

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 285**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2011 PCT/US2011/046330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2011 E 11815228 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2600710**

54 Título: **Genes de protoporfirinógeno oxidasa (PPX) mutado**

30 Prioridad:

03.08.2010 US 370436 P

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

31.10.2018

73 Titular/es:

**CIBUS US LLC (50.0%)
6455 Nancy Ridge Drive, Suite 100
San Diego, California 92121, US y
CIBUS EUROPE B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOCAL, GREGORY F.W.;
BEETHAM, PETER R.;
DE SCHOPKE, AURA;
DUMM, SARAH;
PEARCE, JAMES;
SCHOPKE, CHRISTIAN y
WALKER, KEITH A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 285 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

Genes de protoporfirinógeno oxidasa (PPX) mutado

Campo de la invención

Esta divulgación se refiere, al menos en parte, a mutaciones de genes y/o proteínas en plantas.

5 Antecedentes de la invención

La siguiente descripción se proporciona simplemente como una ayuda para comprender la invención y no se admite que describa o constituya la técnica anterior.

Se han indicado ejemplos de determinadas mutaciones en los genes PPX de plantas. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.767.373 desvela "secuencias de ADN eucariotas que codifican protoporfirinógeno oxidasa (protox) nativa o formas modificadas de la enzima que son tolerantes a herbicidas"; la Patente de los EE.UU. n.º 6.282.837 desvela "secuencias de ADN eucariotas que codifican protoporfirinógeno oxidasa (protox) nativa o formas modificadas de la enzima que son tolerantes a herbicidas y un procedimiento para controlar malas hierbas usando plantas que tienen actividad de protox alterada que confiere tolerancia a herbicidas"; la Patente de los EE.UU. n.º 6.308.458 desvela "procedimientos para controlar el crecimiento de vegetación indeseada que comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de protox a una población de plantas transgénicas o semilla de planta transformada con una secuencia de ADN que codifica una enzima protox modificada que es tolerante a un herbicida inhibidor de protox o al locus en el que se cultiva una población de plantas transgénicas o semillas de plantas"; la Patente de los EE.UU. n.º 6.905.852 desvela "[a] protoporfirinógeno oxidasa tolerante al herbicida fotoblanqueante y sus derivados, que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 [una proteína PPX] o péptidos mutados procedentes de los mismos por delección, adición, sustitución, etc. de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos anterior y que tienen una actividad sustancialmente equivalente a la de la protoporfirinógeno oxidasa"; la Patente de los EE.UU. n.º desvela "procedimientos para conferir resistencia a herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno sobre plantas de cultivo. Se confiere resistencia mediante el diseño por ingeniería genética de las plantas para expresar ADN clonado que codifica una protoporfirinógeno oxidasa resistente a herbicidas porfíricos"; la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20020086395 desvela "[a] un procedimiento para evaluar la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad protoporfirinógeno oxidasa, que comprende las etapas de: (1) cultivar un transformante que expresa un gen de protoporfirinógeno oxidasa presente en un fragmento de ADN en un medio que sustancialmente no contiene compuestos protohémicos en cada sistema comparativo de la presencia y ausencia de un compuesto de prueba para medir una tasa de crecimiento del transformante en cada condición, siendo dicho transformante de una célula huésped deficiente en la capacidad de crecimiento basada en la actividad protoporfirinógeno oxidasa transformada con el fragmento de ADN en que un promotor funcional en la célula huésped y un gen de protoporfirinógeno oxidasa están unidos de forma operacional, y (2) determinar la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de protoporfirinógeno oxidasa comparando las tasas de crecimiento; y similares;" Patzoldt WL, y col., PNAS EE.UU. 103: 12329-34 (2006) desvela una "delección de 3 pb correspondiente al codón G210" de PPX; y Li X, y col., Plant Physiology 133: 736-47 (2003) desvelan el "aislamiento de genes de protoporfirinógeno oxidasa (PPO) de plantas y el aislamiento de mutantes resistentes a herbicidas". Los términos PPO y PPX se usan indistintamente en el presente documento. Los documento WO 01/68826 A2 y US 2001/016956 A1 ambos se refieren a secuencias de ADN que codifican las enzimas protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) y a plantas que expresan enzimas PPX resistentes a herbicidas.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es una planta como se define en la reivindicación 1, cuya planta es resistente a uno o más herbicidas inhibidores de PPX. Otro objeto de la presente invención es una célula de planta como se define en la reivindicación 2, cuya célula de planta comprende un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) mutado. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento como se define en la reivindicación 7, para producir una célula de planta no transgénica con un gen de PPX mutado. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones particulares de la mismas.

La presente divulgación se refiere, al menos, en parte a procedimientos relacionados con mutaciones de genes y proteínas en plantas. En algunos aspectos, la presente divulgación también puede referirse a procedimientos para producir plantas resistentes a herbicidas. La presente divulgación y los procedimientos desvelados se refieren a mutaciones en un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX).

En un aspecto, se proporciona una planta o una célula de planta que incluye un gen de PPX mutado. En determinados ejemplos, el gen PPX mutado codifica una proteína PPX mutada. En determinados ejemplos, una planta que tiene una célula de planta que incluye un gen de PPX mutado puede ser resistente a herbicida; por ejemplo, resistente a un herbicida inhibidor de PPX. En determinados ejemplos, la planta o la célula de la planta no es transgénica. En determinados ejemplos, la planta o la célula de planta es transgénica. La divulgación también proporciona vectores recombinantes que incluyen dichos genes PPX mutados, así como plantas transgénicas que contienen dichos genes PPX mutados.

Como se usa en el presente documento, el término "gen PPX" se refiere a una secuencia de ADN capaz de generar un polipéptido PPX que comparte homología e/o identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, y/o codifica una proteína que demuestra actividad PPX. En determinados ejemplos, el gen PPX tiene un 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; o 100 % de identidad con un gen PPX específico; por ejemplo, los genes mitocondriales Russet Burbank PPX, por ejemplo, StmPPX1 o StmPPX2; o, por ejemplo, un gen plastidial Russet Burbank PPX, por ejemplo, StcPPX1. En determinados ejemplos, el gen PPX tiene un 60 %; 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre las secuencias en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 41, 43 y 45. En algunos ejemplos, un gen PPX es un gen PPX mitocondrial; por ejemplo, StmPPX1 o StmPPX2. En algunos ejemplos, un gen PPX es un gen PPX plastidial; por ejemplo, StcPPX1. En algunos ejemplos, un gen PPX es un alelo del gen PPX mitocondrial; por ejemplo, StmPPX2.1 o StmPPX2.2. En algunos ejemplos, un gen PPX es un alelo del gen PPX plastidial; por ejemplo, StcPPX1 o StcPPX1.1. En algunas plantas, como el cáñamo acuático, el producto proteico de un único gen PPX es tanto mitocondrial como plastidial como se desvela en Patzoldt WL, y col., PNAS EE.UU. 103: 12329-34 (2006).

Como se usa en el presente documento, el término "mutación" se refiere a al menos una única variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico y/o una única variación de aminoácido en un polipéptido relativo a la secuencia normal o secuencia de tipo silvestre o una secuencia de referencia, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, una mutación se refiere a al menos una única variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico y/o una única variación de aminoácido en un polipéptido relativo a una secuencia de nucleótido o aminoácido de una proteína PPX que no es resistente a herbicidas. En determinados ejemplos, una mutación puede incluir una sustitución, una delección, una inversión o una inserción. En algunos ejemplos, una sustitución, delección, inserción o inversión puede incluir una variación en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos. En algunos ejemplos, una sustitución, delección, inserción o inversión puede incluir una variación en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 posiciones de aminoácidos. El término "ácido nucleico" o la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o partes del mismo, que pueden ser de una sola o doble cadena, y representan la cadena sentido o antisentido. Un ácido nucleico puede incluir ADN o ARN, y puede ser de origen natural o sintético. Por ejemplo, un ácido nucleico puede incluir ARNm o ADNc. El ácido nucleico puede incluir ácido nucleico que se ha amplificado (p. ej., usando la reacción en cadena de la polimerasa). La convención "NTwt #### NTmut" se usa para indicar una mutación que da como resultado que el nucleótido de tipo silvestre NTwt en la posición #### en el ácido nucleico se reemplace por NTmutante. El código de una sola letra para nucleótidos es como se describe en el Manual de la Oficina de Patentes de EE. UU. del Procedimiento de examen de patentes, sección 2422, tabla 1. En este aspecto, la designación de nucleótido "R" significa purina tal como guanina o adenina, "Y" significa pirimidina tal como citosina o timina (uracilo si es ARN); "M" significa adenina o citosina; "K" significa guanina o timina; y "W" significa adenina o timina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de PPX mutado" se refiere a un gen de PPX que tiene una o más mutaciones en posiciones de nucleótidos relativas a una secuencia de ácido nucleico de PPX de referencia. En determinados ejemplos, un gen de PPX mutado tiene una o más mutaciones relativas a una secuencia de PPX de tipo silvestre correspondiente. Como se usa en el presente documento, la expresión "tipo silvestre" puede usarse para designar el alelo convencional en un locus, o el alelo que tiene la frecuencia más alta en una población particular. En algunos casos, el alelo de tipo silvestre se puede representar mediante un aminoácido particular o una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una proteína PPX plastidial de patata de tipo silvestre puede estar representada por la SEQ ID NO: 7. Por ejemplo, una proteína PPX mitocondrial de patata de tipo silvestre puede estar representada por la SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado tiene una o más mutaciones relativas a una secuencia de ácido nucleico PPX de referencia, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 41 43 o 45 o en posiciones homólogas de parálogos de los mismos. En algunos ejemplos, el gen PPX mutado se modifica con al menos una mutación. En otros ejemplos, el gen PPX mutado se modifica con al menos dos mutaciones. En otros ejemplos, el gen PPX mutado se modifica con al menos tres mutaciones. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX mutada. En algunos ejemplos, un gen de PPX mutado incluye dos o más mutaciones de secuencia de ácido nucleico seleccionadas de entre las Tablas 2, 3a y 3b. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una o más proteínas PPX mitocondriales mutadas. En otros ejemplos, un gen PPX mutado codifica una o más proteínas PPX plastidiales mutadas. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado es un gen PPX mitocondrial mutado; por ejemplo, StmPPX1 mutado. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado es un gen PPX mitocondrial mutado; por ejemplo, StmPPX2 mutado. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado es un gen PPX plastidial mutado; por ejemplo, StcPPX1 mutado. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado es un alelo del gen PPX mitocondrial mutado; por ejemplo, StmPPX2.1 mutado o StmPPX2.2 mutado. En algunos ejemplos, un gen de PPX mutado es un alelo del gen PPX plastidial mutado; por ejemplo, StcPPX1 mutado o StcPPX1.1 mutado. En algunos ejemplos, hay al menos una mutación en un gen PPX de plastidio y al menos una mutación en un gen PPX mitocondrial. En algunos ejemplos, una o más mutaciones en un gen PPX conduce a la resistencia a herbicidas; por ejemplo, resistencia a un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos, el gen PPX mutado codifica una proteína PPX mutada que tiene resistencia incrementada a uno o más herbicidas en comparación con una proteína PPX de referencia.

