagt	1080
ttacaggggg	atgtcaaat	tgctgaggta	cttgaaaaaa	tgggagctga	agttacgttg	1140
acagagaaaca	gtgtcacagt	caaaggacct	ccaaaggagt	cttctggggg	gaagcattctg	1200
cgtgccattg	atgtgaacat	gaatcaaatg	cctgtatgtg	ccatgacact	tgtctgttgt	1260
gcactttatg	ctgatggctc	cacagctata	agagatgttg	ctagctggag	agtcaggaa	1320
actgagggca	tgacggccat	atgcacagaa	cttaggaagt	taggagcaac	cgttgaaaga	1380
ggaccagact	actgcataat	caacccacag	gagaaactaa	atgtgacoga	tattgatata	1440
taagatgac	acaggatggc	catggctttt	tctcttggctg	cttctgacga	tgttcccgct	1500
accatcaatg	accctggctg	cacgtggaaa	accttccctt	actactttga	tgtacttcag	1560
cagtactcca	agcattgaac	cgcttcccta	cattgcagaa	tgttaagtta	aatactgtga	1620
gagtttagtt	cttgtacaag	acagggtacg	actgcttgg	atcagaacca	caatgggttc	1680
catctcagct	cagaagggca	ttccaaaggct	togaactctt	taottatttg	cgagtgatga	1740
aatgtatttg	tttagagttga	gcttctcttt	gtcttcaagg	aatgtacact	aatagagtta	1800
agaattacta	gtatgggcca	gtgttaaggag	tactattact	cttctgctat	cttatttgatt	1860
gagttctgtc	aaggatctgg	cttctgcaag	aactactgg	taattttatt	gaatatctoa	1920
tgtgtctaaa	tgaantctgt	tgat				1944

<210> 25

<211> 1335

<212> ADN

<213> Zea Mays

<400>25

gagggtgctg	aggagatcgt	gctgcagccc	atcaggagga	tctccggcac	cgtcaaagctg	60
ccgggggtcca	agtcgcttcc	caaccgggac	ctcctactcg	ccgccctgtc	cgagggggaca	120
acagtgggttg	atnaccctgct	gaacagtgag	gatgtccact	acatgctcgg	ggccttgagg	180
actcttggtc	tccctgtcga	agcggacaaa	gctgcaaaa	gagctgtagt	tgtcggctgt	240
ggtaggaagt	tcccagctga	ggatgctaaa	gagggaagtgc	agctcttctt	ggggaaatgct	300
ggaaactgaa	tgcggccatt	gacagcagct	gttaactgctg	ctggtaggaa	tgcnaacttac	360
gtgcttgatg	gagtaacaaag	aatgaggggag	agacccattg	gcgacttggg	tgtcgggattg	420
aagcagcttg	gtgcagatgt	tgattgtttc	cttggcaactg	actgcocacc	tgttcgtgtc	480
aatggaatcg	gagggtctacc	tggtaggcaag	gtcaaagctgt	ctggctccat	cagcagtcag	540
tacttgagtg	ccttgctgat	ggctgtctct	ttggctcttg	gggatgtgga	gattgaantc	600
attgatcaat	caaccctcat	tcgtacgtc	gaatgacat	tgagattgat	ggagcgtttt	660
ggtaggaag	cagagcattc	tgatagctgg	gacagattct	acattaaagg	aggtcaaaaa	720
tacaagtccc	ctaaaaatgc	ctatgttgaa	ggtagtgctt	caagcgcag	ctatttcttg	780
gctgggtgctg	caattractgg	agggaactgtg	actgtgggag	gttgtggcac	caccagtttg	840

cagggtgatg	tgaagcttgc	tgaggtaactg	gagatgargg	gagcgaagggt	tacatggacc	900
gagactagcg	taactgttac	tggcccaaccg	cgggagccat	tcgggaggaa	acacctcaag	960
gcgattgatg	tcaacatgaa	caagatgccc	gatgtcgcca	tgaotcttgc	tgtgggttgc	1020
ctctttgccc	atggcccgac	agccatcaga	gacgtggctt	cctggagagt	aaaggagacc	1080
gagcggatgg	ttgcgatccg	gacggagcta	accaagctgg	gagcatctgt	tgagggaagg	1140
ccggactact	gcatacatcc	gccgcccggag	aagctgaacg	tgacggcgat	cgaacagtac	1200
gacgaccaca	ggatggccat	ggccttctcc	cttgccgcct	gtgcggagggt	ccccgtcacc	1260
atccgggacc	ctgggtgcac	ccggaagacc	ttccccgact	acttcgatgt	gctgagcact	1320
ttcgtcaaga	atttaa					1335

