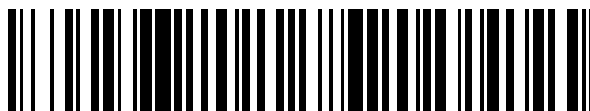


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 112**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2007 E 12152491 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2465340**

54 Título: **EPSPS mutantes**

30 Prioridad:

12.01.2006 US 758439 P

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

24.03.2015

73 Titular/es:

**CIBUS EUROPE B.V. (100.0%)
Choorhoekseweg 8
4424 NW Wemeldinge, NL**

72 Inventor/es:

GOCAL, GREG F.W.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 532 112 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

EPSPS mutantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción de una planta no transgénica resistente o tolerante a un herbicida de la familia de fosfometilglicina, por ejemplo, glifosato. La presente invención también se refiere al uso de una oligonucleobase recombinagénica para producir una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episómicas de una planta en el gen que codifica 5-enol piruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). La proteína mutada, que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, permite la resistencia aumentada o tolerancia de la planta a un herbicida de la familia de fosfometilglicina, y permite el crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta de tipo silvestre independientemente de la presencia del herbicida. La presente invención también se refiere a una célula de *E. coli* que tiene un gen de EPSPS mutado, a una célula vegetal no transgénica en la que se ha mutado el gen de EPSPS, a una planta no transgénica regenerada a partir de esta, así como a una planta que es el resultado de un cruce entre una planta regenerada no transgénica que tiene un gen de EPSPS mutado al igual que uno de los progenitores del cruce. La presente proteína EPSPS mutada se ha cambiado en las posiciones de aminoácidos 178 y 182 en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* (NM 130093) o en un resto de aminoácido análogo en un parálogo de EPSPS.

Antecedentes de la invención

Herbicidas de fosfometilglicina

20 Las plantas tolerantes a herbicidas pueden reducir la necesidad de labranza para controlar las hierbas, de este modo reduciendo de manera eficaz la erosión del suelo. Un herbicida que es objeto de mucha investigación a este respecto es la N-fosfometilglicina, citada comúnmente como glifosato. El glifosato inhibe la ruta del ácido shikímico que conduce a la biosíntesis de compuestos aromáticos, incluyendo aminoácidos, hormonas y vitaminas. Específicamente, el glifosato frena la conversión del ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y del ácido 3-fosfoshikímico a ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímico inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (en lo sucesivo citada como EPSP sintasa o EPSPS). Para los fines de la presente invención, el término "glifosato" incluye cualquier forma eficaz de herbicida de N-fosfometilglicina (incluyendo cualquier sal de la misma), otras formas que sean el resultado de la producción del anión glifosato en plantas y cualesquiera otros herbicidas de la familia de fosfometilglicina.

30 La tolerancia de las plantas a glifosato puede aumentarse introduciendo un gen de EPSPS mutante que tiene una alteración en la secuencia codificante de aminoácidos de EPSPS en el genoma de la planta. Los ejemplos de algunas de las mutaciones en el gen de EPSPS para inducir tolerancia a glifosato se describen en las siguientes patentes: Patente de los Estados Unidos N° 5.310.667; Patente de los Estados Unidos N° 5.866.775; Patente de los Estados Unidos N° 5.312.910; Patente de los Estados Unidos N° 5.145.783. Estas mutaciones propuestas tienen típicamente una K_m mayor para glifosato que la enzima EPSPS de tipo silvestre que confiere el fenotipo tolerante a glifosato, pero estas variantes también están caracterizadas por una K_m para PEP que hacen a la enzima cinéticamente menos eficaz (Kishore y col., 1998, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663; Schulz y col., 1984, Arch. Microbiol. 137:121-123; Sost y col., 1984, FEBS Lett. 173238-241; Kishore y col., 1986, Fed. Proc. 45: 1506; Sost y Amrhein, 1990, Arch. Biochem. Biophys. 282: 433-436). Se seleccionan muchas mutaciones del gen EPSPS para producir una enzima EPSPS que sea resistente a los herbicidas, pero desafortunadamente, la enzima EPSPS producida por el gen de EPSPS mutado tiene una actividad enzimática significativamente inferior a la EPSPS de tipo silvestre. Por ejemplo, la K_m aparente para PEP y la K_i aparente para glifosato para la EPSPS de tipo silvestre de *E. coli* son 10 μM y 0,5 μM , respectivamente, mientras que para un aislado tolerante a glifosato que tiene una sola sustitución de aminoácidos de alanina por glicina en la posición 96, estos valores son 220 μM y 4,0 mM , respectivamente. Se han construido mediante mutagénesis un número de genes de EPSPS tolerantes a glifosato. Igualmente, la EPSPS tolerante a glifosato tenía una eficacia catalítica menor ($V_{\text{máx}}/K_m$), según se demostró por un aumento en la K_m para PEP, y una ligera reducción de la $V_{\text{máx}}$ de la enzima de la planta de tipo silvestre (Kishore y col., 1998, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663).

40 Ya que las constantes cinéticas de las enzimas variantes están alteradas con respecto a PEP, se ha propuesto que elevados niveles de la sobreproducción de la enzima variante, 40-80 veces, puede ser necesaria para mantener una actividad catalítica normal en plantas en presencia de glifosato (Kishore y col., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663). Se ha demostrado que las plantas tolerantes a glifosato pueden producirse insertando en el genoma de la planta la capacidad para producir una cantidad mayor de EPSP sintasa en los cloroplastos de las células (Shah y col., 1986, Science 233, 478-481), dicha enzima es preferentemente tolerante a glifosato (Kishore y col., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:627-663).

55 La introducción de los genes de EPSPS mutantes exógenos en la planta está bien documentada. Por ejemplo, según la Patente de los Estados Unidos N° 4.545.060, para aumentar la resistencia de la planta al glifosato, se introduce en el genoma de la planta un gen que codifica una variante de EPSPS que tiene al menos una mutación que hace a la enzima más resistente a su inhibidor competitivo, es decir, glifosato. Sin embargo, muchas complicaciones y problemas se asocian con estas plantas transgénicas que contiene genes de EPSPS mutantes. Muchas de estas mutaciones dan como resultado una baja expresión del gen de EPSPS mutado o dan como resultado un producto

génico de EPSPS con una actividad enzimática significativamente menor en comparación con la de tipo silvestre. La baja expresión o baja actividad enzimática de la enzima mutada da como resultado niveles anormalmente bajos de crecimiento y desarrollo de la planta.

- 5 Mientras que dichas variantes en las EPSP sintasas han demostrado ser útiles para obtener plantas transgénicas tolerantes al glifosato, puede ser aún más beneficioso obtener una variante de producto génico de EPSPS que sea elevadamente tolerante al glifosato pero aún cinéticamente eficaz, de tal forma que pueda obtenerse una tolerancia mejorada con un nivel de expresión de tipo silvestre.

Oligonucleobases recombinagénicas

- 10 Las oligonucleobases recombinagénicas y su uso para efectuar cambios genéticos en células eucariotas se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.565.350 de Kmiec (Kmiec I). Kmiec I enseña un procedimiento para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. Kmiec I divulga, entre otras cosas, oligonucleobases recombinagénicas que tienen dos hebras, en las que una primera hebra contiene dos segmentos de al menos 8 nucleótidos de tipo ARN que están separados por un tercer segmento de 4 a aproximadamente 50 nucleótidos de tipo ADN, citados como un "segmento de ADN interpuesto". Los nucleótidos de la primera hebra están emparejados por bases a nucleótidos de tipo ADN de una segunda hebra. La primera y la segunda hebra están unidas adicionalmente por un segmento monocatenario de nucleótidos de tal forma que la primera y la segunda hebra son partes de una sola cadena de oligonucleótidos. Kmiec I además enseña un procedimiento para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. Según Kmiec I, las secuencias de los segmentos de ARN se seleccionan para que sean homólogas, es decir, idénticas, con la secuencia de un primer y un segundo fragmento del gen diana. La secuencia del segmento de ADN interpuesto es homóloga con la secuencia del gen diana entre el primer y el segundo fragmento a excepción de una región de diferencia, citada como la "región heteróloga". La región heteróloga puede efectuar una inserción o eliminación, o puede contener una o más bases que están desemparejadas con la secuencia del gen diana para efectuar una sustitución. Según Kmiec I, la secuencia del gen diana se altera de la dirigida por la región heteróloga, de tal forma que el gen diana se hace homólogo con la secuencia de la oligonucleobase recombinagénica.
- 15 Kmiec I enseña específicamente que los nucleótidos que contienen ribosa y 2'-O-metilribosa, es decir, 2'-metoxirribosa, pueden usarse en oligonucleobases recombinagénicas y que los nucleótidos de origen natural que contienen desoxirribosa pueden usarse como nucleótidos de tipo ADN.

- 20 La Patente de los Estados Unidos N° 5.731.181 de Kmiec (Kmiec II) desvela específicamente el uso de oligonucleobases recombinagénicas para efectuar cambios genéticos en células vegetales y desvela ejemplos adicionales de análogos y derivados de nucleótidos de tipo ARN y de tipo ADN que pueden usarse para efectuar cambios genéticos en genes diana específicos. Otras patentes que discuten el uso de oligonucleobases recombinagénicas incluyen: las Patentes de los Estados Unidos 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 la Patente Internacional N° PCT/US00/23457; y las Publicaciones Internacionales de Patente N° WO 98/49350; WO 99/07865, WO 99/58723, WO 99/58702, y WO 99/40789. Las oligonucleobases recombinagénicas incluyen oligonucleótidos en doble hélice mixtos, moléculas que contiene no nucleótidos enseñadas en Kmiec II y otras moléculas enseñadas en las patentes y publicaciones de patente anteriormente mencionadas.