En algunos ejemplos, las mutaciones en un gen PPX mutado codifican una proteína que tiene una combinación de dos o más mutaciones. En determinados ejemplos, al menos una mutación está en el gen PPX del plastidio y al

menos una mutación está en un gen PPX mitocondrial. En determinados ejemplos, las combinaciones se seleccionan de entre las Tablas 4a y 4b. En algunos ejemplos, las mutaciones en un gen de PPX mutado codifican una proteína que tiene una combinación de tres o más mutaciones; por ejemplo, combinaciones seleccionadas de entre las Tablas 4a y 4b. En algunos ejemplos, la al menos una mutación en el gen PPX plastidial y la al menos una mutación en el gen PPX mitocondrial están en la misma posición correspondiente. En otros ejemplos, la al menos una mutación en el gen PPX del plastidio y la al menos una mutación en el gen PPX mitocondrial están en diferentes posiciones correspondientes.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína PPX" se refiere a una proteína que tiene homología e/o identidad de aminoácidos con una proteína PPX de SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 40, 42 o 44 y/o demuestra actividad PPX. En determinados ejemplos, la proteína PPX tiene un 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; o 100 % de identidad con una proteína PPX específica, tal como, por ejemplo, la proteína mitocondrial Russet Burbank PPX o las proteínas plastídicas Russet Burbank PPX. En determinados ejemplos, la proteína PPX tiene un 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; o 100 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre las secuencias en las Figuras 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 40, 42 o 44.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína PPX mutada" se refiere a una proteína PPX que tiene una o más mutaciones en posiciones de aminoácidos relativas a una secuencia de aminoácidos de PPX de referencia, o en posiciones homólogas de parálogos de los mismos. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada tiene una o más mutaciones relativas a una secuencia de aminoácidos de PPX de referencia, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de PPX de referencia que tiene SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 40, 42 o 44, o partes de los mismos. En determinados ejemplos, una proteína PPX mutada tiene una o más mutaciones relativas a una proteína de tipo silvestre correspondiente. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada tiene una o más mutaciones relativas a una proteína correspondiente que no es resistente a herbicidas. En algunos ejemplos, la proteína PPX se modifica con al menos una mutación. En otros ejemplos, la proteína PPX se modifica con al menos tres mutaciones. En algunos ejemplos, una o más proteínas PPX mitocondriales están mutadas. En otros ejemplos, una o más proteínas PPX plastídicas están mutadas. En otro ejemplo más, una o más proteínas PPX mitocondriales y una o más proteínas PPX plastídicas están mutadas. En algunos ejemplos, la expresión proteína PPX mutada se refiere a una proteína PPX que tiene resistencia incrementada a uno o más herbicidas en comparación con una proteína de referencia.

En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 52, 85, 105, 111, 130, 139, 143, 144, 145, 147, 165, 167, 170, 180, 185, 192, 193, 199, 206, 212, 219, 220, 221, 226, 228, 229, 230, 237, 244, 256, 257, 270, 271, 272, 305, 311, 316, 318, 332, 343, 354, 357, 359, 360, 366, 393, 403, 424, 426, 430, 438, 440, 444, 455, 457, 470, 478, 483, 484, 485, 487, 490, 503, 508 y 525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 58, 64, 74, 84, 93, 97, 98, 101, 119, 121, 124, 139, 150, 151, 157, 164, 170, 177, 187, 188, 195, 214, 215, 229, 230, 271, 274, 278, 283, 292, 296, 307, 324, 330, 396, 404, 406, 410, 421, 423, 434, 447, 448, 449, 451, 454, 465, 470 y 500 de SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, una planta o célula de planta puede incluir un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) mutado en el que el gen codifica una proteína que incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, N105, E111, G130, D139, P143, R144, F145, L147, F165, L167, 1170, A180, P185, E192, S193, R199, V206, E212, Y219, A220, G221, L226, M228, K229, A230, K237, S244, R256, R257, K270, P271, Q272, S305, E311, T316, T318, S332, S343, A354, L357, K359, L360, A366, L393, L403, L424, Y426, S430, K438, E440, V444, L455, K457, V470, F478, F483, D484, I485, D487, K490, L503, V508 y 1525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una planta o célula de planta puede incluir un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) mutado en el que el gen codifica una proteína que incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en D58, E64, G74, G84, L93, K97, K98, A101, S119, F121, T124, N139, E150, S151, Q157, V164, D170, C177, H187, L188, N195, P214, 1215, K229, K230, C271, D274, F283, A292, S296, C307, N324, D330, S396, A404, R406, K410, L421, A423, C434, D447, S448, V449, D451, D454, Y465, K470 y T500 de SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, una proteína PPX es un parálogo de la proteína PPX de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, la proteína PPX puede ser una proteína PPX plastidial de la patata) y la proteína PPX puede tener un N en la posición correspondiente a la posición 52 de la SEQ ID NO: 1, en la que el N está sustituido con un aminoácido distinto de N; una K en la posición correspondiente a la posición 272 de la SEQ ID NO: 1, en la que K está sustituido con un aminoácido distinto de K; una S en la posición correspondiente a la posición 359 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S; y/o una S en la posición correspondiente a la posición 525 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, N105, E111, G130, D139, P143, R144, F145, L147, F165, L167, 1170, A180, P185, E192, S193, R199, V206, E212, Y219, A220, G221, L226, M228, K229, A230, K237, S244, R256, R257, K270, P271, Q272, S305, E311, T316, T318, S332, S343, A354, L357, K359, L360, A366, L393, L403, L424, Y426, S430, K438, E440, V444, L455, K457, V470, F478, F483, D484, I485, D487, K490, L503, V508, y 1525 de SEQ ID

NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en D58, E64, G74, G84, L93, K97, K98, A101, S119, F121, T124, N139, E150, S151, Q157, V164, D170, C177, H187, L188, N195, P214, I215, K229, K230, C271, D274, F283, A292, S296, C307, N324, D330, S396, A404, R406, K410, L421, A423, C434, D447, S448, V449, D451, D454, Y465, K470 y T500 de SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, una proteína PPX es un parólogo de la proteína PPX de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, la proteína PPX puede ser una proteína PPX plastidial de la patata) y la proteína PPX puede tener dos o más mutaciones y tiene una o más de: (1) un N en la posición correspondiente a la posición 52 de la SEQ ID NO: 1, en la que el N está sustituido con un aminoácido distinto de N; (2) una K en la posición correspondiente a la posición 272 de la SEQ ID NO: 1, en la que K está sustituido con un aminoácido distinto de K; (3) una S en la posición correspondiente a la posición 359 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S; y/o (4) una S en la posición correspondiente a la posición 525 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, N105, E111, G130, D139, P143, R144, F145, L147, F165, L167, I170, A180, P185, E192, S193, R199, V206, E212, Y219, A220, G221, L226, M228, K229, A230, K237, S244, R256, R257, K270, P271, Q272, S305, E311, T316, T318, S332, S343, A354, L357, K359, L360, A366, L393, L403, L424, Y426, S430, K438, E440, V444, L455, K457, V470, F478, F483, D484, 1485, D487, K490, L503, V508 y 1525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en D58, E64, G74, G84, L93, K97, K98, A101, S119, F121, T124, N139, E150, S151, Q157, V164, D170, C177, H187, L188, N195, P214, I215, K229, K230, C271, D274, F283, A292, S296, C307, N324, D330, S396, A404, R406, K410, L421, A423, C434, D447, S448, V449, D451, D454, Y465, K470 y T500 de SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, una proteína PPX es un parólogo de la proteína PPX de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, la proteína PPX puede ser una proteína PPX de la patata) y la proteína PPX tiene tres o más mutaciones y tiene una o más de: (1) un N en la posición correspondiente a la posición 52 de la SEQ ID NO: 1, en la que el N está sustituido con un aminoácido distinto de N; (2) una K en la posición correspondiente a la posición 272 de la SEQ ID NO: 1, en la que K está sustituido con un aminoácido distinto de K; (3) una S en la posición correspondiente a la posición 359 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S; y/o (4) una S en la posición correspondiente a la posición 525 de la SEQ ID NO: 1, en la que S está sustituido con un aminoácido distinto de S.

Conjuntamente con los diversos aspectos, ejemplos, composiciones y procedimientos desvelados en el presente documento, una proteína PPX mutada incluye una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de entre las Tablas 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 8a-f, 9a-d y 10. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de entre las Tablas 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 8a-f, 9a-d y 10. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de entre las Tablas 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 8a-f, 9a-d y 10. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye una o más mutaciones de secuencia de ácido nucleico seleccionadas de entre las Tablas 2, 3a y 3b.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, en determinados ejemplos, una proteína PPX mutada puede incluir una combinación de mutaciones; por ejemplo, una combinación de mutaciones seleccionadas de entre las Tablas 4a y 4b. En algunos ejemplos, la proteína PPX mutada incluye una combinación de dos o más mutaciones; por ejemplo, combinaciones seleccionadas de entre las Tablas 4a y 4b. En algunos ejemplos, la proteína PPX mutada incluye una combinación de tres o más mutaciones; por ejemplo, combinaciones seleccionadas de entre las Tablas 4a y 4b.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la proteína PPX puede ser un parólogo de la proteína PPX de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, la proteína PPX puede ser una proteína PPX mitocondrial de la patata) y la proteína PPX puede tener uno o más aminoácidos PPX correspondientes a la SEQ ID NO: 9. Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la una o más mutaciones en un gen PPX mutado pueden codificar una proteína PPX mutada que tiene una o más mutaciones, dos o más mutaciones, tres o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en una proteína PPX mutada puede incluir una o más mutaciones en la posición de aminoácido correspondiente a una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en las posiciones 58, 64, 74, 84, 93, 97, 98, 101, 119, 121, 124, 139, 150, 151, 157, 164, 170, 177, 187, 188, 195, 214, 215, 229, 230, 271, 274, 278, 283, 292, 296, 307, 324, 330, 396, 404, 406, 410, 421, 423, 434, 447, 448, 449, 451, 454, 465, 470 y 500 de SEQ ID NO: 9.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la célula de planta puede tener un gen PPX mutado. En determinados ejemplos, el gen PPX mutado codifica una proteína PPX mutada. En determinados ejemplos, la célula de planta puede ser parte de una planta resistente a herbicidas. El procedimiento puede incluir introducir en una célula de planta una oligonucleobase de reparación de gen (GRON); por ejemplo, usar una GRON con una mutación dirigida en un gen PPX. En determinados ejemplos, la célula de planta producida por el procedimiento puede incluir un gen PPX capaz de expresar una proteína PPX mutada. El procedimiento puede incluir además identificar una célula de planta o una planta que incluye una célula de planta que incluye (1) un gen de PPX mutado y/o (2) crecimiento normal y/o actividad catalítica en comparación con una célula de planta de tipo silvestre correspondiente. La planta resistente a

herbicidas que tiene una célula de planta tal como se describe en el presente documento se puede identificar en presencia de un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos, la célula de planta no es transgénica. En algunos ejemplos, la célula de planta es transgénica. Una planta que incluye una célula de planta tal como se describe en el presente documento puede ser una planta resistente a herbicidas no transgénica o transgénica; por ejemplo, la planta y/o célula de planta puede tener un gen de PPX mutado que da como resultado resistencia a al menos un herbicida. En algunos ejemplos, una planta que tiene una célula de planta como se describe en el presente documento puede producirse asexualmente; por ejemplo, a partir de una o más células de plantas o a partir de tejido de plantas constituido por una o más células de plantas; por ejemplo, de un tubérculo. En otros ejemplos, una planta que tiene una célula de planta tal como se describe en el presente documento puede producirse sexualmente.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir una planta resistente a herbicidas. El procedimiento puede incluir introducir en una célula de planta una oligonucleobase de reparación de gen (GRON); por ejemplo, usando una GRON diseñada con una mutación dirigida en un gen PPX. El gen PPX mutado puede expresar una proteína PPX mutada. El procedimiento puede incluir además la identificación de una planta que tiene crecimiento normal y/o actividad catalítica en comparación con una célula de planta de tipo silvestre correspondiente. La planta puede identificarse en presencia de un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos, la planta no es transgénica. La planta puede ser en algunos ejemplos una planta resistente a herbicidas no transgénica; por ejemplo, la planta puede incluir un gen de PPX mutado que da como resultado resistencia o tolerancia a al menos un herbicida.

En otro aspecto, se proporciona una semilla que incluye un gen de PPX mutado. En algunos ejemplos, la semilla tiene un gen PPX mutado. En algunos ejemplos, el PPX mutado codifica una proteína PPX mutada. En algunos ejemplos, la proteína PPX mutada puede ser resistente a un herbicida; por ejemplo, un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos, una planta cultivada a partir de la semilla es resistente a al menos un herbicida; por ejemplo, un herbicida inhibidor de PPX.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para aumentar la resistencia a herbicidas de una planta mediante: (a) el cruce de una primera planta con una segunda planta, en el que la primera planta que incluye un gen PPX mutado, en el que el gen codifica una proteína PPX mutada; (b) la selección de una población resultante del cruce para aumentar la resistencia a herbicidas; por ejemplo, resistencia incrementada a un herbicida inhibidor de PPX; (c) la selección de un miembro resultante del cruce que tiene resistencia a herbicida aumentada; y/o (d) la producción de semillas resultantes del cruce. En algunos ejemplos, se produce una semilla híbrida mediante cualquiera de los procedimientos tales como los descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, las plantas se cultivan a partir de semillas producidas mediante cualquiera de los procedimientos tales como los descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, las plantas y/o semillas no son transgénicas. En algunos ejemplos, las plantas y/o semillas son transgénicas.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para controlar malas hierbas en un campo que contiene plantas aplicando una cantidad eficaz de al menos un herbicida a un campo que contiene malas hierbas y plantas. En algunos ejemplos del procedimiento, el al menos un herbicida es un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos del procedimiento, una o más de las plantas en el campo incluyen un gen de PPX mutado; por ejemplo tal como se describe en el presente documento. En algunos ejemplos del procedimiento, una o más de las plantas en el campo incluyen una planta no transgénica o transgénica que tiene un gen de PPX mutado tal como se describe en el presente documento. En algunos ejemplos, el gen PPX mutado codifica una proteína PPX mutada. En algunos ejemplos, una más de las plantas en el campo es resistente a herbicidas; por ejemplo, resistente a un herbicida inhibidor de PPX.