<210> 26

<211> 516

<212> PRT

<213>Brassisca Napus

<400>26

```

Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1          5          10          15
Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
20          25          30
Val Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys
35          40          45
Lys Ser Gly Thr Met Leu Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys Val
50          55          60
Thr Ala Ser Val Ser Thr Ser Glu Lys Ala Ser Glu Ile Val Leu Gln
65          70          75          80
Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser
85          90          95
Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr
100         105         110
Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Asn Tyr Met Leu Asp
115         120         125
Ala Leu Lys Lys Leu Gly Leu Asn Val Glu Arg Asp Ser Val Asn Asn
130         135         140
Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala Ser Leu Asp
145         150         155         160
Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met
165         170         175
Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr
180         185         190
Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu
195         200         205
Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys Thr Leu Gly
210         215         220
Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Ala Asn Gly Gly Leu Pro Gly
225         230         235         240
Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala
245         250         255
Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile
260         265         270
Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu
275         280         285
Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Ala Gln His Ser Asp Ser Trp Asp Arg
290         295         300
Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Tyr
305         310         315         320
Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala
325         330         335

```

Ile Thr Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu
 340 345 350
 Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Ser Arg Asp
 370 375 380
 Ala Phe Gly Met Arg His Leu Arg Ala Val Asp Val Asn Met Asn Lys
 385 390 395 400
 Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp
 405 410 415
 Gly Pro Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr
 420 425 430
 Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr
 435 440 445
 Val Glu Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro Ala Lys Val
 450 455 460
 Lys Pro Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala
 465 470 475 480
 Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro
 485 490 495
 Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln Val Leu Glu Ser
 500 505 510
 Ile Thr Lys His
 515

<210> 27

<211> 516

<212> PRT

<213> Petunia hybrida

<400>

Met	Ala	Gln	Ile	Asn	Asn	Met	Ala	Gln	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Asn	Pro	1	5	10	15
Asn	Ser	Asn	Phe	His	Lys	Pro	Gln	Val	Pro	Lys	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	20	25	30	
Val	Phe	Gly	Ser	Lys	Lys	Leu	Lys	Asn	Ser	Ala	Asn	Ser	Met	Leu	Val	35	40	45	
Leu	Lys	Lys	Asp	Ser	Ile	Phe	Met	Gln	Lys	Phe	Cys	Ser	Phe	Arg	Ile	50	55	60	
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Pro	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Gln	65	70	75	80
Pro	Ile	Lys	Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	85	90	95	
Leu	Ser	Asn	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	100	105	110	
Val	Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Asp	Ile	His	Tyr	Met	Leu	Gly	115	120	125	
Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Leu	His	Val	Glu	Glu	Asp	Ser	Ala	Asn	Gln	130	135	140	
Arg	Ala	Val	Val	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Leu	Phe	Pro	Val	Gly	Lys	Glu	145	150	155	160
Ser	Lys	Glu	Glu	Ile	Gln	Leu	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Met	165	170	175	
Arg	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Gly	Asn	Ser	Arg	Tyr	180	185	190	
Val	Leu	Asp	Gly	Val	Pro	Arg	Met	Arg	Glu	Arg	Pro	Ile	Ser	Asp	Leu	195	200	205	

```

Val Asp Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Glu Val Asp Cys Phe Leu Gly
  210                215                220
Thr Lys Cys Pro Pro Val Arg Ile Val Ser Lys Gly Gly Leu Pro Gly
  225                230                235                240
Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala
                245                250                255
Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile
                260                265                270
Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu
                275                280                285
Met Glu Arg Phe Gly Ile Ser Val Glu His Ser Ser Ser Trp Asp Arg
                290                295                300
Phe Phe Val Arg Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Lys Ala Phe
  305                310                315                320
Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala
                325                330                335
Val Thr Gly Gly Thr Ile Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Asn Ser Leu
                340                345                350
Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Glu
                355                360                365
Val Thr Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Lys Gly Pro Pro Arg Ser
                370                375                380
Ser Ser Gly Arg Lys His Leu Arg Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys
  385                390                395                400
Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Tyr Ala Asp
                405                410                415
Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr
                420                425                430
Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr
                435                440                445
Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu
  450                455                460
Asn Val Thr Asp Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala
  465                470                475                480
Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Asn Asp Pro
                485                490                495
Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asn Tyr Phe Asp Val Leu Gln Gln
                500                505                510
Tyr Ser Lys His
                515

```

<210> 28

<211> 444

<212> PRT

<213> Zea Mays

<400> 28

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

<210> 29
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutante

<400>29

cggttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctgtt gctgcattac	60
cgag	64

<210> 30
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador Mutante
 <400> 30

cggttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctatt gctgcattac	60
cgag	64

<210>31
 <211>64
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutante

<400>30

cgcttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctatt gctgcattac 60
cgag 64

<210> 31

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Mutante

<400>31

cgcttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgotatt cctgcattac 60
cgag 64