- 30 La patente de los Estados Unidos 6.870.075 (patente '075) desvela un procedimiento para producir plantas no transgénicas resistentes o tolerantes a herbicida que emplean oligonucleobases recombinagénicas según los procedimientos desvelados en Kmiec I y Kmiec II. Los mutantes de EPSPS desvelados en la patente '075 incluyen cambios efectuados en las siguientes posiciones de aminoácidos de la proteína de EPSPS: Leu₁₇₃, Gly₁₇₇, Thr₁₇₈, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Pro₁₈₂, Ser₁₉₈, Ser₂₅₅ y Leu₁₉₈ en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* o en un resto de aminoácido análogo en un parálogo de EPSPS.

- 45 La Solicitud Publicada de patente de los Estados Unidos 20030084473 también desvela el uso de oligonucleobases recombinagénicas para producir plantas no transgénicas resistentes a herbicida en las que la proteína EPSPS se ha cambiado en las posiciones de aminoácidos 126, 177, 207, 438, 479, 480 y/o 505 en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* en un resto de aminoácido análogo en un parálogo de EPSPS.

La presente invención se refiere a mutaciones adicionales de aminoácidos que pueden efectuarse en cualquier gen de EPSPS de cualquier especie para producir un producto génico que posee resistencia al glifosato.

50 **Sumario de la invención**

Brevemente, según la presente invención, se produce una planta no transgénica o una célula vegetal que tiene mutaciones en el gen de EPSPS. La planta resultante tiene resistencia aumentada o tolerancia a un miembro de la familia de fosfonometilglicina, tal como glifosato, y muestra un crecimiento o desarrollo de la planta, sus órganos, tejidos o células sustancialmente normal, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente.

- 55 La materia objeto de la presente invención es un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para producir una planta no transgénica, resistente o tolerante a herbicida. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones preferidas de la misma. El procedimiento comprende introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen de EPSPS

mutante que expresa una proteína EPSPS que está mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto de aminoácido análogo en una EPSPS de otra especie en la que Thr₁₇₉ se cambia a Ile y Pro₁₈₃ se cambia a Ala; seleccionar una célula vegetal que muestra una tolerancia mejorada al glifosato en comparación con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente; y regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicida que tiene un gen de EPSPS mutado de dicha célula vegetal seleccionada.

La materia objeto adicional de la presente invención es un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 para producir una planta no transgénica, resistente o tolerante a herbicida. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones preferidas de la misma. El procedimiento comprende introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen de EPSPS mutante que expresa una proteína EPSPS que está mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto de aminoácido análogo en una EPSPS de otra especie en la que Thr₁₇₉ se cambia a Ile y Pro₁₈₃ se cambia a Ala; identificar una célula vegetal que tiene proteína EPSPS mutante que muestra sustancialmente la misma actividad catalítica que una proteína EPSPS de tipo silvestre, y que muestra esta actividad incluso en presencia de glifosato; y regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicida que tiene un gen de EPSPS mutado de dicha célula vegetal.

La materia objeto adicional de la presente invención es un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 para producir una célula de *E. coli* no transgénica que tiene un gen de EPSPS mutante. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones preferidas de la misma. El procedimiento comprende introducir en células de *E. coli* una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células de *E. coli* con un gen de EPSPS mutante que expresa una proteína EPSPS que está mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ en la que Thr₉₇ se cambia a Ile y Pro₁₀₁ se cambia a Ala; identificar una colonia de células de *E. coli* que tiene un crecimiento sustancialmente normal en presencia de glifosato; y aislar una o más células de *E. coli* que contienen al gen de EPSPS mutante.

La materia objeto adicional de la presente invención es una planta resistente a herbicidas según la reivindicación 9. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones preferidas de la misma. La planta expresa un producto génico de EPSPS mutante en la que el gen de EPSPS está mutado en posiciones para cambiar en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto análogo de aminoácido en un homólogo de EPSPS en el que Thr₁₇₉ se cambia a Ile y Pro₁₈₃ se cambia a Ala.

La materia objeto adicional de la presente invención es una proteína EPSPS mutante que comprende la secuencia de aminoácidos del producto génico de EPSPS de *E. coli* ilustrado en la FIG. 1 o de un homólogo de EPSPS en el que las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ están cambiadas, en las que Thr₉₇ está cambiada a Ile y Pro₁₀₁ está cambiada a Ala, teniendo dicha proteína EPSPS mutante una resistencia o tolerancia aumentada a un herbicida de fosfometilglicina.

La materia objeto adicional de la presente invención es una célula de *E. coli* mutante que expresa un producto génico de EPSPS mutante en la que el gen de EPSPS está mutado para cambiar las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ en el producto génico, en el que Thr₉₇ se cambia a Ile y Pro₁₀₁ se cambia a Ala.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la secuencia de proteica del producto génico de EPSPS (gen AroA) en *E. coli* donde las posiciones de aminoácidos mutadas se ilustran con un recuadro a su alrededor. El aminoácido sustituido en esas posiciones se muestra debajo de la secuencia.

La FIG. 2 muestra la secuencia proteica de ADNc de AtEPSPS - At2g45300 traducida del número de acceso de Genbank NM_130093 (*Arabidopsis*).

La FIG. 3 muestra la secuencia proteica de ADNc de AtEPSPS - At1g48860 traducida del número de acceso de Genbank AF360224T (*Arabidopsis*).

La FIG. 4 muestra la secuencia proteica de ADNc de BnEPSPS - BN-2 2-23 (Canola).

La FIG. 5 muestra la secuencia proteica de ADNc de BnEPSPS - 2-28 de la traducción de ADNc de X51475 (Canola).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La invención debe entenderse de acuerdo con las siguientes definiciones.

Una oligonucleobase es un polímero de nucleobases, dicho polímero puede hibridar por emparejamiento de bases de Watson-Crick a un ADN que tiene la secuencia complementaria.

Las nucleobases comprenden una base, que es una purina, pirimidina, o un derivado o análogo de las mismas. Las nucleobases incluyen nucleobases peptídicas, las subunidades de ácidos nucleicos peptídicos, y nucleobases de morfolino así como nucleósidos y nucleótidos. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un resto de pentosafuranosilo, por ejemplo, un ribósido o 2'-desoxirribósido opcionalmente sustituido. Los nucleósidos pueden enlazarse mediante uno de varios restos de enlace, que pueden contener un fósforo, o no. Los nucleósidos que están enlazados mediante enlaces fosfodiéster no sustituidos se denominan nucleótidos.

Una cadena de oligonucleobase tiene un solo extremo 5' y 3', que son las últimas nucleobases del polímero. Una cadena de oligonucleobase particular puede contener nucleobases de todos los tipos. Un compuesto de oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobase que son complementarias y están hibridadas mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las nucleobases son de tipo desoxirribo o de tipo ribo. Las nucleobases de tipo ribo son nucleobases que contiene pentosafuranosilo en las que el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidroxilo, alquiloxi o halógeno. Las nucleobases de tipo desoxirribo son nucleobases distintas de las nucleobases de tipo ribo e incluyen todas las nucleobases que no contienen un resto de pentosafuranosilo.

Una hebra de oligonucleobase incluye de manera genérica tanto cadenas de oligonucleobase como segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobase. Una hebra de oligonucleobase tiene un extremo 3' y un extremo 5'. Cuando una hebra de nucleobase coexiste con una cadena, los extremos 3' y 5' de la hebra también son los extremos 3' y 5' de la cadena.

De acuerdo con la presente invención, el crecimiento sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula vegetal se define como una velocidad de crecimiento o una velocidad de división celular de la planta, órgano de planta, tejido de planta, o célula vegetal que es al menos un 35 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, o al menos un 75 % de la velocidad de crecimiento o velocidad de división celular en una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína EPSPS de tipo silvestre.

De acuerdo con la presente invención, el desarrollo sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula vegetal se define como la aparición de uno o más eventos del desarrollo en la planta, órgano de planta, tejido de planta o célula vegetal que son sustancialmente los mismos que aquellos que acontecen en una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína EPSPS de tipo silvestre.

Según la presente invención, los órganos de plantas incluyen, pero sin limitación, hojas, brotes, raíces, yemas vegetativas, yemas florales, meristemos, embriones, cotiledones, endospermo, sépalos, pétalos, pistilos, carpelos, estambres, anteras, microesporas, polen, tubos polínicos, óvulos, ovarios y frutos, o secciones, láminas o discos tomados de estos. Los tejidos de plantas incluyen, pero sin limitación, tejidos callosos, tejidos terrestres, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos foliares, tejidos de brotes, tejidos radicales, tejidos glandulares, tejidos de tumores vegetales, y tejidos reproductivos. Las células vegetales incluyen, pero sin limitación, células aisladas con paredes celulares, agregados de las mismas de tamaños variados, y protoplasmas.

Las plantas son sustancialmente "tolerantes" al glifosato cuando son sometidas a este y proporcionan una curva de dosis/respuesta que se desplaza a la derecha en comparación con la proporcionada por plantas no tolerantes sometidas a este de manera similar. Dichas curvas de dosis/respuesta tienen la dosis representada en el eje X y "porcentaje de muerte", "efecto herbicida", etc., representado en el eje Y. Las plantas tolerantes necesitarán más herbicida que las plantas similares no tolerantes para producir un efecto herbicida dado. Las plantas que son sustancialmente "resistentes" al glifosato muestran pocas lesiones, en caso de haberlas, necróticas, líticas, cloróticas u otras, cuando se someten a glifosato a concentraciones y velocidades que se emplean típicamente por la comunidad agroquímica para eliminar 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" dentro del contexto de la presente solicitud.