En otro aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína PPX o una porción de la misma. En algunos ejemplos, el ácido nucleico aislado incluye una o más de las mutaciones del gen PPX tales como se describe en el presente documento. En algunos ejemplos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína PPX mutada como se desvela en el presente documento. En determinados ejemplos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína PPX que es resistente a herbicidas; por ejemplo, resistente a un herbicida inhibidor de PPX.

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que contiene un ácido nucleico aislado de un gen PPX mutado. En algunos ejemplos, el vector de expresión contiene un ácido nucleico aislado que codifica una proteína PPX. En algunos ejemplos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene una mutación seleccionada de entre las mutaciones mostradas en las Tablas 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 8a-f, 9a-d y 10. En determinados ejemplos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene dos o más mutaciones. En algunos ejemplos, las dos o más mutaciones se seleccionan de entre las Tablas 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 8a-f, 9a-d y 10. En determinados ejemplos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína PPX que es resistente a herbicidas; por ejemplo, resistente a un herbicida inhibidor de PPX.

Como se usa en el presente documento, el término "herbicida" se refiere a cualquier sustancia química o sustancia que puede matar a una planta o que puede detener o reducir el crecimiento y/o la viabilidad de una planta. En algunos ejemplos, la resistencia a los herbicidas es la capacidad heredable genéticamente de una planta para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con una concentración de herbicida que normalmente mataría o dañaría gravemente una planta de tipo silvestre no modificada. En algunos ejemplos, conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, el herbicida es

un herbicida inhibidor de PPX. En algunos ejemplos, un herbicida inhibidor de PPX es un herbicida de una familia química seleccionada de entre el grupo de familias químicas enumeradas en la Tabla 5. En algunos ejemplos, un herbicida inhibidor de PPX es un herbicida de una familia química seleccionada de entre el grupo de familias químicas que consiste en N-feniltalimidias, triazolinonas y pirimidindionas. En algunos ejemplos, un herbicida inhibidor de PPX se selecciona de entre el grupo de herbicidas enumerados en la Tabla 5. En algunos ejemplos, el herbicida inhibidor de PPX se selecciona de entre el grupo de herbicidas que consiste en flumioxazina, sulfentrazona y saflufenacilo. En otros ejemplos, el herbicida inhibidor de PPX es un herbicida de flumioxazina. En otros ejemplos, el herbicida inhibidor de PPX es un herbicida de sulfentrazona. En otros ejemplos, el herbicida inhibidor de PPX es un herbicida saflufenacilo.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la planta o célula de planta es de un cultivo de planta seleccionado de entre el grupo que consiste en patata, girasol, remolacha azucarera, maíz, algodón, soja, trigo, centeno, avena, arroz, colza, frutas, verduras, tabaco, cebada, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, zanahoria, lechuga, cebolla, soja spp, caña de azúcar, guisante, haba común, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y pastos forrajeros, lino, colza oleaginosa, pepino, campanilla, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, petunia, tulipán, iris, lirio, y plantas productoras de nueces en la medida en que no se mencionen ya específicamente. En algunos ejemplos, la planta o célula de planta es de una especie seleccionada de la Tabla 6. En algunos ejemplos, la planta o célula de planta es de una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, *Solarium tuberosum*, *Solarium phureja*, *Oryza sativa*, *Amaranthus tuberculatum*, *Zea mays*, *Brassica napus* y *Glycine max*. En algunos ejemplos, la planta o célula de planta es una variedad cultivada de patata Russet Burbank. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de Russet Burbank. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Arabidopsis thaliana*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Solarium tuberosum*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Solanum phureja*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Zea mays*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Oryza sativa*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Amaranthus tuberculatus*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Sorghum bicolor*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Ricinus communis*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Brassica napus*. En algunos ejemplos, un gen PPX mutado codifica una proteína PPX de *Glycine max*. En algunos ejemplos, un gen de PPX mutado At4g01690 codifica una proteína PPX de *Arabidopsis thaliana*. En algunos ejemplos, un gen de PPX mutado At5g14220 codifica una proteína PPX de *Arabidopsis thaliana*.

En cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos o composiciones desveladas en el presente documento pueden incluir uno o más genes de PPX mutados. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones implican uno o más genes de PPX mutados que codifican una o más proteínas PPX mitocondriales. En otros ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen uno o más genes de PPX mutados que codifican una o más proteínas PPX plastídicas. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen uno o más genes de PPX mutados que codifican una o más proteínas PPX plastídicas y proteínas PPX mitocondriales. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un gen de PPX mutado mitocondrial StmPPX1. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un gen de PPX mutado mitocondrial StmPPX2. En algunos ejemplos, la planta tiene el gen de PPX mutado plastidial StcPPX1. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un alelo del gen PPX mitocondrial mutado StcPPX2.1. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un alelo del gen PPX mutado mitocondrial StcPPX2.2. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un alelo del gen PPX mutado plastidial StcPPX1. En algunos ejemplos, los procedimientos y composiciones incluyen un alelo del gen PPX mutado plastidial StcPPX1.1.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que incluye secuencias de control y codificación necesarias para la producción de un ARN, que puede tener una función no codificante (p. ej., un ARN ribosómico o de transferencia) o que pueden codificar un polipéptido o un precursor polipeptídico. El ARN o polipéptido puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia de codificación mientras se conserve la actividad o función deseada.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte del mismo, que puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm y/o el polipéptido o un fragmento del mismo. Las secuencias de codificación incluyen exones en un ADN genómico o transcritos de ARN primarios inmaduros, que se unen entre sí mediante la maquinaria bioquímica de la célula para proporcionar un ARNm maduro. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia de codificación puede deducirse de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia no codificante" se refiere a una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte del mismo, que no se transcribe en aminoácidos *in vivo*, en la que el ARNt no interactúa para colocar o intentar coloca un aminoácido. Las secuencias no codificantes incluyen secuencias de intrón en ADN genómico o transcritos primarios de ARN inmaduros, y secuencias asociadas a genes tales como promotores, potenciadores, silenciadores, etc.

Una nucleobase es una base, que en determinados ejemplos preferentes es una purina, pirimidina o un derivado o

análogo de la misma. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un resto pentosefuranosilo, por ejemplo, un ribósido opcionalmente sustituido o 2'-desoxirribósido. El resto puede ser cualquier grupo que aumente la unión al ADN y/o disminuya la degradación de la nucleasa en comparación con un nucleósido que no tiene el resto. Los nucleósidos se pueden unir mediante uno de varios restos de enlace, que pueden contener o no fósforo. Los nucleósidos que están unidos por enlaces fosfodiéster no sustituidos se denominan nucleótidos. Como se usa en el presente documento, el término "nucleobase" incluye nucleobases de péptidos, las subunidades de ácidos nucleicos peptídicos y nucleobases de morfolina así como también nucleósidos y nucleótidos.

Una oligonucleobase es un polímero que comprende nucleobases; preferentemente al menos una parte de la cual puede hibridarse por emparejamiento de bases Watson-Crick con un ADN que tiene la secuencia complementaria. Una cadena de oligonucleobase puede tener un solo extremo 5' y 3', que son las nucleobases finales 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 oligonucleobases que pueden ser complementarias e hibridadas mediante emparejamiento de bases Watson-Crick. Las nucleobases de tipo ribo incluyen nucleobases que contienen pentosefuranosilo 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 pentosefuranosilo.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, una cadena de oligonucleobase puede incluir tanto cadenas de oligonucleobases como segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobases. Una cadena de oligonucleobase puede tener un extremo 5' y un extremo 3', y cuando una cadena oligonucleobase es coextensiva con una cadena, los extremos 5' y 3' de la cadena también son extremos 5' y 3' de la cadena.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleobase de reparación de gen" o "GRON" se refiere a oligonucleobases, que incluyen oligonucleótidos dúplex mixtos, moléculas que no contienen nucleótidos, oligodesoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas de reparación de genes.

Como se usa en el presente documento, el término "transgénico" se refiere a un organismo o célula que tiene ADN procedente de otro organismo insertado en su genoma. Por ejemplo, en algunos ejemplos, un organismo o célula transgénica incluye ADN insertado que incluye un promotor extraño y/o una región codificante.

Como se usa en el presente documento, el término "no transgénico" se refiere a un organismo o célula que no tiene ADN procedente de otro organismo insertado en su genoma aunque una planta o célula no transgénica puede tener una o más mutaciones dirigidas introducidas artificialmente.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado", cuando se refiere a un ácido nucleico (p. ej., un oligonucleótido tal como ARN, ADN o un polímero mixto) se refiere a un ácido nucleico que está separado de una porción sustancial del genoma en el que se produce naturalmente y/o está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a dicho ácido nucleico. Por ejemplo, cualquier ácido nucleico que se ha producido sintéticamente (p. ej., mediante condensación de base en serie) se considera aislado. Análogamente, los ácidos nucleicos que se expresan de forma recombinante, se clonan, se producen mediante una reacción de extensión de cebador (p. ej., RCP) o se extirpan de otro modo a partir de un genoma también se consideran aislados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de aminoácidos" se refiere a un polipéptido o secuencia de proteína. La convención "AAwt ### AAmut" se usa para indicar una mutación que da como resultado el aminoácido de tipo silvestre AAwt en la posición ### en el polipéptido que se reemplaza por el mutante AAmut.

Como se usa en el presente documento, el término "complemento" se refiere a la secuencia complementaria de un ácido nucleico de acuerdo con las reglas de emparejamiento convencional de Watson/Crick. Una secuencia de complemento también puede ser una secuencia de ARN complementaria a la secuencia de ADN o su secuencia complementaria, y también puede ser un ADNc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente complementario" se refiere a dos secuencias que se hibridan en condiciones de hibridación casi rigurosas. El experto en la técnica entenderá que las secuencias sustancialmente complementarias no necesitan hibridarse en toda su longitud.