<210> 32

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Cebador mutante

<400> 32

cgcttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctgct gctgcattac 60
cgag 64

<210> 33

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Mutante

<400>33

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctatt gctgcattac
cgag

60
64

<210> 34

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador mutante

<400> 34

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctgtt attgcattac
cgag

60
64

<210> 35

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador mutante

<400> 35

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctact cctgcattac
cgag

60
64

<210> 36

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador mutante

<400> 36

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctaact ccgcattac 60
cgag 64

<210> 37

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador mutante

<400>37

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctaact gctgcattac 60
cgag 64

<210> 38

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador mutante

<400> 38

cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctaact gctgcattac 60
cgag 64

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Petunia hybrida

<400> 39

Leu Phe Leu Gly Asn
1 5

<210> 40

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 40

gctctagaga aagcgtcgga gattgtactt 30

<210> 41

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 41

gcagatctga gctcttagtg ctttgtgatt cttcaagta c 41

<210> 42

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 42

gcgtctagaa aaacgagata aggtgcag 28

<210> 43

<211> 38

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 43

gcggatcctc aggattttt cgaaagctta tttaaag 38

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 44

gaaagcgtcg gagattgtac 20

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de una planta no transgénica, que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfonometilglicina comprendiendo:

(a) la introducción en células vegetales de una oligonucleobase recombinagénica con una mutación objetivo en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen EPSPS mutante que expresa una proteína EPSP que es mutada en una o más posiciones de aminoácidos, dichas posiciones siendo seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₁₇₃, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Ser₉₈, Ser₂₅₅ y Leu₁₉₈ en la proteína EPSPS de Arabidopsis o en un residuo de aminoácido análogo en un gen EPSP de otra especie;

(b) la identificación de una célula vegetal que presenta un crecimiento normal, en comparación con una célula vegetal de tipo salvaje correspondiente en presencia de glifosato; y

(c) la regeneración de una planta no transgénica resistente o tolerante al herbicida que posee dicho gen EPSPS mutado a partir de dicha célula vegetal;

donde la planta no transgénica, resistente o tolerante al herbicida exhibe un crecimiento y desarrollo normales en comparación con el de las plantas correspondientes de tipo salvaje y donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima de tipo salvaje.

2. Método para la producción de una planta no transgénica, que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfonometilglicina, comprendiendo:

(a) la introducción en células vegetales de una oligonucleobase recombinagénica con una mutación objetivo en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen mutante EPSPS que expresa una proteína mutante EPSPS que es mutada en una o más posiciones de aminoácidos, dichas posiciones siendo seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₁₇₃, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Ser₉₈, Ser₂₅₅ y Leu₁₉₈ en la proteína Arabidopsis EPSPS o

en un residuo análogo de aminoácido en un gen EPSP de otra especie;

(b) la identificación de una célula vegetal que posee una proteína EPSPS mutante que tiene la misma actividad catalítica en comparación con una proteína EPSPS correspondiente de tipo salvaje en presencia de glifosato; y

(c) la regeneración de una planta no transgénica resistente o tolerante al herbicida que posee dicho gen EPSPS mutado a partir de dicha célula vegetal;

donde la planta no transgénica resistente o tolerante al herbicida exhibe un crecimiento y desarrollo normal en comparación con el de las plantas correspondientes de tipo salvaje, y donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima de tipo salvaje.

3. Método según la reivindicación 1 o 2 en el que la oligonucleobase recombinagénica es un nucleótido dúplex mezclado o un vector mutacional de oligodeoxinucleótido monocatenario (SSMOV).

4. Método según la reivindicación 3 en el que el nucleótido dúplex mezclado contiene una primera región homóloga que tiene una secuencia idéntica a la secuencia de al menos 6 pares de bases del primer fragmento del gen EPSPS objetivo y una segunda región homóloga que tiene una secuencia idéntica a la secuencia de al menos 6 pares de bases de un segundo fragmento del gen EPSPS objetivo, y una región intermedia que contiene al menos una nucleobase heteróloga al gen EPSPS objetivo, la cual región intermedia conecta las primera y segunda regiones homólogas.

5. Método según la reivindicación 1 o 2 en el que la oligonucleobase recombinagénica es introducida por electroporación.

6. Método según la reivindicación 1 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₉₇, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂ en el gen EPSPS de *Zea mays*.