La expresión "homólogo de EPSPS" o cualquier variación, por lo tanto, se refiere a un gen de EPSPS o producto génico de EPSPS encontrado en otra especie vegetal que efectúa la misma o sustancialmente la misma función biológica que los genes de EPSPS desvelados en el presente documento y donde las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas (del producto génico de EPSPS) se dicen que son "idénticas" o al menos similares en un 50 % (también citado como "identidad porcentual" o "sustancialmente idénticas") tal como se describe a continuación. Dos polinucleótidos o polipéptidos son idénticos si la secuencia de nucleótidos o de restos de aminoácidos, respectivamente, en las dos secuencias son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia tal como se describe más adelante. Las expresiones "idénticas" o "identidad porcentual" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos especificado que es igual, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia en una ventana de comparación, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineamiento manual e inspección visual. Para los polipéptidos donde la secuencia difiere en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para efectuar este ajuste se conocen bien por los expertos en la materia. Típicamente, eso implica puntuar una sustitución conservativa como una parcial en vez de una falta completa de coincidencia, de este modo aumentando el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo

tanto, por ejemplo, en los casos donde se da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1, y a una sustitución no conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación de entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula según, por ejemplo, el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17 (1988) por ejemplo, implementado en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., EE.UU.).

Las expresiones "sustancialmente idénticas" o "identidad porcentual" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 50 %, ventajosamente un 60 %, preferentemente un 70 %, más preferentemente un 80 %, y lo más preferentemente un 90-95 % de identidad de nucleótidos o de restos de aminoácidos cuando se alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Esta definición también se refiere a complemento de una secuencia de ensayo, que tiene una complementariedad de secuencia o de subsecuencia sustancial cuando la secuencia de ensayo tiene una identidad sustancial con una secuencia de referencia.

Un experto en la técnica reconocerá que dos polipéptidos pueden ser "sustancialmente idénticos" si los dos polipéptidos son inmunonológicamente similares. Por lo tanto, la estructura proteica general será similar mientras que la estructura primaria de los dos polipéptidos muestra una variación significativa. Por lo tanto, un procedimiento para medir si dos polipéptidos son sustancialmente idénticos implica medir la unión de anticuerpos monoclonales o policlonales a cada polipéptido. Dos polipéptidos son sustancialmente idénticos si los anticuerpos específicos para un primer polipéptido se unen a un segundo polipéptido con una afinidad de al menos una tercera parte de la afinidad para el primer polipéptido. Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como secuencia de referencia, con la que las secuencias de ensayo se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si fuese necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia (o secuencias) de ensayo en relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *0.4dv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 5 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), mediante programas informáticos para alineamientos, tales como VECTOR NTI Versión N° 6 de InforMax, Inc. MD, EE.UU., mediante los procedimientos descritos en ClustalW, Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 o mediante inspección visual (véase, de manera general, *Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Suplemento) (Ausubel)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul y col. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 33 89-3402, respectivamente. El programa para efectuar análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de entrada, que bien cumplen o satisfacen algunas puntuaciones umbral T valoradas positivamente cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se cita como el umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul y col., anteriormente citado). Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP mayores que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de la secuencia siempre que la puntuación acumulativa pueda aumentarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación acumulativa de alineamiento se sale en la cantidad X de su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa se va a cero o menor, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de una de las dos secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T , y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLSTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)). Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también efectúa un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que

proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede suceder por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo al ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

En la puesta en práctica de la presente invención se produce una planta no transgénica o una célula vegetal que tiene mutaciones en el gen de EPSPS. La planta resultante tiene resistencia aumentada o tolerancia a un miembro de la familia de fosfometilglicina, tal como glifosato, y muestra un crecimiento o desarrollo de la planta, sus órganos, tejidos o células sustancialmente normal, sus órganos, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente. El gen mutado produce un producto génico que tiene sustituciones en las posiciones de aminoácidos 179 y 183 del producto AF 360244 del gen de EPSPS de *Arabidopsis* o en una posición de aminoácidos análoga en un homólogo de EPSPS en el que Thr179 se cambia a Ile y Pro183 se cambia a Ala. Preferentemente, la planta mutada es resistente al glifosato y tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína EPSPS de tipo silvestre.

Para identificar genes de EPSPS mutantes que puedan producir un producto génico que proporcione resistencia al glifosato, puede efectuarse una exploración *in vitro* en un sistema bacteriano para ahorrar tiempo y recursos. Pueden generarse curvas de crecimiento de colonias de bacterias que expresan genes de EPSPS mutantes candidatos para evaluar si los genes de EPSPS mutantes proporcionan un fenotipo resistente al glifosato. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 6.870.075 desvela un ensayo de resistencia a glifosato en *Salmonella* que emplea genes de EPSPS mutantes de *Arabidopsis* transformados en una cepa LacZ-*Salmonella typhi*. El gen de EPSPS de *E. coli*, también llamado el gen AroA, puede usarse para evaluar la resistencia a glifosato de mutantes de EPSPS. Los ensayos de curva de crecimiento que miden los valores de K_i y K_m para los mutantes candidatos se llevan a cabo de acuerdo con técnicas de ensayo bien conocidas. Una vez se ha identificado un mutante resistente a glifosato en el gen de EPSPS de *E. coli*, se muta un aminoácido análogo en un gen de EPSPS de planta con nucleobases recombinagénicas tal como se describe en el presente documento para producir una planta resistente al glifosato.

Las sustituciones de aminoácidos en el producto del gen de EPSPS (AroA) de *E. coli* de acuerdo con la presente invención incluyen las siguientes:

Thr₉₇Ile y
Pro₁₀₁Ala

en las que el aminoácido a la izquierda del número en subíndice es el aminoácido nativo y el aminoácido a la derecha del número en subíndice es el aminoácido mutante.

Las posiciones correspondientes de aminoácidos en especies de plantas se cambian de acuerdo con la presente invención para producir una planta resistente a herbicida no transgénica. A continuación se expone una lista de algunos cultivos preferidos que lista las posiciones de aminoácidos en el gen de EPSPS que se cambian. Las sustituciones de aminoácidos según la presente invención se listan a la derecha del número de posición del aminoácido.

Para el maíz:

Thr₁₀₂Ile y
Pro₁₀₆Ala

Para el algodón:

Thr₉₇Ile y
Pro₁₀₁Ala

Para el arroz:

Thr₁₆₉Ile y
Pro₁₇₃Ala

Para *Brassica napus* (2-28 de la traducción de ADN_g X51475):

Thr₁₇₄Ile y
Pro₁₇₈Ala

Para *Arabidopsis thaliana* (AF360224):

Thr₁₇₉Ile y
Pro₁₈₃Ala

Para *Petunia hybrida*:

Thr₁₇₄Ile y
Pro₁₇₈Ala

5 Como se apreciará, *E. coli* no es una planta. Sin embargo, se contempla en la presente invención ya que el gen de *E. coli* puede mutarse en un sistema de cultivo de células bacterianas y después puede ensayarse la actividad enzimática del producto génico de *E. coli* (K_I y K_M) que indicará la resistencia a glifosato y la función como un producto enzimático necesario que es esencial en plantas. Una vez se ha identificado un mutante de *E. coli* mutado, se efectúa esa mutación en una célula vegetal empleando las oligonucleobases recombinagénicas descritas en el presente documento para producir una planta no transgénica resistente a herbicida. Por estos motivos, *E. coli* mutada y las proteínas AroA mutadas se consideran parte de la presente invención.

10 La siguiente tabla lista posiciones de sustituciones de aminoácidos según la presente invención, por el número de aminoácido, para varias especies. Al efectuar sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención en estas posiciones producirá plantas resistentes a glifosato:

Proteína	Nº de acceso de GenBank	T97	P101
<i>E. coli</i>	X00557	97	101
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF360224	179	183
<i>Petunia hybrida</i>	M21084.1	174	178
<i>Brassica napus</i>	X51475.1	174	178
<i>Zea mays</i>	X63374	102	106
<i>Oryza sativa</i>	AF413082	169	173
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM 130093	178	182

15 Como puede observarse a partir de la tabla anterior y de las Fig. 1-5 hay algunas variaciones menores entre los genes de EPSPS entre especies y dentro de las especies. Esto es de esperar. Estas variaciones menores deben tenerse en cuenta cuando se produzcan mutantes según la presente invención. Los aminoácidos en posiciones análogas entre los diferentes genes se mutan para producir plantas resistentes a glifosato. Por ejemplo, la mutación en AF360224 de *Arabidopsis* en la posición 179 (T>A) será equivalente a la mutación T>A en la posición 178 de NM 130093 de *Arabidopsis*.

20 Además, algunas especies tienen más de un gen de EPSPS. En dicho caso, se mutan uno o más de los genes según la presente invención para producir un mutante resistente a glifosato. Si los niveles de expresión de los diversos genes de EPSPS se conocen y son diferentes, se prefiere mutar los genes de EPSPS de mayor expresión. En una realización preferida, todos los genes de EPSPS en un cultivo se mutan para producir un fenotipo de glifosato. Por ejemplo, se sabe que la colza tiene cuatro genes de EPSPS. Dos genes se muestran en las Fig. 4 y 5. Una comparación mostrará una ligera diferencia entre los dos genes.

25 La planta mutada según la presente invención puede ser de cualquier especie de planta dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma, incluyendo cualquier especie de planta leñosa que crezca como un árbol o como un arbusto, cualquier especie herbácea, o cualquier especie que produzca frutos comestibles, semillas o vegetales, o cualquier especie que produzca flores coloridas o aromáticas. Por ejemplo, la planta puede seleccionarse de una especie de planta del grupo que consiste en canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, batata, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, banana, melón, patata, zanahoria, lechuga, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisante, cacahuete, habas, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y hierbas de forraje, lino, colza, pepino, enredadera, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, tulipán, iris, lirio, y plantas productoras de frutos secos siempre que no se hayan mencionado ya específicamente.