Como se usa en el presente documento, el término "codón" se refiere a una secuencia de tres nucleótidos adyacentes (ARN o ADN) que constituyen el código genético que determina la inserción de un aminoácido específico en una cadena polipeptídica durante la síntesis proteica o la señal para detener la síntesis proteica. El término "codón" también se usa para referirse a las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARN mensajero en el que se transcribe el ADN original.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la similitud de secuencia entre proteínas y ADN. El término "homología" u "homólogo" se refiere a un grado de identidad. Puede haber homología parcial u homología completa. Una secuencia parcialmente homóloga es una que tiene menos de 100 % de identidad de secuencia cuando se compara con otra secuencia.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" en términos cuantitativos se refiere a más o menos 10 %. Por ejemplo, "aproximadamente 3 %" abarcaría 2,7-3,3 % y "aproximadamente 10 %" abarcaría 9-11 %. Además, cuando en el presente documento se usa "aproximadamente" conjuntamente con un término cuantitativo, se entiende que además del valor más o menos 10 %, también se contempla y se describe el valor exacto del término cuantitativo. Por ejemplo, el término "aproximadamente el 3 %" contempla expresamente, describe e incluye exactamente el 3 %.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 es la secuencia de aminoácidos de una proteína PPX de cloroplasto (plastidio) de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1).
- La Figura 2 es la secuencia de ácido nucleico de un ADNc de PPX de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (plastidio) (SEQ ID NO: 2).
- La Figura 3 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 3).
- La Figura 4 es la secuencia de ácido nucleico de un ADNc de PPX mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 4).
- La Figura 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Amaranthus tuberculatus* (SEQ ID NO: 5).
- La Figura 6 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Amaranthus tuberculatus* (SEQ ID NO: 6).
- La Figura 7 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Solanum tuberosum* StcPPX (SEQ ID NO: 7).
- La Figura 8 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX plastidial de *Solanum tuberosum* (SEQ ID NO: 8).
- La Figura 9 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* (SEQ ID NO: 9).
- La Figura 10 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* (SEQ ID NO: 10).
- La Figura 11 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Zea mays* (SEQ ID NO: 11).
- La Figura 12 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX plastidial de *Zea mays* (SEQ ID NO: 12).
- La Figura 13 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Zea mays* (SEQ ID NO: 13).
- La Figura 14 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Zea mays* (SEQ ID NO: 14).
- La Figura 15 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 15).
- La Figura 16 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX plastidial de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 16).
- La Figura 17 es la secuencia de aminoácidos del ADNc de proteína PPX mitocondrial de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 17).
- La Figura 18 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 18).
- La Figura 19 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial *Sorghum bicolor* (SEQ ID NO: 19).
- La Figura 20 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX plastidial de *Sorghum bicolor* (SEQ ID NO: 20).
- La Figura 21 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial *Sorghum bicolor* (SEQ ID NO: 21).
- La Figura 22 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Sorghum bicolor* (SEQ ID NO: 22).
- La Figura 23 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Ricinus communis* (SEQ ID NO: 23).
- La Figura 24 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX plastidial de *Ricinus communis* (SEQ ID NO: 24).
- La Figura 25 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Ricinus communis* (SEQ ID NO: 25).
- La Figura 26 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Ricinus communis* (SEQ ID NO: 26).
- La Figura 27 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX1 (SEQ ID NO: 27).
- La Figura 28 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX1 (SEQ ID NO: 28).
- La Figura 29 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.1 (SEQ ID NO: 29).
- La Figura 30 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.1 (SEQ ID NO: 30).
- La Figura 31 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.2 (SEQ ID NO: 31).
- La Figura 32 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.2 (SEQ ID NO: 32).
- La Figura 33 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Brassica napus* BncPPX1 (SEQ ID NO: 33).
- La Figura 34 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX de *Brassica napus* BncPPX1 (SEQ ID NO: 34).

La Figura 35 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Brassica napus* BncPPX2 (SEQ ID NO: 35).

La Figura 36 es la secuencia de ácido nucleico del ADNc de PPX de *Brassica napus* BncPPX2 (SEQ ID NO: 36).

5 La Figura 37 es la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Brassica napus* BCLPPX3 (SEQ ID NO: 37).

La Figura 38 es la secuencia parcial de ácido nucleico del ADNc de PPX de *Brassica napus* BncPPX3 (SEQ ID NO: 38).

La Figura 39 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Glycine max* GmcPPX1-1 (SEQ ID NO: 39).

10 La Figura 40 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Glycine max* GmcPPX1-2 (SEQ ID NO: 40).

La Figura 41 es la secuencia de ácido nucleico de la proteína PPX plastidial de *Glycine max* GmcPPX1 (SEQ ID NO: 41).

15 La Figura 42 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX plastidial de *Glycine max* GmcPPX2 (SEQ ID NO: 42).

La Figura 43 es la secuencia de ácido nucleico de la proteína PPX plastidial de *Glycine max* GmcPPX2 (SEQ ID NO: 43).

La Figura 44 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PPX mitocondrial de *Glycine max* GmcPPX (SEQ ID NO: 44).

20 La Figura 45 es la secuencia de ácido nucleico de la proteína PPX mitocondrial de *Glycine max* GmcPPX (SEQ ID NO: 45).

La Figura 46 es una alineación de proteínas PPX de diversas especies de planta.

La Figura 47 es una tabla de posiciones homólogas de aminoácidos en secuencias de aminoácidos de PPX de plantas de diversas especies.

25 La Figura 48 es una tabla de posiciones homólogas de aminoácidos en secuencias de aminoácidos de PPX de plantas de diversas especies.

Descripción detallada de la invención

Sistema de desarrollo de rasgos rápidos (RTDS™)

30 En cualquiera de los diversos aspectos y ejemplos de las composiciones y procedimientos desvelados en el presente documento, pueden realizarse mutaciones en genes y proteínas usando, por ejemplo, la tecnología del Sistema de Desarrollo de Rasgos Rápidos (RTDS™) desarrollado por Cibus. En combinación o solo, las plantas que contienen cualquiera de las mutaciones desveladas en el presente documento pueden formar la base de nuevos productos resistentes a herbicidas. También se proporcionan semillas producidas a partir de plantas mutadas en las que los genes PPX son homocigóticos o heterocigóticos para las mutaciones. Las mutaciones desveladas en el
35 presente documento pueden estar en combinación con cualquier otra mutación conocida o con mutaciones descubiertas en el futuro.

Como se usa en el presente documento, el término "heterocigótico" se refiere a que tiene alelos diferentes en uno o más locus genéticos en segmentos de cromosomas homólogos. Como se usa en el presente documento, "heterocigótico" también se puede referir a una muestra, una célula, una población de células o un organismo en el
40 que pueden detectarse diferentes alelos en uno o más locus genéticos. Las muestras heterocigóticas también pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si un electroferograma de secuenciación muestra dos picos en un solo locus y ambos picos tienen aproximadamente el mismo tamaño, la muestra puede caracterizarse como heterocigótica. O bien, si un pico es más pequeño que otro, pero es al menos aproximadamente el 25 % del tamaño del pico más grande, la muestra
45 puede caracterizarse como heterocigótica. En algunos ejemplos, el pico más pequeño es al menos aproximadamente el 15 % del pico más grande. En otros ejemplos, el pico más pequeño es al menos aproximadamente el 10 % del pico más grande. En otros ejemplos, el pico más pequeño es al menos aproximadamente el 5 % del pico más grande. En otros ejemplos, se detecta una cantidad mínima del pico más pequeño.

50 Como se usa en el presente documento, "homocigótico" se refiere a que tiene alelos idénticos en uno o más locus genéticos en segmentos de cromosomas homólogos. "Homocigótico" también puede referirse a una muestra, una célula, una población de células o un organismo en el que pueden detectarse los mismos alelos en uno o más locus genéticos. Las muestras homocigóticas pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si un electroferograma de secuenciación muestra un único pico en un locus particular, la muestra puede denominarse "homocigótica" con respecto a ese
55 locus.

El término "hemicigótico" se refiere a un gen o segmento de gen que está presente solo una vez en el genotipo de una célula o un organismo porque el segundo alelo está eliminado. Como se usa en el presente documento, "hemicigótico" también puede referirse a una muestra, una célula, una población de células o un organismo en el
60 que pueden detectarse un alelo en uno o más locus genéticos solo una vez en el genotipo.

En algunos ejemplos, RTDS se basa en la alteración de un gen dirigido mediante la utilización del propio sistema de reparación de genes de la célula para modificar específicamente la secuencia del gen in situ y no insertar secuencias de control de expresión genética y/o ADN extraño. Este procedimiento puede efectuar un cambio preciso en la secuencia genética mientras que el resto del genoma se deja inalterado. En contraste con los GMO transgénicos convencionales, no hay integración de material genético extraño, ni queda ningún material genético extraño en la planta. En muchos ejemplos, los cambios en la secuencia genética introducida por RTDS no se insertan aleatoriamente. Dado que los genes afectados permanecen en su emplazamiento nativo, no se produce un patrón de expresión aleatorio, descontrolado o adverso.

El RTDS que efectúa este cambio es un oligonucleótido sintetizado químicamente (p. ej., usando una oligonucleobase de reparación de genes (GRON)) que puede estar compuesto de bases de ADN y de ARN modificado así como de otros restos químicos, y está diseñado para hibridar en el emplazamiento del gen dirigido para crear un par de bases no coincidentes. Este par de bases no coincidente actúa como una señal para atraer el propio sistema de reparación de genes natural de la célula a ese sitio y corregir (reemplazar, insertar o eliminar) el(los) nucleótido(s) designados dentro del gen. Una vez que se completa el procedimiento de corrección, la molécula de RTDS se degrada y el gen ahora modificado o reparado se expresa bajo los mecanismos de control endógeno normales de ese gen.

Oligonucleobases de reparación de genes ("GRON")

Los procedimientos y composiciones desvelados en el presente documento se pueden poner en práctica o fabricar con "oligonucleobases de reparación de genes", por ejemplo, que tienen las conformaciones y las químicas como se describe en detalle a continuación. Las "oligonucleobases de reparación de genes" tal como se contempla en el presente documento también se han descrito en publicaciones científicas y literatura de patentes usando otros nombres que incluyen "oligonucleobases recombinagénicas"; "oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN"; "oligonucleótidos quiméricos"; "oligonucleótidos dúplex mixtos" (MDON); "oligonucleótidos de ADN de ARN (RDO)"; "oligonucleótidos dirigidos a genes"; "genoplastos"; "oligonucleótidos modificados monocatenarios"; "vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos monocatenarios" (SSOMV); "vectores mutacionales dúplex"; "vectores mutacionales heterodúplex";

Las oligonucleobases que tienen las conformaciones y químicas descritas en la Patente de los EE.UU. n.º 5.565.350 por Kmiec (Kmiec I) y la Patente de los EE.UU. n.º 5.731.181 por Kmiec (Kmiec II) son adecuadas para su uso como "oligonucleobases de reparación de genes" de la presente divulgación. Las oligonucleobases de reparación de genes en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos cadenas complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos de tipo ARN (un "segmento de ARN") que están emparejados a nucleótidos de tipo ADN de la otra cadena.

Kmiec II desvela que los nucleótidos que no contienen base de purina y pirimidina pueden sustituirse por nucleótidos. Las moléculas de reparación génica adicionales que se pueden usar para la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las descritas en las Patentes de los EE.UU. n.ºs 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 la Patente Internacional n.º PCT/US00/23457; y en las publicaciones de Patente Internacional n.ºs WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la oligonucleobase de reparación de genes puede ser un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) en el que los nucleótidos de tipo ARN del oligonucleótido dúplex mixto se hacen resistentes a la RNasa reemplazando el 2'-hidroxilo con una funcionalidad fluoro, cloro o bromo o colocando un sustituyente en el 2'-O. Los sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes enseñados por Kmiec II. Los sustituyentes alternativos pueden incluir, pero sin limitación, los sustituyentes enseñados por la Patente de los EE.UU. n.º 5.334.711 (Sproat) y los sustituyentes enseñados por las publicaciones de Patentes EP 629 387 y EP 679 657 (colectivamente, las Aplicaciones Martin).

Como se usa en el presente documento, un derivado de 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido con un sustituyente descrito en las aplicaciones Martin o Sproat se denomina ribonucleótido "2'-sustituido". Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleótido de tipo ARN" significa un nucleótido 2'-hidroxilo o 2'-sustituido que está unido a otros nucleótidos de un oligonucleótido dúplex mixto mediante un enlace fosfodiéster no sustituido o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II. Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleótido de tipo desoxirribo" significa un nucleótido que tiene un 2'-H, que puede unirse a otros nucleótidos de una oligonucleobase de reparación de genes mediante un enlace fosfodiéster no sustituido o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la oligonucleobase de reparación de genes puede ser un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) que está unido únicamente por enlaces fosfodiéster no sustituidos. En ejemplos alternativos, el enlace es por fosfodiésteres sustituidos, derivados de fosfodiéster y enlaces no basados en fósforo tal como lo enseña Kmiec II. En

otro ejemplo más, cada nucleótido de tipo ARN en el oligonucleótido dúplex mixto es un nucleótido 2'-sustituido. Ejemplos preferentes particulares de ribonucleótidos 2'-sustituídos incluyen, pero sin limitación, 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxietiloxi, 2'-metoxietiloxi, ribonucleótidos sustituidos con 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Ejemplos más preferentes de ribonucleótidos 2'-sustituídos son nucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi y 2'-aliloxi. En otro **ejemplo**, el oligonucleótido dúplex mixto está unido por enlaces fosfodiéster no sustituidos.