7. Método según la reivindicación 1 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionados en el grupo que consiste en Leu₁₆₉,

- Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ en el gen EPSPS de una especie de Brassica.
- 5 8. Método según la reivindicación 1 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₉₄ en el gen EPSPS de *Petunia hybrida*.
- 10 9. Método según la reivindicación 1 o 2 en el que las células vegetales son seleccionadas en el grupo que consiste en maíz, trigo, arroz, cebada, semilla de soja, algodón, remolacha azucarera, colza, canola, lino, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, álamo, pino, eucalipto, manzano, lechuga, guisantes, lentejas, uva, césped y especie de Brassica.
- 15 10. Método según la reivindicación 2 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₉₇, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂ en el gen EPSPS de *Zea mays*.
- 20 11. Método según la reivindicación 2 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ en el gen EPSPS de una especie de Brassica.
- 25 12. Método según la reivindicación 2 en el que las posiciones de aminoácidos son seleccionadas en el grupo que consiste en Leu₁₈₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ en el gen EPSPS de *Petunia hybrida*.
- 30 13. Método para la producción de una planta no transgénica que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfonometilglicina comprendiendo:
- (a) la introducción en células vegetales de una oligonucleobase recombinagénica con una mutación objetivo en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen EPSPS mutante que expresa una proteína EPSP que es mutada en dos posiciones de aminoácidos, dichas posiciones siendo seleccionadas en el grupo que consiste en Thr₁₇₈ y Pro₁₈₂, en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* o en un residuo de aminoácido análogo en un gen

EPSP de otra especie donde el Thr₁₇₈ es sustituido por Val o Leu y Pro₁₈₂ es sustituido por Ser;

5 (b) la identificación de una célula vegetal que presenta un crecimiento normal en comparación con una célula vegetal de tipo salvaje correspondiente en presencia de glifosato; y

10 (c) la regeneración de una planta no transgénica, resistente o tolerante al herbicida que tiene dicho gen EPSPS mutado de dicha célula vegetal;

15 donde la planta no transgénica, resistente o tolerante al herbicida exhibe un crecimiento y desarrollo normales en comparación con el de las plantas correspondientes de tipo salvaje, y donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima de tipo salvaje.

20

14. Método según la reivindicación 13 en el que las posiciones de aminoácidos son Thr₁₀₂ y Pro₁₀₆ en el gen EPSPS de Zea mays.

25

15. Método según la reivindicación 13 en el que las posiciones de aminoácidos son Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ en el gen EPSPS de una especie de Brassica.

30

16. Método según la reivindicación 13 en el que las posiciones de aminoácidos son Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ en el gen EPSPS de Petunia hybrida.

Secuencia de ADN

cccttcctgctctttgtagaaccccatctctttctttagggcccattgaaaaccacattttctttcaccctaaccca
 ccaagccttgacatgttgacgtgaacaccaactaacacgtgtcatctgcccagtggttatgatgaatgctcatacc
 ataccagagtcataagctttttggttgggaagattgacggatgctctctctctctctcaccactccctccaa
 cccaacaaatgctttatattagcaagcgcgaagtgtaaacgaaagttataaatttccatttctgtgatctacgta
 attggaggagatcaaatcttccatccccctctctgattgcttccattgaagtttctcg

Inicio del péptido de transito

ATGCGCAAGTTAGCAGAATGTGCAATGTTGTGCGAACCATCTCTTATCTCCAATCTCTGGAATCCAGTCAACGCA
 AATCTCCCTTATCGGTTTCTCTGAAGACGCGAGCATCCAGAGCTTATCGATTTCGTGCTGCTGGGATTGAAGAA
 GAGTGGATGAGGTTAATGGCTCTGAGCTTGTCTCTTAAAGTCATGCTTCTGTTTCCACGGGGAG