30 La oligonucleobase recombinagénica puede introducirse en una célula vegetal usando cualquier procedimiento usado de manera común en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, microtransportadores (administración biolística), microfibras (patillas), electroporación, captación directa de ADN y microinyección. Los ejemplos ilustrativos de una oligonucleobase recombinagénica se describen a continuación.

La invención puede ponerse en práctica con oligonucleobases recombinagénicas que tienen las conformaciones y químicas descritas en las patentes Kmiec I y Kmiec II. Kmiec I enseña un procedimiento para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. Las oligonucleobases recombinagénicas en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos hebras complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos de tipo ARN (un "segmento de ARN") que está emparejado por bases a nucleótidos de tipo ADN de la otra hebra.

Kmiec II desvela que los nucleótidos que contienen bases de purina y pirimidina pueden sustituirse por nucleótidos. Las Patentes de los Estados Unidos 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 la Patente Internacional N° PCT/US00/23457; y las Publicaciones Internacionales de Patente N° WO 98/49350; WO 99/07865, WO 99/58723, WO 99/58702, WO 99/40789, US 6.870.075; y la Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos 20030084473 desvelan moléculas recombinagénicas adicionales que pueden usarse para la presente invención. La expresión "oligonucleobase recombinagénica" se usa en el presente documento para indicar las moléculas que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención e incluyen oligonucleótidos en doble hélice mixtos, moléculas que contienen nucleótidos enseñadas en Kmiec II, oligodesoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas recombinagénicas enseñadas en las patentes y publicaciones de patentes anteriormente mencionadas.

En una realización, la oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido de doble hélice mixto en el que los nucleótidos de tipo ARN del oligonucleótido de doble hélice mixto se hacen resistentes a RNasa reemplazando el 2'-hidroxilo con una funcionalidad fluoro, cloro o bromo o poniendo un sustituyente en el 2'-O. Los sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes enseñados por Kmiec II. Los sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes enseñados por la Patente de los Estados Unidos N° 5.334.711 (Sproat) y los sustituyentes enseñados por las Publicaciones de Patente EP 629 387 y EP 679 657 (de manera colectiva, las Solicitudes Martin). Como se usa en el presente documento, un derivado 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un sustituyente 2'-OH con un sustituyente descrito en las Solicitudes Martin o Sproat se denomina "Ribonucleótido 2'-sustituido". Tal como se usa en el presente documento, la expresión "nucleótido de tipo ARN" significa un nucleótido 2'-hidroxilo o 2'-sustituido que está enlazado a otros nucleótidos de un oligonucleótido de doble hélice mixto por un enlace fosfodiéster no sustituido o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "nucleótido de tipo desoxirribo" significa un nucleótido que tiene un 2'-H, que puede enlazarse a otros nucleótidos de un MDON mediante un enlace fosfodiéster no sustituido o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II.

En una realización de la presente invención, la oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido de doble hélice mixto que está enlazado únicamente por enlaces fosfodiéster no sustituidos. En realizaciones alternativas, el enlace es mediante fosfodiésteres sustituidos, derivados fosfodiéster y enlaces no basados en fósforo tal como se enseña por Kmiec II. En otra realización más, cada molécula de tipo ARN en el oligonucleótido de doble hélice mixto es un nucleótido 2'-sustituido. Las realizaciones particularmente preferidas de ribonucleótidos 2'-sustituidos son ribonucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxiletiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Las realizaciones más preferidas de ribonucleótidos 2'-sustituidos son nucleótidos sustituidos en 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi, y 2'-aliloxi. En otra realización, el oligonucleótido de doble hélice mezclado se enlaza mediante enlaces fosfodiéster no sustituidos.

Aunque se sintetizan de manera más conveniente los oligonucleótidos de doble hélice mixto que tienen un solo tipo de nucleótido de tipo ARN 2'-sustituido, los procedimientos de la invención pueden ponerse en práctica con oligonucleótidos de doble hélice que tienen dos o más tipos de nucleótidos de tipo ARN. La función de un segmento de ARN puede no verse afectada por una interrupción causada por la introducción de un desoxinucleótido entre dos trinucleótidos de tipo ARN, por consiguiente, la expresión "segmento de ARN" abarca dicho "segmento de ARN interrumpido". Un segmento de ARN no interrumpido se cita como un segmento de ARN contiguo. En una realización alternativa, un segmento de ARN puede contener nucleótidos resistentes a RNasa y 2'-OH no sustituidos alternos. Los oligonucleótidos de doble hélice mixtos tienen preferentemente menos de 100 nucleótidos y más preferentemente menos de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. La primera y la segunda hebra están emparejadas por emparejamiento de bases de Watson-Crick. En una realización, las hebras del oligonucleótido de doble hélice mixtos están unidos covalentemente mediante un enlazante, tal como por un hexa, penta o tretranucleótido monocatenario de tal forma que la primera y la segunda hebra son segmentos de una sola cadena de oligonucleótido que tiene un solo extremo 3' y un solo extremo 5'. Los extremos 3' y 5' pueden protegerse mediante la adición de una "tapa en horquilla" en la que los nucleótidos 3' y 5' terminal están emparejados por emparejamiento de Watson-Crick a nucleótidos adyacentes. Una tapa en horquilla secundaria puede, además, situarse en la unión entre la primera y la segunda hebra distantes de los extremos 3' y 5', de tal forma que se estabiliza el emparejamiento de Watson-Crick entre la primera y la segunda hebra.

La primera y la segunda hebra contienen dos regiones que son homólogas a dos fragmentos del gen de EPSPS diana, es decir, tienen la misma secuencia que los genes diana. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y pueden contener uno o más nucleótidos de tipo ADN de segmento de ADN conector y también pueden contener nucleótidos de tipo ADN que no se encuentran en el segmento de ADN interviniente. Las dos regiones de homología se separan mediante, y cada una es adyacente a, una región que tiene una secuencia que difiere de la secuencia del gen diana, citada como una "región heteróloga". La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos desemparejados. Los nucleótidos desemparejados pueden ser contiguos o, como alternativa,

separarse mediante uno o dos nucleótidos que son homólogos con el gen diana. Como alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción de uno, dos, tres o de cinco o menos nucleótidos. Como alternativa, la secuencia del oligonucleótido de doble hélice mixto puede diferir de la secuencia del gen diana solo por la eliminación de uno, dos, tres, o cinco o menos nucleótidos del oligonucleótido de doble hélice mixto. La longitud y posición de la región heteróloga, en este caso, se considera la longitud de la eliminación, aunque ningún nucleótido del oligonucleótido de doble hélice mixto se encuentre dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos del gen diana que son complementarios a las dos regiones homólogas es de manera idéntica la longitud de la región heteróloga cuando se pretende una sustitución o sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones se separan de este modo en el oligonucleótido de doble hélice mixto más allá de lo que lo están sus fragmentos homólogos complementarios en el gen, y lo contrario es aplicable cuando la región heteróloga codifica una eliminación.

Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos de doble hélice mixtos son cada uno parte de una región homóloga, es decir, una región que es idéntica en secuencia a un fragmento del gen diana, conteniendo dichos segmentos juntos al menos 13 nucleótidos de tipo ARN y preferentemente de 16 a 25 nucleótidos de tipo ARN o aún más preferentemente 18-22 nucleótidos de tipo ARN o lo más preferentemente 20 nucleótidos. En una realización, los segmentos de ARN de las regiones de homología se separan mediante y son adyacentes a, es decir, "conectadas por" un segmento de ADN interviniente. En una realización, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN interviniente. Un segmento de ADN interviniente que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido de doble hélice mixto se denomina un "segmento mutador".

El cambio a introducir en el gen de EPSPS diana se codifican por la región heteróloga. El cambio a introducir en el gen de EPSPS puede ser un cambio en una o en más bases de la secuencia del gen de EPSPS que cambia en el aminoácido nativo en esa posición al aminoácido deseado.

En otra realización de la presente invención, la oligonucleobase recombinagénica es un vector mutacional de oligodesoxinucleótido monocatenario o SSOMV, que se desvela en la Solicitud Internacional de Patente PCT/US00/23457. La secuencia de SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales descritos en las Patentes de los Estados Unidos 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 las Publicaciones Internacionales N° WO 98/49350; WO 99/07865, WO 99/58723, WO 99/58702, WO 99/40789, US 6.870.075; y en la Solicitud de Patente Publicada 20030084473. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas con la secuencia diana separadas por una región que contiene la alteración genética deseada citada como región mutadora. La región mutadora puede tener una secuencia que tiene la misma longitud que la secuencia que separa a las regiones homólogas en la secuencia diana, pero que tiene una secuencia diferente. Dicha región mutadora causará una sustitución.

Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que están unidos mediante enlaces fosfodiéster no modificados excepto que el enlace internucleótido 3' terminal y/o 5' terminal o como alternativa, los dos enlaces internucleótido 3' terminal y/o 5' terminal pueden ser un fosforotioato o fosfoamidato. Tal como se usa en el presente documento, un enlace internucleótido es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace entre el nucleótido 3' final o el nucleótido 5' final y un sustituyente bloqueante, véase más arriba. En una realización específica, la longitud del SSOMV es de entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología tienen, por consiguiente, una longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deben tener cada una longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

El SSOMV puede diseñarse para ser complementario con la hebra codificante o la no codificante del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una sola base, se prefiere que los dos nucleótidos mutadores sean una pirimidina. Hasta el punto en que sea coherente con lograr el resultado funcional deseado, se prefiere que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido diana en la hebra complementaria sean pirimidinas. Se prefieren particularmente SSOMV que codifiquen mutación por transversión, es decir, un nucleótido mutador de C o T se desempareja, respectivamente, con un nucleótido C o T en la hebra complementaria.

Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un sustituyente bloqueante en 5' que está unido a los carbonos 5' terminales a través de un enlazante. La química del enlazante no es crítica más allá de su longitud, pero debe ser preferentemente de 6 átomos de longitud y el enlazante debe ser flexible. Puede usarse una variedad de sustituyentes no tóxicos, tales como biotina, colesterol u otros esteroides o un colorante fluorescente catiónico no intercalante. Los reactivos vendidos como Cy3TM y Cy5TM por Glen Research, Sterling VA, se prefieren particularmente como reactivos para preparar el SSOMV, que son fosforamiditas bloqueadas que tras la incorporación en un oligonucleótido producen indomonocarbocianina sustituida con 3,3,3',3'-tetrametilo y N,N'-isopropilo y colorantes de indodicarbocianina, respectivamente. Cy3 es el más preferido. Cuando la indocarbocianina está sustituida por N-oxialquilo, puede unirse convenientemente al 5' terminal del oligodesoxinucleótido mediante un fosfodiéster con un fosfato 5' terminal. La química del enlazante colorante entre el colorante y el oligodesoxinucleótido no es crítica y se selecciona por conveniencia sintética. Cuando la fosforamidita Cy3 disponible comercialmente se usa según se indica, la modificación 5' resultante consiste en un sustituyente bloqueante y enlazante juntos que son un una indomonocarbocianina de N-hidroxiisopropilo, N'-fosfatidilpropilo y 3,3,3',3'-tetrametilo.

En una realización preferida, el colorante de indocarbocianina está tetrasustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitación en cuanto a la teoría, estas sustituciones evitan que el colorante sea un colorante intercalante. La identidad de los sustituyentes en estas posiciones no es crítica. El SSOMV puede además tener un sustituyente 3' bloqueante. Nuevamente, la química del sustituyente 3' bloqueante no es crítica.

- 5 En otra realización preferida, el oligonucleótido recombinagénico es un oligodesoxinucleótido monocatenario que tiene un nucleótido 3' terminal, un nucleótido 5' terminal, que tiene al menos 25 desoxinucleótidos y no más de 65 desoxinucleótidos, y que tiene una secuencia que comprende al menos dos regiones de al menos 8 desoxinucleótidos cada una que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen cromosomal diana, teniendo dichas regiones juntas al menos 24 nucleótidos de longitud, y estando dichas regiones separadas por al menos un nucleótido en la secuencia del gen cromosomal diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido o ambas de tal forma que la secuencia del oligodesoxinucleótido no es idéntica a la secuencia del gen cromosomal diana. Véase la Patente de Estados Unidos 6.271.360.

Microtransportadores y microfibras

- 15 El uso de microtransportadores metálicos (microesferas) para introducir grandes fragmentos de ADN en células vegetales que tienen paredes celulares de celulosa mediante penetración de proyectiles se conoce bien por los expertos en la técnica relevante (en lo sucesivo administración biolística). Las Patentes de los Estados Unidos N° 4.945.050; 5.100.792 y 5.204.253 describen técnicas generales para seleccionar microtransportadores y dispositivos para proyectarlos. Las Patentes de los Estados Unidos N° 5.484.956 y 5.489.520 describen la preparación de maíz transgénico fértil usando bombardeo con microproyectiles en tejido caloso de maíz. Las técnicas biolísticas también se usan para transformar embriones de maíz inmaduros.

- 20 Las condiciones específicas para usar microtransportadores en los procedimientos de la presente invención se describen en la Publicación Internacional WO 99/07865. En una técnica ilustrativa, se añaden por orden microtransportadores enfriados en hielo (60 mg/ml), oligonucleótido en doble hélice mixto (60 mg/ml) CaCl₂ 2,5 M y espermidina 0,1 M, la mezcla se agita suavemente, por ejemplo, por agitación vorticial, durante 10 minutos y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras los cuales los microtransportadores se diluyen en 5 volúmenes de etanol, se centrifugan y se resuspenden en etanol al 100 %. Pueden obtenerse buenos resultados con una concentración en la solución adherente de 8-10 µg/µl de microtransportadores, 14-17 µg/ml de oligonucleótido de doble hélice mixto, CaCl₂ 1,1-1,4 M y espermidina 18-22 mM. Se observaron resultados óptimos en las condiciones de 8 µg/µl de microtransportadores, 16,5 µg/ml de oligonucleótido de doble hélice mixto, CaCl₂ 1,3 M y espermidina 21 mM.

- 25 Las oligonucleobases recombinagénicas también pueden introducirse en células vegetales para la práctica de la presente invención usando microfibras para penetrar la pared celular y la membrana celular. La Patente de los Estados Unidos N° 5.302.523 de Coffee y col. describe el uso de carburo de silicio 30 veces 0,5 µm y 10 veces 0,3 µm para facilitar la transformación de cultivos de maíz en suspensión de la variedad Black Mexican Sweet. Puede usarse cualquier técnica mecánica que pueda usarse para introducir ADN para la transformación de una planta usando microfibras para administrar oligonucleobases recombinagénicas para su uso en la preparación de los presentes mutantes de EPSPS. El procedimiento desvelado por Coffee y col en la Patente de los Estados Unidos N° 5.302.523 puede emplearse con materiales de células vegetales regenerables para introducir las presentes oligonucleobases recombinagénicas para efectuar la mutación del gen EPSPS mediante el cual puede recuperarse una planta mutada completa que muestre el fenotipo resistente a glifosato.

- 30 Una técnica ilustrativa para la administración con microfibras de una oligonucleobase recombinagénica es del modo siguiente: Se suspenden microfibras estériles (2 µg) en 150 µl de medio de cultivo de plantas que contiene aproximadamente 10 µg de un oligonucleótido de doble hélice mixto. Se deja reposar un cultivo en suspensión y se agitan vorticialmente volúmenes iguales de células empaquetadas y de la suspensión de fibra estéril/nucleótido durante 10 minutos y se empaquetan. Se aplica medio selectivo inmediatamente o con un retraso de hasta 120 horas según sea necesario para el rasgo particular.

Electroporación

- 35 En una realización alternativa, las oligonucleobases recombinagénicas pueden administrarse a la célula vegetal mediante electroporación de un protoplasto derivado de una parte de una planta de acuerdo con técnicas que son bien conocidas para un experto habitual en la técnica. Véase, por ejemplo, Gallois y col., 1996, en *Methods in Molecular Biology* 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp y col., 1999, en *Methods in Molecular Biology* 133:213-221, Humana Press, Totowa, N.J.

- 40 Las oligonucleobases recombinagénicas también pueden introducirse en microesporas mediante electroporación. Tras la liberación de la tétrada, la microespora es unicelular y de paredes estrechas. Comienza a alargarse y desarrolla un poro germinativo antes de que se forme la exina. Una microespora en este estado es potencialmente más susceptible de transformación con ADN exógeno que otras células vegetales. Además, el desarrollo de la microespora puede alterarse *in vitro* para producir embriones haploides o callos embriogénicos que puedan regenerarse en plantas (Coumans y col., *Plant Cell Rep.* 7:618-621, 1989; Datta y col., *Plant Sci.* 67:83-88, 1990; Maheshwari y col., *Am. J. Bot.*

69:865-879, 1982; Schaeffer, Adv. en Cell Culture 7:161-182, 1989; Swanson y col., Plant Cell Rep. 6:94-97, 1987). Por lo tanto, las microesporas transformadas pueden regenerarse directamente en plantas haploides o en plantas dihaploides fértiles tras la duplicación de cromosomas mediante procedimientos estándar. Véase la solicitud de los mismos autores de los Estados Unidos con número de serie 09/680.858 titulada "Compositions and Methods for Plant Genetic Modification".

La electroporación de microesporas puede ponerse en práctica con cualquier especie de planta para la que sea posible el cultivo de microesporas, incluyendo, pero sin limitación, plantas en las familias *Graminae*, *Leguminoceae*, *Cruciferaeae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaccae*, *Poaceae*, *Lilaceae*, *Rutaceae*, *Vitaceae*, incluyendo especies tales como maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), avena, cebada, canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*, y *Brassica juncea*), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), varias especies leguminosas (por ejemplo, soja [*Glycine max*], guisante [*Pisum sativum*], etc.), uvas [*Vitis vinifera*], y un hospedador de otras plantas de cultivo importantes. La embriogénesis de microesporas, tanto desde anteras y cultivo de microesporas, se ha descrito en más de 170 especies, que pertenecen a 68 géneros y 28 familias de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Raghavan, Embryogenesis in Angiosperms: A Developmental and Experimental Study, Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 1986; Raghavan, Cell Differentiation 21:213-226, 1987; Raemakers y col., Euphytica 81:93-107, 1995). Para una discusión detallada del aislamiento de microesporas, su cultivo, y la regeneración de plantas dobles haploides a partir de embriones derivados de microesporas [MDE] en *Brassica napus* L., véase Nehlin, The Use of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Microspore as a Tool for Biotechnological Applications, Tesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia, 1999; también Nehlin y col., Plant Sci. 111:219-227, 1995, y Nehlin y col., Plant Sci. 111:219-227, 1995). La duplicación de cromosomas a partir de microesporas u otro cultivo es una técnica bien establecida para la producción de líneas de plantas homocigóticas dobles haploides en varios cultivos (Heberle-Bors y col., In vitro pollen cultures: Progress and perspectives. En: Pollen Biotechnology. Gene expression and allergen characterization, vol. 85-109, ed. Mohapatra, S. S., y Knox, R. B., Chapman y Hall, Nueva York, 1996).