Aunque los oligonucleótidos dúplex mixtos (MDON) que tienen solo un único tipo de nucleótido de tipo ARN 2'-sustituido se sintetizan más de manera práctica, los procedimientos desvelados en el presente documento pueden ponerse en práctica también con oligonucleótidos dúplex mixtos 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, en consecuencia, la expresión segmento de ARN abarca expresiones tales como "segmento de ARN interrumpido". Un segmento de ARN ininterrumpido se denomina segmento de ARN contiguo. En un **ejemplo** alternativo, un segmento de ARN puede contener nucleótidos 2'-OH alternativos resistentes a la RNasa y no sustituidos. Los oligonucleótidos dúplex mixtos tienen preferentemente menos de 100 nucleótidos y más preferentemente menos de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. La primera y la segunda cadenas son bases emparejadas de Watson-Crick. En un **ejemplo**, las cadenas del oligonucleótido dúplex mixto están covalentemente unidas por un engarce, tal como un hexa, penta o tetranucleótido monocatenario, de modo que la primera y la segunda cadenas son segmentos de una única cadena de oligonucleótidos que tiene un único extremo 3' y un solo 5'. Los extremos 3' y 5' pueden protegerse mediante la adición de un "capuchón de horquilla" por la cual los nucleótidos 3' y 5' terminal son Watson-Crick emparejados a nucleótidos adyacentes. Un segundo capuchón de horquilla puede, adicionalmente, colocarse en la unión entre la primera y la segunda cadena distantes de los extremos 3' y 5', de modo que el emparejamiento de Watson-Crick entre la primera y la segunda cadena se establezca.

La primera y la segunda cadena contienen dos regiones que son homólogas con dos fragmentos del gen objetivo, es decir, tienen la misma secuencia que el gen objetivo. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y puede contener uno o más nucleótidos de tipo ADN del segmento de ADN de conexión y también puede contener nucleótidos de tipo ADN que no están dentro del segmento de ADN intermedio. Las dos regiones de homología están separadas por, y cada una es adyacente a, una región que tiene una secuencia que difiere de la secuencia del gen objetivo, denominada "región heteróloga". La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos no coincidentes. Los nucleótidos no coincidentes pueden ser contiguos o como alternativa pueden separarse por uno o dos nucleótidos que son homólogos con el gen objetivo. Como alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción o uno, dos, tres o cinco o unos pocos nucleótidos. Como alternativa, la secuencia del oligonucleótido dúplex mixto puede diferir de la secuencia del gen objetivo solo mediante la delección de uno, dos, tres o cinco o algunos nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto. La longitud y posición de la región heteróloga es, en este caso, considerada como la longitud de la delección, aunque no hay nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos del gen objetivo que son complementarios a las dos regiones homólogas es idéntica a la longitud de la región heteróloga en la que se pretende una sustitución o sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas se separan de ese modo en el oligonucleótido dúplex mixto más lejos que sus fragmentos homólogos complementarios lo están en el gen, y el inverso es aplicable cuando la región heteróloga codifica una delección.

Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos dúplex mixtos son cada uno una parte de una región homóloga, es decir, una región que es idéntica en secuencia a un fragmento del gen objetivo, cuyos segmentos juntos preferentemente contienen 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 un ejemplo, los segmentos de ARN de las regiones de homología están separados por, y adyacentes a, es decir, "conectados por" un segmento de ADN intermedio. En un ejemplo, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN intermedio. Un segmento de ADN intermedio que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido dúplex mixto se denomina un "segmento de mutador".

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la oligonucleobase de reparación de genes (GRON) puede ser un vector de mutación de oligodesoxinucleótidos monocatenario (SSOMV), por ejemplo, tal como se desvela en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US00/23457, las Patentes de los EE.UU. n.ºs 6.271.360, 6.479.292, y 7.060.500.

La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales descritos, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. n.ºs 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.º WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas con la secuencia objetivo separadas por una región que contiene la alteración genética deseada denominada región del mutador. La región del mutador puede tener una secuencia que tiene la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia objetivo, pero que tiene una secuencia diferente. Dicha región de mutador puede causar una sustitución. Como alternativa, las regiones homólogas en el SSOMV pueden ser contiguas entre sí, mientras que las regiones en el gen objetivo que tienen la misma secuencia están separadas por uno, dos o más nucleótidos. Dicho SSOMV causa una delección del gen objetivo de los nucleótidos que están ausentes del SSOMV. Por último, la

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

5 Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que están unidos por enlaces fosfodiéster no modificados, excepto que el enlace internucleotídico 3' terminal y/o 5' terminal o como alternativa los dos enlaces internucleotídicos 3' terminal y/o 5' terminal pueden ser un fosforotioato o fosfoamidato. Como se usa en el presente documento, un enlace internucleotídico es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace entre el nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' y un sustituyente bloqueante. En un ejemplo específico, la longitud del SSOMV está entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología son, en consecuencia, una longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología debe tener cada una al menos 8 desoxinucleótidos.

15 El SSOMV puede diseñarse para ser complementario a la cadena codificante o no codificante del gen objetivo. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una única base, se prefiere que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido dirigido sea una pirimidina. En la medida en que sea uniforme con lograr el resultado funcional deseado, se prefiere que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido dirigido en la cadena complementaria sean pirimidinas. Particularmente preferentes son los SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido mutante C o T no coincide, respectivamente, con un nucleótido C o T en la cadena complementaria.

20 Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un sustituyente de bloqueo 5' que está unido a los carbonos 5' terminales a través de un engarce. La química del engarce no es crítica que no sea de su longitud, que preferentemente debe tener al menos 6 átomos de longitud y que el engarce debe ser flexible. Se puede usar una diversidad de sustituyentes no tóxicos tales como biotina, colesterol u otros esteroides o un colorante fluorescente catiónico no intercalante. Los reactivos particularmente preferentes para fabricar SSOMV son los reactivos comercializados como Cy3™ y Cy5™ por Glen Research, Sterling Va. (Ahora GE Healthcare), que son fosforoamiditas bloqueadas que tras la incorporación a un oligonucleótido dan colorantes de indomonocarbocianina e indodicarbocianina tetrametil sustituidas con 3,3,3',3'-N,N'-isopropilo, respectivamente. Cy3 es particularmente preferente. Cuando la indocarbocianina está sustituida con N-oxialquilo, puede unirse oportunamente al 5' terminal del oligodesoxinucleótido como un fosfodiéster con un fosfato 5' terminal. La química del engarce de colorante entre el colorante y el oligodesoxinucleótido no es crítica y se elige por conveniencia sintética. Cuando la fosforamidita Cy3 disponible en el mercado se usa como se indica, la modificación 5' resultante consiste en un sustituyente bloqueante y un engarce juntos que son una N-hidroxipropil, N'-fosfatidilpropil 3,3,3',3'-tetrametil indomonocarbocianina.

30 En un ejemplo preferente, el colorante de indocarbocianina está tetrasustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitaciones 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 también puede tener un sustituyente de bloqueo 3'. De nuevo, la química del sustituyente de bloqueo 3' no es crítica.

35 Las mutaciones descritas en el presente documento también podrían obtenerse mediante mutagénesis (aleatoria, somática o dirigida) y cualquier otra tecnología de edición o recombinación de ADN que incluye, pero sin limitación, dirección de genes usando recombinación homóloga específica de sitio por nucleasas de dedo de cinc.

Entrega de oligonucleobases de reparación de genes en células de planta

40 Se puede usar cualquier procedimiento comúnmente conocido usado para transformar una célula de planta para administrar las oligonucleobases de reparación de genes. Los procedimientos ilustrativos se describen a continuación.

Microvehículos y microfibras

45 El uso de microvehículos metálicos (microesferas) para introducir fragmentos grandes de ADN en células de plantas que tienen paredes celulares de celulosa mediante penetración de proyectiles es bien conocido por los expertos en la técnica relevante (en los sucesivos la entrega biolística). Las Patentes de los EE.UU. n.ºs 4.945.050; 5.100.792 y 5.204.253 describen técnicas generales para seleccionar microvehículos y dispositivos para proyectarlos.

50 Las condiciones específicas para usar microvehículos en los procedimientos desvelados en el presente documento se describen en la Publicación Internacional WO 99/07865. En una técnica ilustrativa, microvehículos en hielo frío (60 mg/ml), oligonucleótidos dúplex mixtos (60 mg/ml), CaCl₂ 2,5 M y espermidina 0,1 M se añaden en ese orden; la mezcla se agita suavemente, por ejemplo, agitando con formación de vórtice, durante 10 minutos y luego se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual los microvehículos se diluyen en 5 volúmenes de etanol, se centrifuga y se resuspenden en etanol al 100 %. Pueden obtenerse buenos resultados con una concentración en la solución de adherencia de 8-10 µg/µl de microvehículos, 14-17 µg/ml de oligonucleótido mixto dúplex, CaCl₂ 1,1-1,4 M y espermidina 18-22 mM. Los resultados óptimos se observaron en las condiciones de 8 µg/µl de microvehículos, 55 16,5 µg/ml de oligonucleótido mixto dúplex, CaCl₂ 1,3 M y espermidina 21 mM.

Las oligonucleobases reparadoras de genes también se pueden introducir en células de plantas para la práctica de la presente divulgación usando microfibras para penetrar en la pared celular y la membrana celular. La Patente de

los EE.UU n.º 5.302.523 de Coffee y col., describe el uso de fibras de carburo de silicio de 30 x 0,5 µm y 10 x 0,3 µm para facilitar la transformación de cultivos de maíz en suspensión de Black Mexican Sweet. Cualquier técnica mecánica que pueda usarse para introducir ADN para la transformación de una célula de planta usando microfibras se puede usar para entregar oligonucleobases de reparación de genes para la transmutación.

- 5 Una técnica ilustrativa para la entrega de microfibras de una oligonucleobase de reparación de genes es la siguiente: Se suspenden microfibras estériles (2 µg) en 150 µl de medio de cultivo de plantas que contiene aproximadamente 10 µg de un oligonucleótido dúplex mixto. Se deja sedimentar un cultivo en suspensión y volúmenes iguales de células compactadas y la suspensión de fibra/nucleótido estéril se agitan con formación de vértice durante 10 minutos y se colocan en placas. Los medios selectivos se aplican inmediatamente o con un retraso de hasta 10 aproximadamente 120 h, según sea adecuado para el rasgo particular.

Electroporación de protoplastos

- 15 En un ejemplo alternativo, las oligonucleobases de reparación de genes se pueden entregar a la célula de planta por electroporación de un protoplasto procedente de una parte de la planta. Los protoplastos se forman por tratamiento enzimático de una parte de la planta, particularmente una hoja, de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Gallois y col., 1996, en *Methods in Molecular Biology* 55: 89-107, Humana Press, Totowa, NJ.; Kipp y col., 1999, en *Methods in Molecular Biology* 133: 213-221, Humana Press, Totowa, NJ. Los protoplastos no necesitan ser cultivados en medios de crecimiento antes de la electroporación. Las condiciones ilustrativas para la electroporación son 3 x 10⁵ protoplastos en un volumen total de 0,3 ml con una concentración de oligonucleobase de reparación de genes de entre 0,6-4 µg/ml.

Captación de ADN mediada por PEG por protoplastos

20 En un ejemplo alternativo, los ácidos nucleicos son captados por protoplastos de plantas en presencia del polietilenglicol agente modificador de la membrana, de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Gharti-Chhetri y col., 1992; Datta y col., 1992).

Microinyección

- 25 En un ejemplo alternativo, las oligonucleobases reparadoras de genes pueden entregarse inyectándolas con un microcapilar en células de plantas o en protoplastos (véase, p. ej., Miki y col., 1989; Schnorf y col., 1991).

Transgénicos

- 30 En cualquiera de los diversos aspectos y ejemplos de las composiciones y procedimientos desvelados en el presente documento, pueden realizarse mutaciones en genes y proteínas usando, por ejemplo, tecnología transgénica. En algunos ejemplos, las composiciones y procedimientos incluyen una planta o célula de planta que tiene una construcción de ácido nucleico transformada que incluye un promotor unido de forma operacional a un nucleótido de PPX desvelado en el presente documento. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden incluir la introducción de una construcción de ácido nucleico de PPX desvelada en el presente documento en al menos una célula de planta y la regeneración de una planta transformada a partir de la misma. La construcción de 35 ácido nucleico comprende al menos un nucleótido que codifica una proteína PPX resistente a herbicida como se desvela en el presente documento, particularmente las secuencias de nucleótidos de las expuestas en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10 y 12, y fragmentos y variantes de los mismos. Los procedimientos implican además el uso de un promotor que es capaz de conducir la expresión génica en una célula de planta. En un ejemplo, dicho promotor es un promotor constitutivo o un promotor preferente de tejido. Una planta producida por estos procedimientos puede tener 40 una actividad PPX incrementada, y/o particularmente actividad PPX tolerante a herbicidas, cuando se compara con una planta no transformada. Por lo tanto, los procedimientos encuentran uso para potenciar o aumentar la resistencia de una planta a al menos un herbicida que aumenta la actividad de la enzima PPX, particularmente en presencia de un herbicida inhibidor de PPX.