Inicio de péptido maduro

AAAGCTCGGAGATTGTACTTCAACCCATTAGAGAAATCTCGGCTCTTATTAGCTTCTGCTCCAACTCTCTATCAA
 ATCGGATCTGCTTCTCGCTCTCTGTGAGSTATATCACTTCTGCTTCTCTGTAACTGAACTTAGATT
 ATAAAGATTGATACTTTACCATTTTCTGTGGTTTATAGGGAACAACCTGTAGTGGACAACCTGTGGAATAGCEATGAC
 ATCAATTACATGCTTGATGCGTTGAAGAGATTGGGACTTAATGTGGAACTGACAGTGAAATAAATGCTGCTGTAGTTG
 AAGGATGTGGGGGATATCCAGCTTCCATAGATTCAAGAGTBAATGGAACCTTACCTCGGTAATGCAAGGAACAGC
 AATGCTGCTACTTACCGCTGCGCTCACTGCTGCAGGTGGAACGCAAGGTAGATTGAAGGAGTTGATGCTTCTTGGTAT
 TTGATGTTTAAAGGAATGGAGCTTTTGTGATGCTTTATGATCCATTTATTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTGCCTCGT
 ATGAGASAAAGACCTATAGGGGATTGGTTGTTGGTCTTAAGCAGCTTGGTCTGATGTTGAATGTACTCTTGGAACTA
 ACTGCCCTCTGTTGCTGTCAACGCTAATGTTGGCTTCCCGGTGGAAGGTTAGATCTTGCAATGGCATGTGAATAT
 GTAACTCGTCTCTTACTCTATGAACACTTGCAAGAAATGTGTTTCAATCATAGCTTAGCTTGACAASATTCAGTTT
 TAATCTACTCTCAAGGATGGATCTTAAATAGAACTCGGATTGGTGAATGGTTTCTGTTCTGATTAAGGTTTCTGTT
 GTATGATTTCTTGATTAACAAATAGGAGACATGTTATGCAATTGCAAGTGAAGCTTTCTGGATCAATAGTAGTCAGTA
 CTTGACTGCTCTGCTCATGCTGCTCCTTAGCTCTTGGAGACGTGAGATTGAGATTGTCGATAAATTAATTTCTGTT
 CCATATGTTGAAATGACATTGAAGTTGATGGAACGTTTGGGGTTAGTGTGAGCATAGTGATAGCTGGGATGCTTTCT
 TTGTCAAGGCGGGCAAAATACAAGTAGGAGTTATTCTTTCTCTCTTTCTGAAATCACATCCCTTAGCTTGACAAT
 ATAATGACTAAAAGGTTGAATGATTAGGTTCTCGGGAATGCGTATGTAGAAGGTGATGCTTCTAGTGCATGTTATTTCT
 TTGGCTGGTCTGCCATTACGGTGAACCTGTCAAGTGAAGGTTGTGGAACCTACAGCTTGCAAGTAATTTGTAC
 ACTGAATCATCGAGAGGCTGTTAAGTTTATAGTGAATTTGCTAGGTCAAAGTTTCATCTTTTGACAAGTTGTATAT
 AACATATTGCAAGATTCTAAGCTCAATTTTGTGATGAATCTCTAGGAGATGTAAAATTGCGGAGGTCTTGAGAA
 AATGGGATGTAAAGTGTCTGGACAGAGAACAGTGTGACTGTGACAGGACCCTAGAGATGCTTTTGGAAATGAGACAC
 TTGGGGCTATTGATGTCAACATGAACAAAATGCTGATGTAGCCATGACCTTGGCGTGTGCTCTCTTTGCTGACG
 GTCCAAACCATTAGAGATGTTAAGTAAAAGCTCTCTCTTATAATTAAAGTTTCTCAATATTCATGATCACTTAAT
 CTGTTTGGTTAATATAGTGGCTAGCTGGAGAGTAAGGAGACAGAAAGGATGATTGCCATTTGCACAGAGCTTAGAAAA
 GTAGAGATTCTTATCTCTCTCTCTCTCTGCTCTTGACAGTCTCATTCTAAGTAAATAGCTCATAAATTTGTGTGTTG
 TGTTCAGCTGGGAGCTACAGTGAAGAAGGTTGAGATTATTGTGTGATAACTCGCCCAAAAGGTGAAAAGGCGAGAG
 ATTGATACATATGATGATCATAGATGGCAATGGCAATCTCTCTGCAAGCTTGTGCTGATGTTCCAATCACCATCAAGG
 ACTCTGGTTGCAACAGGAAAACCTTCCCGACTACTTCCAAGTACTTGAAGAATCACAAGCACTAAACGCTAAAGCTC
 tgttttttcttctgatccagctt

FIG.1A

Secuencia de Proteínas.

MAQVSR?CNGVONPSLISNLKSSORKSPLSVSLKTOCHPRAYPISSWGLKKSNTLIGSELRLKVMSSVSTAE
 KASEIVLQPIREISGLIKLPSSKSLNRIILLALSEGTTVDNLLNSODINYMCDALKRLGLNVE TDSENNRAVV
 EGCGGIFPASIDSKSDIELYLGNAGIAMRPLTAAYTAAGGNASYVLDGVPPHRRPIGDLYVGLKQLGADVECTLG
 TNCPPIRVNANGGLPGGKVKLSGSISSOYL TALLMSAPLALGDVEIEIVDKLISVPYVENTLKLMEFVGVSVEHSO
 SHDRFFVKGGOKYKSPGNAYVEGDASSACYFLAGAAITGETVTVEGCGTTSLOGDVKFAEVLEKMGCKVSWTENS
 TVTGPPRDAFGMRHLRAIDVMNKMPPDVAMTLAVVALFADGPTTIROVASHRVKETERNIAICTELRKL GATVEEG
 SDYCVITPPKKVKTAEIDTYDDHMAAFSLAACADVPITINDSGCTRKTFPDYFQVLERITKH

FIG. 1B

Secuencia de tipo salvaje de *Arabidopsis Thaliana*:

Posición	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183
	L	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L
	CTC	GGT	AAT	GCA	GGA	ACA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT

Secuencias mutantes de *Arabidopsis Thaliana*:

Nombre	
A ₁₇₇	CTC GGT AAT GCA GCA ACA GCA ATG CGT CCA CTT L G N A A T A M R P L
I ₁₇₈	CTC GGT AAT GCA GCA ATA GCA ATG CGT CCA CTT L G N A G I A M R P L
A ₁₇₇ I ₁₇₈	CTC GGT AAT GCA GCA ATA GCA ATG CGT CCA CTT L G N A A I A M R P L
I ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC GGT AAT GCA GGA ATA GCA ATG CGT TCA CTT L G N A G I A M R S L
A ₁₇₇ S ₁₈₂	CTC GGT AAT GCA GCA ACA GCA ATG CGT TCA CTT L G N A A T A M R S L
A ₁₇₇ I ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC GGT AAT GCA GCA ATA GCA ATG CGT TCA CTT L G N A A I A M R S L
V ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC GGT AAT GCA GGA GTA GCA ATG CGT TCA CTT L G N A G V A M R S L
L ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC GGT AAT GCA GGA TTA GCA ATG CGT TCA CTT L G N A G L A M R S L
A ₁₇₇ V ₁₇₈	CTC GGT AAT GCA GCA GTA GCA ATG CGT CCA CTT L G N A A V A M R P L
A ₁₇₇ L ₁₇₈	CTC GGT AAT GCA GCA TTA GCA ATG CGT CCA CTT L G N A A L A M R P L

FIG.2

[illegible]

FIG. 3A

FIG. 3B

[illegible]