Los procedimientos de electroporación de microesporas se describen en Jardinaud y col., Plant Sci. 93:177-184, 1993, y Fennell y Hauptman, Plant Cell Reports 11:567-570, 1992. Los procedimientos para la electroporación de MDON en protoplastos de plantas también pueden adaptarse para su uso en electroporación de microesporas.

Patillas y microinyección

En otra realización alternativa más, la oligonucleobase recombinagénica puede administrarse a la célula vegetal por medio de patillas o microinyección de la célula vegetal. La técnica denominada de patillas se lleva a cabo esencialmente tal como se describe en Frame y col., 1994, Plant J. 6:941-948. La oligonucleobase recombinagénica se añade a las patillas y se usa para transformar las células vegetales. La oligonucleobase recombinagénica puede incubarse conjuntamente con plásmidos que comprenden secuencias que codifican proteínas capaces de formar complejos de recombinasa en células vegetales de tal forma que la recombinación está catalizada entre el oligonucleótido y la secuencia diana en el gen de EPSPS.

Selección de plantas resistentes a glifosato

Puede ensayarse la resistencia o tolerancia de las plantas o células vegetales a un herbicida de fosfometilglicina usando procedimientos conocidos de manera común en la técnica, por ejemplo, creciendo la planta o célula vegetal en presencia de un herbicida de fosfometilglicina y midiendo la velocidad de crecimiento en comparación con la velocidad de crecimiento de plantas de control en ausencia de herbicida. En el caso de glifosato se usan concentraciones de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mM en el medio de selección.

Los siguientes ejemplos ilustran la práctica de la presente invención pero no deben entenderse como limitantes de su ámbito.

Ejemplo 1: Mutantes P178A en *Brassica napus* (colza) (No según la invención)

Se preparó el siguiente genoplasto (oligonucleobase recombinagénica) para hacer un cambio P178A en germoplasma de *Brassica napus* (colza):

SEC ID 1: VATGCAGGAACAGCCATGCGTTCCTTACGGCTGCAGTTACTH

en el que V es un colorante fluorescente (V=Cy3) y H es un nucleótido reverso o base reversa (H=3'DMTdCCPG). Las nucleobases subrayadas representan una región heteróloga (codon) donde la mutación sucede en el genoma de la colza, es decir, A. El genoplasto se prepara según técnicas bien conocidas y el genoplasto se administra preferentemente en una célula de planta de colza mediante bombardeo de micropartículas, es decir, biolísticamente. Las plantas de colza regeneradas que contienen al mutante P178 A son resistentes al glifosato cuando se aplican velocidades comerciales.

Ejemplo 2: Mutantes P173A en *Oryza sativa* (arroz) (No según la invención)

Se preparó el siguiente genoplasto (oligonucleobase recombinagénica) para hacer un cambio P173A en germoplasma de *Oryza sativa* (arroz):

SEC ID 2: VGGAACGCTGGAAGTGAATGCGAGCATTGACAGCAGCCGTGACTGCH

- 5 en el que V es un colorante fluorescente (V=Cy3) y H es un nucleótido reverso o base reversa (H=3'DMTdCCPG). Las nucleobases subrayadas representan una región heteróloga (codon) donde la mutación sucede en el genoma del arroz, es decir, A. El genoplasto se prepara según técnicas bien conocidas y el genoplasto se administra preferentemente en una célula de planta de arroz mediante bombardeo de micropartículas, es decir, biolísticamente. Las plantas de arroz regeneradas que contienen al mutante P173A son resistentes al glifosato cuando se aplican 10 velocidades comerciales.

Ejemplo 3: Mutantes de *E. coli* y de *Arabidopsis*

La siguiente tabla lista las mutaciones de EPSPS en *E. coli* (AroA) y *Arabidopsis* NM 130093 que producen un fenotipo resistente al glifosato. El cambio de codon específico se indica en la columna derecha.

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i> NM 130093	MUTACIÓN
1.	T ₉₇ → A ₉₇	T178A	ACA → GCA
2.	L ₈₂ → S ₈₂	F159S	TTC → TCC
3.	P ₁₀₁ → C ₁₀₁	P182C	CCA → TGC
4.	** T ₉₇ ; P ₁₀₁ → I ₉₇ ; A ₁₀₁	T178I; P182A	(T → I) ACA → ATA; (P → A) CCA → GCA
5.	* N ₁₉₄ → A ₁₉₄	N193A	AAC → GCC
6.	T ₉₇ ; P ₁₀₁ → A ₉₇ ; A ₁₀₁	T178A; P182A	(T → A) ACA → GCA; (P → A) CCA → GCA
7.	T ₉₇ ; P ₁₀₁ → A ₉₇ ; T ₁₀₁	T178A; P182T	(T → A) ACA → GCA; (P → T) CCA → ACA
8.	L ₈₂ ; P ₁₀₁ → S ₈₂ ; A ₁₀₁	F159S; P182A	(F → S) TTC → TCC; (P → A) CCA → GCA
9.	L ₈₂ ; P ₁₀₁ → S ₈₂ ; T ₁₀₁	F159S; P182T	(F → S) TTC → TCC; (P → T) CCA → ACA

* Sin aminoácido realmente homólogo en *E. coli*. El aminoácido homólogo más próximo en *E. coli* es N111. Nótese también que la *E. coli* nativa tiene una L en la posición 82 y el aminoácido análogo en *Arabidopsis* en la posición 159 es F

** Doble mutación según la presente invención

- 15 La siguiente lista (a-g) muestra en más detalle las mutaciones. Todas las referencias a "*Arabidopsis*" son al gen NM 130093 de *Arabidopsis*. Las secuencias son las secuencias génicas del gen de EPSPS nativo (parte superior) y el gen de EPSPS mutado (parte inferior). El codon mutado se marca en **negrita** y se subraya donde el nucleótido cambiado está representado por una letra minúscula.

20 **a. T178A**

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
1.	T ₉₇ → A ₉₇	T178A	ACA → GCA

CTTTACCTCGGTAATGCAGGA**ACA**GCAATGCGTCCACTTACC

CTTTACCTCGGTAATGCAGGA**gCA**GCAATGCGTCCACTTACC

25 **b. F159S**

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
2.	L ₈₂ → S ₈₂	F159S	TTC → TCC

GGATGTGGCGGGATAT**TTC**CCAGCTTCCATAGATTC

GGATGTGGCGGGATAT**Tc**CCAGCTTCCATAGATTC

c. P101C

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
3.	P ₁₀₁ → C ₁₀₁	P182C	CCA→TGC

GCAGGAACAGCAATGCGTCCACTTACCGCTGCGGTC

5 GCAGGAACAGCAATGCGTtgcCTTACCGCTGCGGTC

d. T178I;P182A (Doble mutación según la presente invención)

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
4.	T ₉₇ ;P ₁₀₁ → I ₉₇ ;A ₁₀₁	T178I;P182A	(T → I) ACA → ATA; (P → A) CCA → GCA

CCTCGGTAATGCAGGAACAGCAATGCGTCACTTAC

10 CCTCGGTAATGCAGGAAtAGCAATGCGTgCATTAC

e. N193A

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
5.	*N ₁₉₃ → A ₁₉₃	N193A	AAC→GCC

GGTCACTGCTGCAGGTGGAAACGCAAGTTATGTGCTTG

15 GGTCACTGCTGCAGGTGGAgcCGCAAGTTATGTGCTTG

f. T178A;P182A

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
6.	T ₉₇ ;P ₁₀₁ → A ₉₇ ;A ₁₀₁	T178A;P182A	(T → A) ACA → GCA; (P → A) CCA → GCA

CCTCGGTAATGCAGGAACAGCAATGCGTCCATTAC

20 CCTCGGTAATGCAGGAgCAGCAATGCGTgCATTAC

g. T178A;P182T

	<i>E. COLI</i>	<i>ARABIDOPSIS</i>	MUTACIÓN
7.	T ₉₇ ;P ₁₀₁ → A ₉₇ ;T ₁₀₁	T178A;P182T	(T → A) ACA → GCA; (P → T) CCA → ACA

CCTCGGTAATGCAGGA**AC**AGCAATGCGT**CCA**CTTAC

CCTCGGTAATGCAGGA**gCA**gCAATGCGT**aCA**CTTAC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Cibus, LLC
- <120> EPSPS Mutantes
- <130> JWJ01491EP
- 10 <140> 07716464.8
<141> 10-01-2007
- <150> PCT/US2007/000591
- 15 <151> 10-01-2007
- <150> 60/758.439
- <151> 12-01-2006
- 20 <160> 21
- <170> Patent In versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Oligonucleobase recombinagénica diseñada para causar una mutación puntual en *Brassica napus*
- <400> 1
vatgcaggaa cagccatgcg ttcacttacg gctgcagtta cth 43
- <210> 2
- 35 <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Oligonucleobase recombinagénica diseñada para causar mutación puntual en *Oryza sativa*
- <400> 2
vgaacgctg gaactgcaat gcgagcattg acagcagccg tgactgch 48
- <210> 3
- 45 <211> 42
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)
- <400> 3
ctttacctcg gtaatgcagg aacagcaatg cgtccactta cc 42
- <210> 4
- 55 <211> 42
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)
- <400> 4
60 ctttacctcg gtaatgcagg agcagcaatg cgtccactta cc 42
- <210> 5
<211> 35
<212> ADN