- 45 Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, los procedimientos para producir una planta resistente a herbicidas pueden incluir transformar una célula de planta con una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos unida de forma operacional a un promotor que conduce la expresión en una célula de planta y regenerar una planta transformada de dicha célula de planta transformada. La secuencia de nucleótidos se selecciona de entre aquellas 50 secuencias de nucleótidos que codifican la PPX resistente a herbicidas desvelada en el presente documento, particularmente las secuencias de nucleótidos expuestas en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10 y 12, y fragmentos y variantes de los mismos. Una planta resistente a herbicidas producida por este procedimiento comprende una resistencia potenciada, en comparación con una planta no transformada, a al menos un herbicida, particularmente un herbicida que interfiere con la actividad de la enzima PPX tal como, por ejemplo, un herbicida inhibidor de PPX.

- 55 Las moléculas de ácido nucleico desveladas se pueden usar en construcciones de ácido nucleico para la transformación de plantas, por ejemplo, plantas de cultivo, tales como *Solanum tuberosum*. En un ejemplo, dichas construcciones de ácido nucleico que contienen las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación se pueden usar para producir plantas transgénicas para proporcionar resistencia a herbicidas, tales como herbicidas

que se sabe que inhiben la actividad de PPX, tales como herbicidas inhibidores de PPX. Las construcciones de ácidos nucleicos se pueden usar en casetes de expresión, vectores de expresión, vectores de transformación, plásmidos y similares. Las plantas transgénicas obtenidas después de la transformación con dichas construcciones demuestran resistencia incrementada a herbicidas inhibidores de PPX tales como, por ejemplo, herbicidas de flumioxazina y sulfentrazona.

Construcciones

Las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento (p. ej., genes de PPX mutados) pueden usarse en la producción de construcciones de ácido nucleico recombinante. En un ejemplo, las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación se pueden usar en la preparación de construcciones de ácido nucleico, por ejemplo, casetes de expresión para la expresión en la planta de interés.

Los casetes de expresión pueden incluir secuencias reguladoras unidas de forma operacional a las secuencias de ácido nucleico de PPX desveladas en el presente documento. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional para ser cotransformado en el organismo. Como alternativa, el(los) gen(es) adicional(es) pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

Las construcciones de ácido nucleico pueden proporcionarse con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico PPX para estar bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. Las construcciones de ácido nucleico pueden contener adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican genes marcadores seleccionables.

Cualquier promotor puede usarse en la producción de construcciones de ácidos nucleicos. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, al huésped de la planta y/o a las secuencias de ácido nucleico de PPX desveladas en el presente documento. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o, como alternativa, una secuencia sintética. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" para el huésped de la planta, se pretende que el promotor no se encuentre en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" a las secuencias de ácido nucleico de PPX desveladas en el presente documento, se pretende que el promotor no sea el promotor de origen natural o nativo para las secuencias de ácido nucleico PPX unidas de forma operacional como se desvela en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un gen quimérico comprende una secuencia de codificación unida de forma operacional a una región de iniciación de la transcripción que es heteróloga a la secuencia de codificación.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, las secuencias de ácido nucleico de PPX desveladas en el presente documento pueden expresarse usando promotores heterólogos, las secuencias promotoras nativas pueden usarse en la preparación de las construcciones. Dichas construcciones cambiarían los niveles de expresión de la proteína PPX en la planta o célula de la planta. Por lo tanto, el fenotipo de la planta o célula de planta está alterado.

Se puede usar cualquier promotor en la preparación de construcciones para controlar la expresión de la secuencia de codificación de PPX, tales como promotores que proporcionan promotores constitutivos, preferentes de tejido, inducibles u otros promotores para la expresión en plantas. Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor central del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos desvelados en el documento WO 99/43 838 y la Patente de los EE.UU. n.º 6.072.050; the core CaMW 35S promoter (Odell y col., (1985) Nature 313: 810-812); rice actin (McElroy y col., (1990) Plant Cell 2: 163-171); ubiquitin (Christensen y col., (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619-632 y Christensen y col., (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689); pEMU (Last y col., (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581-588); MAS (Velten y col., (1984) EMBO J. 3: 2723-2730); Un promotor (Patente de los EE.UU n.º 5.659.026) y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. n.ºs 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

Los promotores preferentes de tejido pueden utilizarse para dirigir la expresión de PPX dentro de un tejido de planta particular. Dichos promotores preferentes de tejido incluyen, pero sin limitación, promotores preferentes de hojas, promotores preferentes de raíz, promotores preferentes de semilla y promotores preferentes de tallos. Los promotores preferentes de tejido incluyen Yamamoto y col., (1997) Plant J. 12 (2): 255-265; Kawamata y col., (1997) Plant Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen y col., (1997) Mol. Gen Genet. 254(3):337-343; Russell y col., (1997) Transgenic Res. 6(2):157-168; Rinehart y col., (1996) Plant Physiol. 112 (3): 1331-1341; Van Camp y col., (1996) Plant Physiol. 112 (2): 525-535; Canevascini y col., (1996) Plant Physiol. 112(2): 513-524; Yamamoto y col., (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181-196; Orozco y col., (1993) Plant Mol Biol. 23(6):1129-1138; Matsuoka y col., (1993) Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (20): 9586- 9590; y Guevara-García y col., (1993) Plant J. 4 (3): 495-505.

Las construcciones de ácido nucleico también pueden incluir regiones de terminación de la transcripción. Cuando se usan regiones de terminación de la transcripción, se puede usar cualquier región de terminación en la preparación de las construcciones de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la región de terminación puede ser nativa de la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa de la secuencia de interés PPX unida de forma operacional, puede ser nativa del huésped de la planta o puede obtenerse de otra fuente (es decir, heteróloga o extraña al promotor, la

molécula de ácido nucleico PPX de interés, el huésped de planta, o cualquier combinación de los mismos). Ejemplos de regiones de terminación que están disponibles para su uso en las construcciones de la presente divulgación incluyen aquellas del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase también Guerineau y col., (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon y col., (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogens y col., (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe y col., (1990) Gene 91: 151-158; Ballas y col., (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; y Joshi y col., (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, los ácidos nucleicos pueden optimizarse para una expresión incrementada en la planta transformada. Es decir, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas PPX mutantes se pueden sintetizar usando codones preferentes de plantas para una expresión mejorada. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92: 1-11 para un análisis sobre el uso de codones preferentes del huésped. Los procedimientos están disponibles en la técnica para sintetizar genes preferentes de plantas. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. n.ºs 5.380.831, y 5.436.391, y Murray y col., (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477-498.

Además, pueden realizarse otras modificaciones de secuencia a las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. Por ejemplo, se conocen modificaciones de secuencias adicionales para potenciar la expresión génica en un huésped celular. Estos incluyen la eliminación de secuencias que codifican señales espurias de poliadenilación, señales del sitio de corte y empalme exón/intrón, repeticiones similares a transposones y otras secuencias bien caracterizadas que pueden ser nocivas para la expresión génica. El contenido de GC de la secuencia también puede ajustarse a niveles medios para un huésped celular objetivo, calculado por referencia a genes conocidos expresados en la célula huésped. Además, la secuencia puede modificarse para evitar las estructuras predichas de ARNm secundario en horquilla.

También pueden usarse otras secuencias de ácido nucleico en la preparación de las construcciones de la presente divulgación, por ejemplo para potenciar la expresión de la secuencia de codificación de PPX. Dichas secuencias de ácido nucleico incluyen los intrones del Adh1 del maíz, el gen del intron1 (Callis y col., (1987) Genes and Development 1: 1183-1200), y las secuencias líder, (secuencia W) del virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del moteado clorótico del maíz y virus del mosaico de la alfalfa (Gallie y col., (1987) Nucleic Acid Res. 15: 8693-8711, y Skuzeski y col., (1990) Plant Mol. Biol. 15: 65-79, 1990). Se ha demostrado que el primer intrón del locus reducido de maíz 1 aumenta la expresión de genes en construcciones génicas químéricas. Las Patentes de los EE.UU. n.ºs 5.424.412 y 5.593.874 desvelan el uso de intrones específicos en construcciones de expresión génica, y Gallie y col., ((1994) Plant Physiol. 106: 929-939) también han demostrado que los intrones son útiles para regular la expresión génica sobre una base específica de tejido. Para potenciar aún más u optimizar la expresión del gen PPX, los vectores de expresión de plantas desvelados en el presente documento también pueden contener secuencias de ADN que contienen regiones de unión a la matriz (MAR). Las células de plantas transformadas con dichos sistemas de expresión modificados, entonces, pueden mostrar sobreexpresión o expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos de la divulgación.

Las construcciones de expresión desveladas en el presente documento también pueden incluir secuencias de ácido nucleico capaces de dirigir la expresión de la secuencia PPX al cloroplasto. Dichas secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias dirigidas a cloroplastos que codifican un péptido de tránsito de cloroplastos para dirigir el producto génico de interés a los cloroplastos de células de plantas. Dichos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Con respecto a las secuencias dirigidas a cloroplastos, "unidades de forma operacional" significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito (es decir, la secuencia dirigida a cloroplastos) está unida a las moléculas de ácido nucleico PPX desveladas en el presente documento de manera que las dos secuencias son contiguas y en el mismo marco de lectura. Véase, por ejemplo, Von Heijne y col., (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clark y col., (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544-17550; Della-Cioppa y col., (1987) Plant Physiol. 84: 965-968; Romer y col., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414-1421; y Shah y col., (1986) Science 233: 478-481. Si bien las proteínas PPX desveladas en el presente documento pueden incluir un péptido de tránsito de cloroplastos nativo, cualquier péptido de tránsito de cloroplastos conocido en la técnica puede fusionarse a la secuencia de aminoácidos de una proteína PPX madura uniendo de forma operacional una secuencia dirigida a cloroplastos al extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína PPX madura.

Las secuencias dirigidas a cloroplasto son conocidas en la técnica e incluyen la subunidad pequeña de cloroplasto de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco) (de Castro Silva Filho y col., (1996) Plant Mol. Biol. 30: 769-780; Schnell y col., (1991) J. Biol. Chem. 266 (5): 3335-3342); 5-(enolpiruvil)shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Archer y col., (1990) J. Bioenerg. Biomemb. 22 (6): 789-810); triptófano sintasa (Zhao y col., (1995) J. Biol. Chem. 270 (11): 6081-6087); plastocianina (Lawrence y col., (1997) J. Biol. Chem. 272 (33): 20357-20363); corismato sintasa (Schmidt y col., (1993) J. Biol. Chem. 268 (36): 27447-27457); y la ligera recolección de la proteína de unión a la clorofila a/b (LHBP) (Lamppa y col., (1988) J. Biol. Chem. 263:14996-14999). Véase también Von Heijne y col., (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clark y col., (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544-17550; Della-Cioppa y col., (1987) Plant Physiol. 84: 965-968; Romer y col., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414-1421; y Shah y col., (1986) Science 233: 478-481.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el

presente documento, las construcciones de ácido nucleico pueden prepararse para dirigir la expresión de la secuencia de codificación PPX mutante del cloroplasto de la célula de la planta. Los procedimientos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab y col., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 8526-8530; Svab y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 913-917; Svab y Maliga (1993) EMBO j. 12: 601-606. El procedimiento se basa en la entrega del ADN de la pistola de partículas que contiene un marcador seleccionable y la dirección del ADN al genoma del plastidio mediante recombinación homóloga. Además, la transformación de plastidios se puede llevar a cabo mediante la transactivación de un transgén silencioso transportado por plastidios mediante la expresión preferente de tejidos de una ARN polimerasa dirigida a plastidios y codificada nuclearmente. Dicho sistema ha sido indicado en McBride y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.91: 7301-7305.

Los ácidos nucleicos de interés para ser dirigidos al cloroplasto se pueden optimizar para la expresión en el cloroplasto para explicar las diferencias en el uso del codón entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse usando codones preferentes de cloroplastos. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.380.831.