FIG. 3C

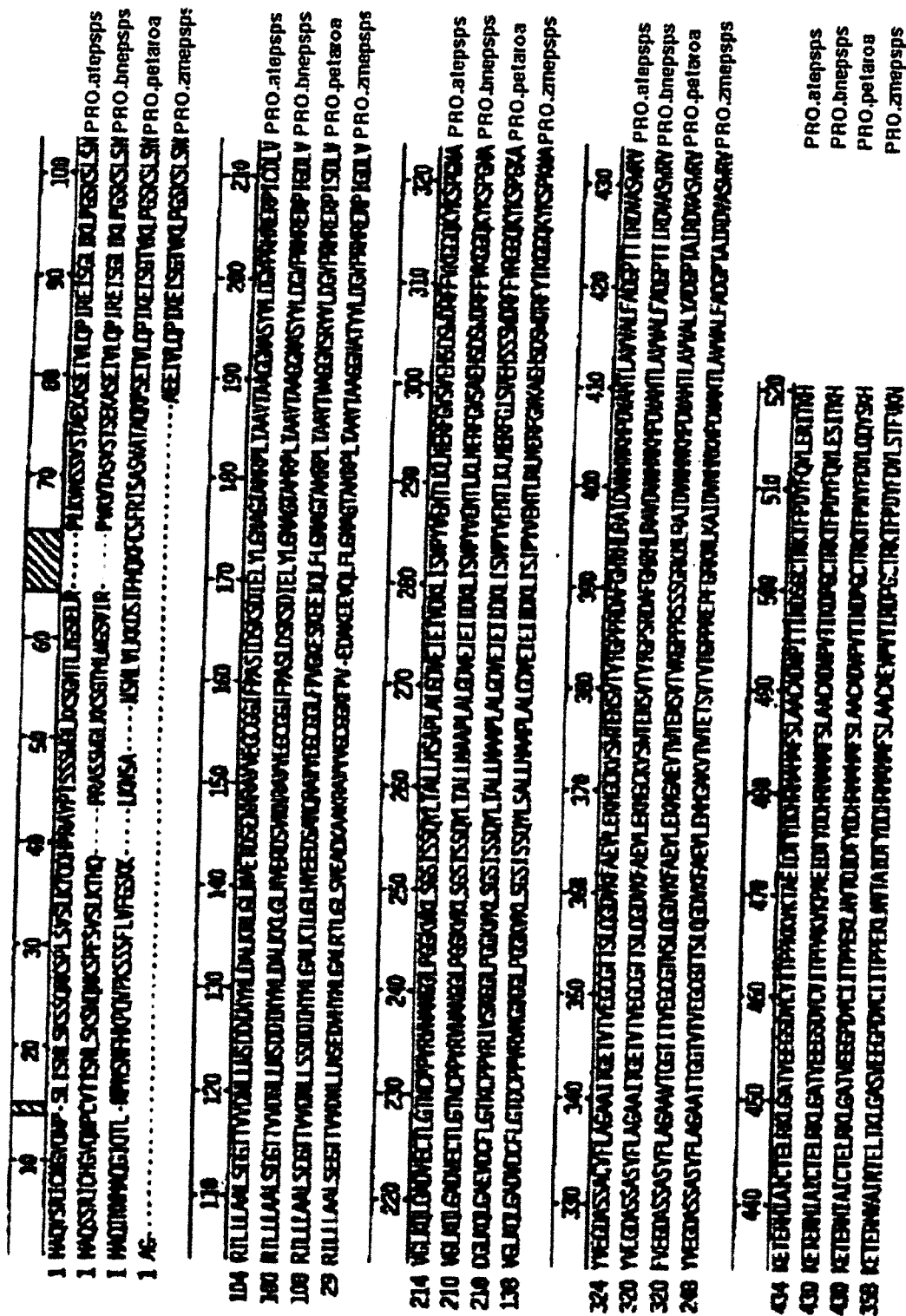


FIG.4

<u>Nombre oligo</u>	<u>Secuencia oligo (5'y 3')</u>
ATEPS-A ₁₇₇	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTGTTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-A ₂	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTATTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-IS	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTATTCTGCATTACCGAG
ATEPS-AS	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTGTTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-AIS	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTATTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-I ₁₇₇	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTGTTATTGCATTACCGAG
ATEPS-VS	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTACTCTGCATTACCGAG
ATEPS-LS	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTAATCTGCATTACCGAG
ATEPS-AV	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTACTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-AL	CGTTTCCAC <u>CTGCAG</u> CAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTAATGCTGCATTACCGAG

FIG.5

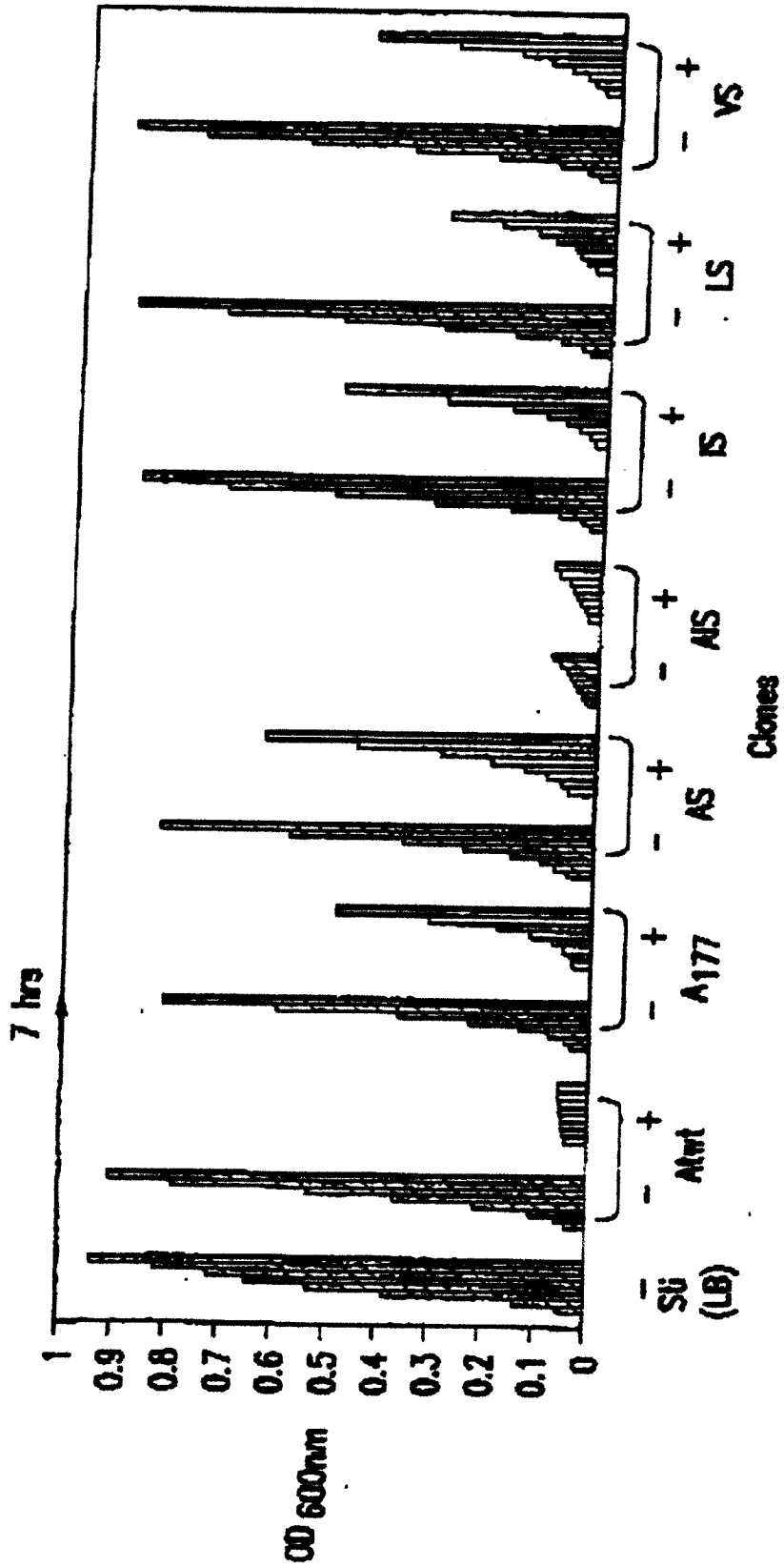


FIG.6

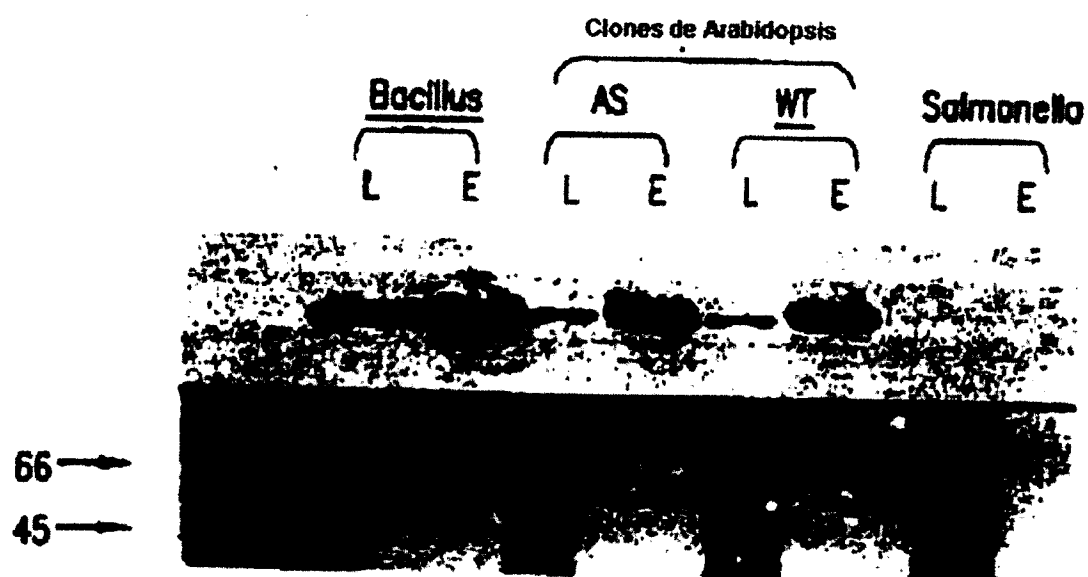


FIG.7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5310667 A [0003]
- US 5866775 A [0003]
- 10 - US 5312910 A [0003]
- US 5145783 A [0003]
- US 4545060 A [0005]
- US 5565350 A, Kmiec [0007] [0012] [0029] [0034]
- US 5731181 A, Kmiec [0008] [0012] [0029] [0034]
- 15 - US 5756325 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 5871984 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 5760012 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 5888983 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 5795972 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- 20 - US 5780296 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 5945339 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 6004804 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 6010907 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- US 0023457 W [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- 25 - WO 9849350 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- WO 9907865 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043] [0060]
- WO 9958723 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- WO 9958702 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- WO 9940789 A [0008] [0012] [0029] [0035] [0043]
- 30 - US 5334711 A [0036]
- EP 629387 A [0036]
- EP 679657 A [0036]
- US 4945050 A [0059]
- US 5100792 A [0059]

- US 5204253 A [0059]
- US 5302523 A, Coffee [0061]
- US 60158027 B, 1999 [0081]
- US 60173564 B, 1999 [0081]

5 Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- Kishore et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1988, vol. 57, 627-663 [0003] [0003] [0004] [0004]
- Schulz et al. *Arch. Microbiol.*, 1984, vol. 137, 121-123 [0003]
- Sost et al. *FEBS Lett.*, 1984, vol. 173, 238-241 [0003]
- 10 - Kishore et al. *Fed. Proc.*, 1986, vol. 45, 1506 [0003]
- Sost Amrhein *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, vol. 282, 433-436 [0003]
- Shah et al. *Science*, 1986, vol. 233, 478-481 [0004]
- Gallois et al. *Methods in Molecular Biology Humana Press* 1996. vol. 55, 89-107 [0063]
- 15 - Kipp et al. *Methods in Molecular Biology Humana Press* 1999. vol. 133, 213-221 [0063]
- Frame et al. *Plant J.*, 1994, vol. 6, 941-948 [0064] *Current Protocols in Molecular Biology Wiley and Sons, Inc.* [0075]