ES 2 532 112 T3

<213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)
 <400> 5
 5 ggatgtggcg ggatattccc agctccata gattc 35
 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)
 10 <400> 6
 ggatgtggcg ggatattccc agctccata gattc 35
 <210> 7
 15 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)
 <400> 7
 20 gcaggaacag caatgctgcc acttaccgct gcggtc 36
 <210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 25 <213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)
 <400> 8
 gcaggaacag caatgctgtg ccttaccgct gcggtc 36
 <210> 9
 30 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)
 35 <400> 9
 cctcggaat gcaggaacag caatgctgcc acttac 36
 <210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)
 <400> 10
 45 cctcggaat gcaggaatag caatgctgac acttac 36
 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)
 50 <400> 11
 ggtcactgct gcaggtggaa acgcaagtta tgtgcttg 38
 <210> 12
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)
 55 <400> 12
 60 ggtcactgct gcaggtggag cgcgaagtta tgtgcttg 38
 <210> 13
 <211> 36
 <212> ADN
 65 <213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)

ES 2 532 112 T3

<400> 13
cctcggtaat gcaggaacag caatgcgtcc acttac 36

5 <210> 14
<211> 36
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)

10 <400> 14
cctcggtaat gcaggagcag caatgcgtgc acttac 36

15 <210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana* (nativa)

20 <400> 15
cctcggtaat gcaggaacag caatgcgtcc acttac 36

25 <210> 16
<211> 36
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana* (mutada)

30 <400> 16
cctcggtaat gcaggagcag caatgcgtac acttac 36

<210> 17
<211> 427
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 17

ES 2 532 112 T3

Met Glu Ser Leu Thr Leu Gln Pro Ile Ala Arg Val Asp Gly Thr Ile
 1 5 10 15

Asn Leu Pro Gly Ser Lys Ser Val Ser Asn Arg Ala Leu Leu Leu Ala
 20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Lys Thr Val Leu Thr Asn Leu Leu Asp Ser Asp
 35 40 45

Asp Val Arg His Met Leu Asn Ala Leu Thr Ala Leu Gly Val Ser Tyr
 50 55 60

Thr Leu Ser Ala Asp Arg Thr Arg Cys Glu Ile Ile Gly Asn Gly Gly
 65 70 75 80

Pro Leu His Ala Glu Gly Ala Leu Glu Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
 85 90 95

Thr Ala Met Arg Pro Leu Ala Ala Ala Leu Cys Leu Gly Ser Asn Asp
 100 105 110

Ile Val Leu Thr Gly Glu Pro Arg Met Lys Glu Arg Pro Ile Gly His
 115 120 125

Leu Val Asp Ala Leu Arg Leu Gly Gly Ala Lys Ile Thr Tyr Leu Glu
 130 135 140

Gln Glu Asn Tyr Pro Pro Leu Arg Leu Gln Gly Gly Phe Thr Gly Gly
 145 150 155 160

Asn Val Asp Val Asp Gly Ser Val Ser Ser Gln Phe Leu Thr Ala Leu
 165 170 175

Leu Met Thr Ala Pro Leu Ala Pro Glu Asp Thr Val Ile Arg Ile Lys
 180 185 190

Gly Asp Leu Val Ser Lys Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Leu Asn Leu Met
 195 200 205

Lys Thr Phe Gly Val Glu Ile Glu Asn Gln His Tyr Gln Gln Phe Val

210						215						220					
Val	Lys	Gly	Gly	Gln	Ser	Tyr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Val	Glu		
225					230					235					240		
Gly	Asp	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Lys		
				245					250					255			
Gly	Gly	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Arg	Asn	Ser	Met	Gln	Gly		
			260					265					270				
Asp	Ile	Arg	Phe	Ala	Asp	Val	Leu	Glu	Lys	Met	Gly	Ala	Thr	Ile	Cys		
		275					280					285					
Trp	Gly	Asp	Asp	Tyr	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile		
	290					295					300						
Asp	Met	Asp	Met	Asn	His	Ile	Pro	Asp	Ala	Ala	Met	Thr	Ile	Ala	Thr		
305					310					315					320		
Ala	Ala	Leu	Phe	Ala	Lys	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Arg	Asn	Ile	Tyr	Asn		
				325						330				335			
Trp	Arg	Val	Lys	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Phe	Ala	Met	Ala	Thr	Glu	Leu		
			340					345					350				
Arg	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Gly	His	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ile		
		355					360					365					
Thr	Pro	Pro	Glu	Lys	Val	Asn	Phe	Ala	Glu	Ile	Ala	Thr	Tyr	Asn	Asp		
	370					375					380						
His	Arg	Met	Ala	Met	Cys	Phe	Ser	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Asp	Thr	Pro		
385					390					395					400		
Val	Thr	Ile	Leu	Asp	Pro	Lys	Cys	Thr	Ala	Lys	Thr	Phe	Pro	Asp	Tyr		
			405						410					415			
Phe	Glu	Gln	Leu	Ala	Arg	Ile	Ser	Gln	Ala	Ala							
			420					425									

<210> 18
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 18

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				

10

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 Ser 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 Pro 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> 19
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 19

Met Ala Ser Ser Leu Thr Ser Lys Ser Ile Leu Gly Cys Thr Lys Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Phe Leu Pro Ser Glu Leu Arg Arg Leu Ser Ser Pro
 20 25 30

5

10

Ala Val Gln Ile Ser Leu His Ser Gln Thr Arg Lys Asn Phe Arg Gln
35 40 45

Ser Trp Gly Leu Lys Lys Ser Asp Leu Met Leu Asn Gly Ser Glu Ile
50 55 60

Arg Pro Val Lys Val Arg Ala Ser Val Ser Thr Ala Glu Lys Ala Ser
65 70 75 80

Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Leu
85 90 95

Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu
100 105 110

Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Asp Asp Ile
115 120 125

Asn Tyr Met Leu Asp Ala Leu Lys Ile Leu Gly Leu Asn Val Glu Thr
130 135 140

His Ser Glu Asn Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Val Phe
145 150 155 160

Pro Ala Ser Ile Asp Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn
165 170 175

Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly
180 185 190

Gly Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg
195 200 205

Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val
210 215 220

Glu Cys Thr Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Ala Asn
225 230 235 240

Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser
245 250 255

Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp
260 265 270

Val Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu
275 280 285

Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Ala Glu His Ser
290 295 300

Glu Ser Trp Asp Arg Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser
305 310 315 320

Pro Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe

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

<210> 20
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> *Brassica napus*

5

<400> 20

Met	Ala	Gln	Ala	Ser	Arg	Ile	Cys	Gln	Asn	Pro	Cys	Val	Ile	Ser	Asn
1				5					10					15	
Leu	Ser	Lys	Ser	Asn	Gln	Arg	Lys	Ser	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Leu	Lys
			20					25					30		
Thr	His	Gln	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Tyr	Gln	Ile	Ser	Ser	Trp	Gly	Leu
		35					40					45			

10

ES 2 532 112 T3

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

Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly
 340 345 350

Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Cys Lys Val Ser
 355 360 365

Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Ser Arg Asp Ala Phe
 370 375 380

Gly Met Arg His Leu Arg Ala Val Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro
 385 390 395 400

Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro
 405 410 415

Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg
 420 425 430

Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu
 435 440 445

Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro Ala Lys Leu Lys Pro
 450 455 460

Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser
 465 470 475 480

Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys
 485 490 495

Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln Val Leu Glu Ser Ile Thr
 500 505 510

Lys His

<210> 21
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> *Brassica napus*

5

<400> 21

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

10

ES 2 532 112 T3

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 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 Glu 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

ES 2 532 112 T3

				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															

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una planta no transgénica, resistente o tolerante a herbicida que comprende:
- 5 introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen de EPSPS mutante que exprese una proteína EPSPS que esté mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto de aminoácido análogo en una proteína EPSPS de otra especie en la que Thr₁₇₉ es cambiado a Ile y Pro₁₈₃ es cambiado a Ala; seleccionar una célula vegetal que muestre una tolerancia mejorada al glifosato en comparación con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente; y
- 10 regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicida que tenga un gen de EPSPS mutado de dicha célula vegetal seleccionada.
2. Un procedimiento de producción de una planta no transgénica, resistente o tolerante a herbicida que comprende:
- 15 introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen de EPSPS mutante que exprese una proteína EPSPS que esté mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto de aminoácido análogo en una proteína EPSPS de otra especie en la que Thr₁₇₉ es cambiado a Ile y Pro₁₈₃ es cambiado a Ala; identificar una célula vegetal que tenga proteína EPSPS mutante que muestre sustancialmente la misma actividad catalítica que una proteína EPSPS de tipo silvestre, y que muestre esta actividad incluso en presencia de glifosato; y regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicida que tenga un gen de EPSPS mutado de dicha célula vegetal.
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en el que la oligonucleobase recombinagénica se introduce mediante electroporación.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que las células vegetales son seleccionadas del grupo que consiste en maíz, trigo, arroz, cebada, soja, algodón, remolacha azucarera, colza, canola, lino, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, álamo, pino, eucalipto, manzana, lechuga, guisantes, lentejas, uva, céspedes, y
- 25 *Brassica sp.*
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que las posiciones de aminoácidos son
- 30 Thr₁₀₂ y Pro₁₀₆ en la proteína EPSPS de *Zea mays*;
 Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ en la proteína EPSPS de una *Brassica sp.*;
 Thr₁₇₄ and Pro₁₇₈ en la proteína EPSPS de *Petunia hybrida*; o
 Thr₁₇₈ y Pro₁₈₂ en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* (NM 130093).
6. Un procedimiento de producción de una célula de *E. coli* no transgénica que tenga un gen de EPSPS mutante que comprende:
- 35 introducir en células de *E. coli* una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células de *E. coli* con un gen de EPSPS mutante que exprese una proteína EPSPS que esté mutada en las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ en la que Thr₉₇ es cambiado a Ile y Pro₁₀₁ es cambiado a Ala; identificar una colonia de células de *E. coli* que tenga un crecimiento sustancialmente normal en presencia de glifosato; y aislar una o más células de *E. coli* que contienen al gen de EPSPS mutante.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la oligonucleobase recombinagénica es un nucleótido de doble hélice mixto o un SSOMV.
- 40 8. El procedimiento según la reivindicación 7 en el que el nucleótido de doble hélice mixto 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 de EPSPS diana 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 de EPSPS diana, y una región interviniente que contiene al menos una nucleobase heteróloga para el gen de EPSPS diana, contactando dicha región interviniente a la primera y a la segunda
- 45 región homóloga.
9. Una planta resistente a herbicida que expresa un producto génico de EPSPS mutante en la que el gen de EPSPS está mutado en posiciones para cambiar en las posiciones de aminoácidos Thr₁₇₉ y Pro₁₈₃ en una proteína EPSPS de *Arabidopsis* (AF360224) o en un resto análogo de aminoácido en un homólogo de EPSPS en el que Thr₁₇₉ es cambiado a Ile y Pro₁₈₃ es cambiado a Ala.
- 50 10. La planta según la reivindicación 9 en la que la planta es seleccionada del grupo que consiste en maíz, trigo, arroz, cebada, soja, algodón, remolacha azucarera, colza, canoa, lino, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, álamo, pino, eucalipto, manzana, lechuga, guisantes, lentejas, uva, céspedes, y *Brassica sp.*