Las construcciones de ácidos nucleicos se pueden usar para transformar células de plantas y regenerar plantas transgénicas que comprenden las secuencias de codificación de PPX mutantes. Numerosos vectores de transformación de plantas y procedimientos para transformar plantas están disponibles. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 6.753.458, An, G. y col., (1986) Plant Physiol., 81: 301-305; Fry, J. y col., (1987) Plant Cell Rep. 6: 321-325; Block, M. (1988) Theor. Appl. Genet. 76: 767-774; Hinchey y col., (1990) Stadler. Genet. Symp.203212.203-212; Cousins y col., (1991) Aust. J. Plant Physiol. 18: 481-494; Chee, PP y Slightom, JL (1992) Gene.118: 255-260; Christou y col., (1992) Trends. Biotechnol. 10: 239-246; D'Halluin y col., (1992) Bio/Technol. 10: 309-314; Dhir y col., (1992) Plant Physiol. 99: 81-88; Casas y col., (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 90: 11212-11216; Christou, P. (1993) *n Vitro* Cell. Dev. Biol.-Planta; 29P: 1 19-124; Davies, y col., (1993) Plant Cell Rep. 12: 180-183; Dong, JA y Mc Hughen, A. (1993) Plant Sci. 91: 139-148; Franklin, CI y Trieu, TN (1993) Plant. Physiol. 102:167; Golovkin y col., (1993) Plant Sci. 90: 41-52; Guo Chin Sci. Bull. 38: 2072-2078; Asano, y col., (1994) Plant Cell Rep. 13; Ayeres NM y Park, WD (1994) Crit. Rev. Plant. Sci. 13: 219-239; Barcelo y col., (1994) Plant. J. 5: 583-592; Becker, y col., (1994) Plant. J. 5: 299-307; Borkowska y col., (1994) Acta. Physiol Plant. 16: 225-230; Christou, P. (1994) Agro. Food. Ind. Hi Tech. 5: 17-27; Eapen y col., (1994) Plant Cell Rep. 13: 582-586; Hartman y col., (1994) BioTechnology 12: 919923; Ritala y col., (1994) Plant. Mol. Biol. 24: 317-325; y Wan, YC y Lemaux, PG (1994) Plant Physiol. 104:3748. Las construcciones también se pueden transformar en células de plantas usando recombinación homóloga.

Las construcciones desveladas que comprenden las secuencias de ácido nucleico de PPX desveladas en el presente documento pueden usarse en diversos procedimientos para producir células huésped transgénicas, tales como bacterias, levaduras, y para transformar células de plantas y en algunos casos regenerar plantas transgénicas. Por ejemplo, procedimientos para producir una planta de cultivo transgénica que contiene las proteínas mutantes PPX desveladas en el presente documento, en las que la expresión del (os) ácido(s) nucleicos en la planta da como resultado tolerancia a herbicidas en comparación con plantas de tipo silvestre o plantas de tipo mutante PPX conocidas que comprenden: (a) introducir en una célula de planta un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica una proteína PPX mutante, y (b) generar a partir de la célula de planta una planta transgénica que es tolerante a herbicidas.

Mutaciones PPX

Las composiciones y procedimientos se pueden referir, al menos en parte, a mutaciones en un gen de PPX, por ejemplo, mutaciones que hacen que una planta sea resistente o tolerante a un herbicida de la familia de herbicidas inhibidores de PPX. Las composiciones y procedimientos también en determinados ejemplos se refieren al uso de una oligonucleobase de reparación de genes para fabricar una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episómicas de una planta en el gen que codifica una proteína PPX. La proteína mutada, que en algunos ejemplos puede mantener sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, permitiendo una mayor resistencia o tolerancia de la planta a un herbicida de la familia inhibidora de PPX y, por lo tanto, en algunos ejemplos permitiendo un crecimiento sustancialmente normal o el desarrollo de la planta, sus órganos, tejidos, o células en comparación con la planta de tipo silvestre independientemente de la presencia o ausencia del herbicida. Las composiciones y procedimientos también se refieren a una célula de planta no transgénica o transgénica en la que se ha mutado un gen PPX, una planta no transgénica o transgénica regenerada a partir de la misma, así como una planta resultante de un cruce usando una planta regenerada transgénica o no transgénica a una planta que tiene una mutación en un gen PPX diferente, por ejemplo. Estas mutaciones también pueden aplicarse a la tolerancia objetivo a estos inhibidores en plantas que incluyen plantas de cultivo, algas, bacterias, hongos y sistemas de mamíferos.

Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, al menos una mutación de una proteína PPX mutada puede estar en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 52, 85, 105, 111, 130, 139, 143, 144, 145, 147, 165, 167, 170, 180, 185, 192, 193, 199, 206, 212, 219, 220, 221, 226, 228, 229, 230, 237, 244, 256, 257, 270, 271, 272, 305, 311,316, 318, 332, 343, 354, 357, 359, 360, 366, 393, 403, 424, 426, 430, 438, 440, 444, 455,

5 457, 470, 478, 483, 484, 485, 487, 490, 503, 508 y 525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 58, 64, 74, 84, 93, 97, 98, 101, 119, 121, 124, 139, 150 151, 157, 164, 170, 177, 187, 188, 195, 214, 215, 229, 230, 271, 274, 278, 283, 292, 296, 307, 324, 330, 396, 404, 406, 410, 421, 423,434, 447, 448, 449, 451, 454, 465, 470 y 50 de SEQ ID NO: 9.

10 En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 52, 85, 105, 111, 130, 139, 143, 144, 145, 147, 165, 167, 170, 180, 185, 192, 193, 199, 206, 212, 219, 220, 221, 226, 228, 229, 230, 237, 244, 256, 257, 270, 271, 272, 305, 311, 316, 318, 332, 343, 354, 357, 359, 360, 366, 393, 403, 424, 426, 430, 438, 440, 444, 455, 457, 470, 478, 483, 484, 485, 487, 490, 503, 508 y 525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 58, 64, 74, 84, 93, 97, 98, 101, 119, 121, 124, 139, 150 151, 157, 164, 170, 177, 187, 188, 195, 214, 215, 229, 230, 271, 274, 278, 283, 292, 296, 307, 324, 330, 396, 404, 406, 410, 421, 423,434, 447, 448, 449, 451, 454, 465, 470 y 500 de SEQ ID NO: 9. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 52, 85,105, 111, 130, 139, 143, 144, 145, 147, 165, 167, 170, 180, 185, 192, 193, 199, 206, 212, 219, 220, 221, 226, 228, 229, 230, 237, 244, 256, 257, 270, 271, 272, 305, 311, 316, 318, 332, 343, 354, 357, 359, 360, 366, 393, 403, 424, 426, 430, 438, 440, 444, 455, 457, 470, 478, 483, 484, 485, 487, 490, 503, 508 y 525 de SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 58, 64, 74, 84, 93, 97, 98, 101, 119, 121, 124, 139, 150 151, 157, 164, 170, 177, 187, 188, 195, 214, 215, 229, 230, 271, 274, 278, 283, 292, 296, 307, 324, 330, 396, 404, 406, 410, 421, 423,434, 447, 448, 449, 451, 454, 465, 470 y 500 de SEQ ID NO: 9.

25 Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, al menos una mutación de una proteína PPX mutada puede estar en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, N105, E111, G130, D139, P143, R144, F145, L147, F165, L167, 1170, A180, P185, E192, S193, R199, V206, E212, Y219, A220, G221, L226, M228, K229, A230, K237, S244, R256, R257, K270, P271, Q272, S305, E311, T316, T318, S332, S343, A354, L357, K359, L360, A366, L393, L403, L424, Y426, S430, K438, E440, V444, L455, K457, V470, F478, F483, D484, 1485, D487, K490, L503, V508 y 1525 de SEQ ID NO: 1. Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, al menos una mutación de una proteína PPX mutada puede estar en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en D58, E64, G74, G84, L93, K97, K98, A101, S119, F121, T124, N139, E150, S151, Q157, V164, D170, C177, H187, L188, N195, P214, I215, K229, K230, C271, D274, F283, A292, S296, C307, N324, D330, S396, A404, R406, K410, L421, A423, C434, D447, S448, V449, D451, D454, Y465, K470 y T500 de SEQ ID NO: 9.

40 En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye dos o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, R144, F145, A180, P185, A220, L226, M228, S244, Q272, S305, S332, L357, K359, L393, L403, L424, Y426, F478 y 1525 de SEQ ID NO: 1.

En algunos ejemplos, una proteína PPX mutada incluye tres o más mutaciones, cuya al menos una mutación está en la posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en G52, N85, R144, F145, A180, P185, A220, L226, M228, S244, Q272, S305, S332, L357, K359, L393, L403, L424, Y426, F478 y 1525 de SEQ ID NO: 1.

45 Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, la proteína PPX mutada puede incluir una o más mutaciones seleccionadas de entre las mutaciones que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Mutaciones de aminoácidos en la proteína PPX de *Arabidopsis thaliana*.

G52K	F145Y	A220I	M228L	S332C	L393S	Y426C	Y426R
N85D	A180T	A220L	S244G	L357I	L393V	Y426F	Y426T
R144C	P185II	A220T	S244T	K359R	L403R	Y426H	Y426V
R144H	P185R	A220V	Q272F	K359T	L403S	Y426I	F478S
F145L	A220C	L226M	S305L	L393M	L424S	Y426L	I525T

(continuación)

E111V	L147V	S193T	A230F	P271R	L360K	L455V	I485E
G130N	F165N	R199L	R256H	E311R	A366E	K457V	K490N
D139H	P185Y	V206F	R256S	T318G	K438S	V470S	L503F
P143R	E192D	Y219S	K270E	S332L	E440K	V470Y	V508T
R144L	E192K	K229Q	K270Q	L360D	V444I	D484A	

Tabla 2: Resumen de mutaciones de nucleótidos/codones en el gen PPX plastidial de *Arabidopsis* que conducen a cambios de aminoácidos que confieren tolerancia a los inhibidores de PPX. Los números de posición se basan en la numeración del número de gen PPX plastidial de *Arabidopsis* At4g01690 (SEQ ID NO: 1).

5

AA mtn	NA mtn
G52K	GGG → AAA
N85D	AAT → GAT
R144C	AGG → TGC AGG → TGT
R144H	AGG → CAC AGG → CAT
F145L	TTT → CTT
F145Y	TTT → TAT
A180T	GCA → ACA
P185H	CCG → CAC CCG → CAT
P185R	CCG → CGG
A220C	GCT → TGT
A220I	GCT → ATT
A220L	GCT → CTT
A220T	GCT → ACT
A220V	GCT → GTT
L226M	GTG → ATG
M228L	ATG → CTG
S244G	AGC → GGC
S244T	AGC → ACC
Q272F	CAG → TTC

(continuación)

AA mtn	NA mtn
	CAG → TTT
S305L	TCA → TTA
S332C	TCT → TGT
L357I	CTC → ATC
K359R	AAA → AGA
K359T	AAA → ACT
L393M	TTG → ATG
L393S	TTG → TCG
L393V	TTG → GTG
L403R	TTA → CGA
L403S	TTA → TCA
L424S	TTG → TCG
Y426C	TAC → TGC
Y426F	TAC → TTC
Y426H	TAC → CAC
Y426I	TAC → ATC
Y426L	TAC → TTA TAC → CTC
Y426R	TAC → CGC
Y426T	TAC → ACC
Y426V	TAC → GTC
F478S	TTT → TCT
S525T	ATT → ACT
* "AA mtn" se refiere a la mutación de aminoácidos; "NA mtn" se refiere a la mutación de ácido nucleico	

Tabla 3A: Resumen de mutaciones de nucleótidos/codones en el gen PPX plastidial de patata que conducen a cambios de aminoácidos que confieren tolerancia a los inhibidores de PPX. Los números de posición se basan en la numeración del número de gen PPX plastidial de *Arabidopsis* At4g01690 (SEQ ID NO: 1).