11. La planta según las reivindicaciones 9 a 10 en el que las posiciones de aminoácidos son

Thr₁₀₂ y Pro₁₀₆ en la proteína EPSPS de *Zea mays*;
Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ en la proteína EPSPS de una *Brassica sp*;
Thr₁₇₄ and Pro₁₇₈ en la proteína EPSPS de *Petunia hybrida*; o
5 Thr₁₇₈ y Pro₁₈₂ en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* (NM 130093).

12. Una proteína EPSPS mutante que comprende la secuencia de aminoácidos del producto génico de EPSPS de *E. coli* reproducido en la FIG. 1 o de un homólogo de EPSPS en el que las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ están cambiadas, en las que Thr₉₇ está cambiada a Ile y Pro₁₀₁ está cambiada a Ala, teniendo dicha proteína EPSPS mutante una resistencia o tolerancia aumentada a un herbicida de fosfometilglicina.

10 13. Una célula de *E. coli* mutante que expresa un producto génico de EPSPS mutante en la que el gen de EPSPS está mutado para cambiar las posiciones de aminoácidos Thr₉₇ y Pro₁₀₁ en el producto génico, en el que Thr₉₇ es cambiado a Ile y Pro₁₀₁ es cambiado a Ala.

15 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha planta resistente o tolerante a herbicida se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, remolacha azucarera, patata, colza; y en el que dicho herbicida es glifosato.

15 15. La planta según la reivindicación 9, en el que dicha planta resistente o tolerante a herbicida es seleccionada del grupo que consiste en maíz, trigo, remolacha azucarera, patata, colza; y en el que dicho herbicida es glifosato.

Polimorfismos mapeados en AroA de *E. coli*

```

1   MESLTLQPIA RVDGTINLPG SKSVSNRALL LAALAHGKTV
    LTNLLDSDDV
51  RHMLNALTAL GVSYTLSADR TRCEIIGNGG P[ ]HAEGALEL
    FLGNAGTAMR
101 PLAAALCLGS NDIVLTGEPR MKERPIGLV DALRLGGAKI
    TYLEQENYPP
151 LRLQGGFTGG NVDVDSVSS QFLTALLMTA PLAPEDTVIR
    IKGDLVSKPY
201 IDITLNMKT FGVEIENQHY QQFVVKGGQS YQSPGTYLVE
    GDASSASYFL
251 AAAAIKGGTV KVTGIGRNSM QGDIREFADVL EKMGATICWG
    DDYISCTRGE
301 LNAIDMDMNH IPDAAMTIAT AALFAKGTTT LRNIYNWRVK
    ETDRLFAMAT
351 ELRKVGAEVE EGHDIYRITP PEK[ ]NFAEIA TYNDHRMAMC
    FSLVALSDTP
    401 VTILDPKCTA KTFPDYFEQL ARISQAA
  
```

Caja I L82S
Caja II V374L

FIG. 1

ADNc de ATEPSPS - At2g45300

traducido a partir de la referencia de GenBank NM_130093

```

1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPL SVSLKTQQHP
   RAYPISSSWG
51  LKKSGMTLIG SELRPLKVMS SVSTAEEKASE IVLQPIREIS
   GLIKLEPGSKS
101 LSNRILLAA LSEGTTVVDN LLNSDDINYM LDALKRRLGLN
   VETDSENNRA
151 VVEGCGGIFP ASIDSKSDIE LYLGNAGTAM RPLTAAVTAA
   GGNASYVLDG
201 VPRMRERPIG DLVVGLKQLG ADVECTLGTN CPPVRVNANG
   GLPGGKVKLS
251 GSISSQYLTA LLMSAPLALG DVEIEIVDKL ISVPYVEMTL
   KLMEREGVSV
301 EHSDSWDRFF VKGGQKYKSP GNAYVEGDAS SASYFLAGAA
   ITGETVTVEG
351 CGTTSLOGDV KFAEVLEKMG CKVSWTENS SVTVTGPPRDAF
   GMRHLRAIDV
401 NMNKMPDVAM TLAVVALFAD GPTTIRDVAS WRVKETERMI
   AICTELRKLK
451 ATVEEGSDYC VITPPKKVKT AEIDTYDDHR MAMAFSLAAC
   ADVPTINDP
501 GCTRKTFPDY FQVLERITKH

```

FIG. 2

ADNc de ATEPSPS - Atlg48860

traducido a partir de la referencia de GenBank AF360224T

```

1  MASSLTSKSI LGCTKPASSS FLPSELRRLS SPAVQISLHS
   QTRKNFRQSW
51  GLKKSDDLMLN GSEIRPVKVR ASVSTAEKAS EIVLQPIREI
   SGLIKLPGSK
101 SLSNRILLIA ALSEGTTVVD NLLNSDDINY MLDALKILGL
   NVETHSENNR
151 AVVEGCGGVF PASIDSKSDI ELYLGNAGTA MRPLTAAVTA
   AGGNASYVLD
201 GVPRMRERPI GDLVVGLKQL GADVECTLGT NCPPVRVNAN
   GGLPGGKVKL
251 SGSISSQYLT ALLMAAPLAL GDVEIEIVDK LISVPYVEMT
   LKLMERFGVS
301 AEHSESWDRF FVKGGQKYKS PGNAYVEGDA SSASYFLAGA
   AITGETVTVE
351 GCGTTSLOGD VKFAEVLEKM GCKVSWTENS VVTGPSRDA
   FGMRHLRAID
401 VNMNKMPDVA MTLAVVALFA DGPTTIRDVA SWRVKETERM
   IAICTELRKL
451 GATVEEGSDY CVITPPKKVK PAEIDTYDDH RMAMAFSLAA
   CADVPITIND
501 PGCTRKTFFD YFQVLERITK H

```

Fig. 3

ADNc de BnEPSPS - BN-2 2-23

```

1  MAQASRICQN PCVISNLSKS NQRKSPFSVS LKTHQQORGA
   YQISSWGLKK
51  SNNGSVIRPV KVMASVSTAE KASEIVLQPI REISGLIKLP
   GSKSLSNRIL
101 LLAALSEGTT VVDNLLNSDD INYMLDALNK LGLNVERDSE
   NNRAVVEGCG
151 GIFPASLDSK GDIELYLGNA GTAMRPLTAA VTAAGGNASY
   VLDGVPRMRE
201 RPIGDLVVGL KQLGADVECT LGTNCPPVRV NANGGLPGGK
   VKLSGSISSQ
251 YLTALLMAAP LALGDVEIEI IDKLISVPYV EMTLKLMEERF
   GVSAEHSDSW
301 DRFFVKGGQK YKSPGNAYVE GDASSASYFL AGAAITGETV
   TVEGCGTTSL
351 QGDVKFAEVL EKMCKVSWT ENSVTVTGPS RDAFGMRHLR
   AVDVNMNKMP
401 DVAMTLAVVA LFADGPTTIR DVASWRVKET ERMIAICTEL
   RKLGATVEEG
451 SDYCVITPPA KLLKPAEIDTY DDHRMAMAFS LAACADVPVT
   IKDPGCTRKT
501 FPDYFQVLES ITKH

```

FIG. 4

ADNc de BnEPSPS - 2-28 de la traducción de ADNg de X51475

```

1  MAQSSRICHG VQNPCVIISN LSKSNQNKSP FSVSLKTHQP
   RASSWGLKKS
51  GTMLNGSVIR FVKVTASVST SEKASEIVLQ PIREISGLIK
   LPGSKSLSNR
101 ILLLAALSEG TTVVDNLLNS DDINYMLDAL KKLGLNVERD
   SVNNRAVVEG
151 CGGIFPASLD SKSDIELYLG NAGTAMRPLT AAVTAAGGNA
   SYVLDGVPRM
201 RERPIGDLVV GLKQLGADVE CTLGTNCPV RVNANGGLPG
   GKVKLSGSIS
251 SQYLTALLMA APLALGDVEI EIIDKLISVP YVEMTLKLME
   RFGVSAEHS
301 SWDREFVKGG QKYKSPGNAY VEGDASSASY FLAGAAITGE
   TVTVEGCGTT
351 SLOGDVKFAE VLEKMGCKVS WTENSVTVTG PSRDAFGMRH
   LRAVDVNMNK
401 MPDVAMTLAV VALFADGPTT IRDVASWRVK ETERMIAICT
   ELRKLGATVE
451 EGSDYCVITP PAKV[K]PAEID TYDDHRMAMA FSLAACADV
   VTIKDFGCTR
501 KTFPDYFQVL ESITKH

```

Fig. 5