AA mtn	NA mtn
N52K	AAT → AAA
N85D	AAT → GAT

ES 2 688 285 T3

(continuación)

AA mtn	NA mtn
R144C	CGC → TGC
R144H	CGC → CAC
F145L	TTT → CTT
F145Y	TTT → TAT
A180T	GCC → ACC
P185H	CCT → CAT
P185R	CCT → CGT
A220C	GCC → TGC
A220I	GCC → ATC
A220L	GCC → CTC
A220T	GCC → ACC
A220V	GCC → GTC
L226M	TTG → ATG
M228L	ATG → CTG
S244G	AGC → GGC
S244T	AGC → ACC
K272F	AAA → TTT AAA → TTC
S305L	TCT → CTT
S332C	AGT → TGT
L357I	CTT → ATT
S359R	AGT → AGA
S359T	AGT → ACT
L393M	TTG → ATG
L393S	TTG → TCG
L393V	TTG → GTG
L403R	CTA → CGA
L403S	CTA → TCA
L424S	TTG → TCG
Y426C	TAC → TGC

(continuación)

AA mtn	NA mtn
Y426F	TAC → TTC
Y426H	TAC → CAC
Y426I	TAC → ATC
Y426L	TAC → TTA TAC → CTC
Y426R	TAC → CGC
Y426T	TAC → ACC
Y426V	TAC → GTC
F478S	TTT → TCT
S525T	TCT → ACT
* "AA mtn" se refiere a la mutación de aminoácidos; "NA mtn" se refiere a la mutación de ácido nucleico	

Tabla 3B: Resumen de mutaciones de nucleótidos/codones en el gen PPX mitocondrial de patata que conducen a cambios de aminoácidos que confieren tolerancia a los inhibidores de PPX. Los números de posición se basan en la numeración del número de gen PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* AJ225108 (SEQ ID NO: 9).

AA mtn	NA mtn
D58N	GAT → AAT
E64V	GAA → GTA
G74C	GGT → TGT
G84N	GGA → GAT
R98C	CGC → CAC
R98H	CGC → TGC
R98L	CGC → CTC
N139Y	CCT → TAT
E150D	GAA → GAT
E150K	GAA → AAA
T500S	ACC → AGC
S151T	AGT → ACT
Q157L	CAG → CTG
V164F	GTT → TTT
D170E	GAT → GAA
H187Q	AAG → CAG

(continuación)

AA mtn	NA mtn
L188F	CTT -> TTT
N195K	AAT -> AAA
P214H	CCT -> CAT
P214S	CCT -> TCT
K229E	AAG -> GAG
K229Q	AAG -> CAG
K230R	AAG -> AGG
F283G	GAC -> GGC
A292G	GCA -> GGA
S296L	TCA -> TTA
C307S	TGT -> AGT
N324D	AAT -> GAT
N324K	AAT -> AAA
D330E	GAT -> GAA
A404S	GCC -> TCC
R406K	AGG -> AAG
K410I	AAA -> ATA
A423V	GCT -> GTT
C434S	TGC -> AGC
C434Y	TGC -> TAC
S448A	TCA -> GCA
D451G	GAT -> GGT
D454N	GAC -> AAC
Y465F	TAT -> TTT
K470T	AAG -> ACG
* "AA mtn" se refiere a la mutación de aminoácidos; "NA mtn" se refiere a la mutación de ácido nucleico	

5 En algunos ejemplos, conjuntamente con cualquiera de los aspectos, ejemplos, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, un gen PPX mutado puede incluir una combinación de mutaciones, por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis o más mutaciones en un gen PPX. En determinados ejemplos, la combinación de mutaciones se selecciona de entre las combinaciones de mutaciones que se muestran en las Tablas 4a y 4b.

Tabla 4A: Combinaciones de mutaciones de aminoácidos (cada fila de cada una de las tres columnas agrupadas representa una combinación de mutaciones). Los números de posición se basan en la numeración del número de gen PPX plastidial de Arabidopsis At4g01690 (SEQ ID NO: 1)

R144C			A220T			L226M		L424S		F145L		L424S	
R144H	S332C		L226M	Y426F		A220T	Y426H		A220T	Y426H			
R144C	Q272F		A220T	Y426F		R144C	Y426H		F145Y	L393V			
R144C	K272F		R144C	Y426F		N85D	Y426H		S244T	Y426F			
G52K	R144H	S244T	N85D	Y426H		R144C	Y426H		F145Y	L424S			
N52K	R144H	S244T	R144C	Y426H		S244T	Y426H		A220T	L403R			
N85D	A220T		L226M	Y426H		S244G	Y426H		L226M	Y426F			
R144H	S244T		A180T	Y426H		A180T	Y426H		N85D	Y426H			
R144C	L226M		L226M	Y426H		L226M	Y426H		L226M	L424S			
N85D	L226M		F145L	Y426H		F145L	Y426H		F145Y	L403R			
N85D	F145Y		A220T	Y426H		A220T	Y426H		S244G	L393V			
R144C	M228L		N85D	Y426H		N85D	Y426H		A180T	Y426H			
N85D	A180T		F145L	L393V		F145L	L393V		R144C	Y426H			
N85D	R144C		L226M	L424S		L226M	L424S		N85D	S525T			
N85D	Q272F		L226M	Y426F		L226M	Y426F		L226M	S525T			
N85D	K272F		A220T	L393V		A220T	L393V		F145Y	S525T			
N85D	M228L		A220T	Y426F		R144C	Y426F		F145L	S525T			
A180T	Y426F		R144C	Y426F		N85D	I525T		S244G	S525T			
F145L	Y426H		L226M	I525T		L226M	I525T		A180T	S525T			
S244G	Y426F		F145Y	I525T		F145L	I525T		R144C	S525T			
F145L	L403R		R144C	I525T		R144C	I525T						
F145Y	L424S		R144C	Y426H		R144C	Y426H						
R144C	L424S		A180T	Y426H		A180T	Y426H						
L226M	Y426H		A220T	Y426H		A220T	Y426H						
A220T	L424S		L226M	Y426H		L226M	Y426H						
F145Y	Y426F		S244T	L393V		S244T	L393V						
R144C	L393V		F145Y	Y426H		F145Y	Y426H						
S244G	I525T												
A180T	I525T												
S244G	L393V												
L226M	L403R												

De acuerdo con una realización de acuerdo con la presente invención, una proteína PPX mutada incluye una arginina por cisteína en una posición correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 y una alanina por treonina en una posición correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con otra realización de acuerdo con la presente invención, una proteína PPX mutada incluye una arginina por histidina en una posición correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 y una alanina por treonina en una posición correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con otra realización de acuerdo con la presente invención, una proteína PPX mutada incluye una arginina por leucina en una posición correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 y una alanina por treonina en una posición correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 4B: Combinaciones de mutaciones de aminoácidos (cada fila de cada una de las dos columnas agrupadas representa una combinación de mutaciones). Los números de posición se basan en la numeración del número de gen PPX mitocondrial de *Solanum tuberosum* AJ225108 (SEQ ID NO: 9).

G74C	R98C			
L93H	V164A			
R98L	P214H			
R98L	T124I	L188F	K229Q	
R98L	T124I	P214H	K229Q	
R98L	T124I	K229Q		
S119N	N139Y			
F121L	E150D			
S151T	K229E	K230R		
Q157L	H187Q			
C271R	D274G			
C307S	A423V			
S396L	K410I			
C434S	T500S			
D447G	A292G			

(continuación)

S448A	N324D			
Y465F	K470T			
R98L	P214H	A243V		
R98L	T124I	L188F	K229Q	A243V
R98L	T124I	P214H	K229Q	A243V
R98L	T124I	K229Q	A423V	
R98L	P214H	C307S		
R98L	T124I	L188F	K229Q	C307S
R98L	T124I	P214H	K229Q	C307S
R98L	T124I	K229Q	C307S	
R98C	P214H			
R98C	T124I	L188F	K229Q	
R98C	T124I	P214H	K229Q	
R98C	T124I	K229Q		
R98C	P214H	A423V		
R98C	T124I	L188F	K229Q	A423V
R98C	T124I	P214H	K229Q	A423V
R98C	T124I	K229Q	A423V	
R98C	P214H	C307S		
R98C	T124I	L188F	K229Q	C307S
R98C	T124I	P214H	K229Q	C307S
R98C	T124I	K229Q	C307S	
R98H	P214H			
R98H	T124I	L188F	K229Q	
R98H	T124I	P214H	K229Q	
R98H	T124I	K229Q		
R98H	P214H	A423V		
R98H	T124I	L188F	K229Q	A423V
R98H	T124I	P214H	K229Q	A423V
R98H	T124I	K229Q	A423V	
R98H	P214H	C307S		
R98H	T124I	L188F	K229Q	C307S
R98H	T124I	P214H	K229Q	C307S
R98H	T124I	K229Q	C307S	

Parálogos

- 5 Las mutaciones objeto en el gen PPX generalmente se describen en el presente documento usando los genes y proteínas PPX plastidiales de *Solanum tuberosum* (véase, p. ej., las Figuras 8 y 7 respectivamente) con posiciones de aminoácidos referenciadas a posiciones en *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1). Las composiciones y procedimientos también abarcan genes y proteínas PPX mutantes de otras especies (parálogos). Sin embargo, debido a las variaciones en los genes PPX de diferentes especies, el número del resto de aminoácido que se cambia en una especie puede ser diferente en otra especie. No obstante, la posición análoga se identifica fácilmente por un experto en la técnica mediante homología de secuencia. Por ejemplo, la Tabla 6 resume las posiciones homólogas de aminoácidos en diversos parálogos de secuencia de codificación de PPX de planta y la Figura 33 muestra una alineación de secuencia de aminoácidos de parálogos de PPX de diversas plantas. Por lo tanto, las posiciones análogas en estos y otros parálogos se pueden identificar y mutar.

Herbicidas

- 15 Las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen genes PPX y proteínas PPX que confieren resistencia a herbicidas inhibidores de PPX. En algunas realizaciones, los herbicidas inhibidores de PPX incluyen las familias químicas de difeniléteres, fenilpirazoles, N-fenilftalimidias, tiadiazoles, oxadiazoles, triazolinonas, oxazolidinonas, pirimidinonas. Ejemplos de principios activos herbicidas inhibidores de PPX y sus respectivas familias químicas se resumen en la Tabla 5.

20 **Tabla 5:** Ejemplos de herbicidas inhibidores de PPX.

Familia química	Principio activo herbicida
Difeniléteres	acifluorfen-Na
	Bifenox

(continuación)

Familia química	Principio activo herbicida
	Clometoxifeno
	fluoroglicofen-etilo
	Fomesafeno
	Halosafeno
	Lactofeno
	Oxifluorfen
Fenilpirazoles	Fluazolato
	piraflufen-etilo
N-feniltalimidas	cinidon-etilo
	Flumioxazina
	flumiclorac-pentil
Tiadiazoles	flutiacet-metilo
	Tidiazimina
Oxadiazoles	Oxadiazona
	Oxadiargilo
Triazolinonas	Azafenidina
	carfentrazona-etilo
	Sulfentrazona
Oxazolidinedionas	Pentoxazona
Pirimidindionas	Benzfendizona
	Butafenacilo
	Saflufenacilo
Otros	Pirazogilo
	Profluazol

En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es acifluorfen-Na. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es bifenox. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es clometoxifeno. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es fluoroglicofen-etilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es fomesafeno. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es halosafeno. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es lactofeno. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es oxifluorfen. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es fluazolato. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es piraflufen-etilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es cinidon-etilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es flumioxazina. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es flumiclorac-pentilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es flutiacet-metilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es la tidiazimina. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es oxadiazona. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es oxadiargilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es azafenidina. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es carfentrazona-etilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es sulfentrazona. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es pentoxazona. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es benzfendizona. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es butafenacilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es saflufenacilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es pirazogilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de PPX es profluazol.

También se proporciona una planta o célula de planta transgénica o no transgénica que tiene una o más mutaciones en el gen PPX, por ejemplo, tal como se desvela en el presente documento. En determinadas realizaciones, la planta o célula de planta que tiene una o más mutaciones en un gen PPX tiene una resistencia o tolerancia incrementada a un miembro de herbicidas inhibidores de PPX. En determinadas realizaciones, la planta o célula de planta que tiene una o más mutaciones en un gen PPX puede mostrar un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente. En aspectos y realizaciones particulares proporcionados son plantas transgénicas o no transgénicas que tienen una mutación en un gen PPX, por ejemplo, tal como se desvela en el presente documento, las cuales en determinadas realizaciones tienen una resistencia o tolerancia incrementada a uno o más miembros de las familias químicas de herbicidas inhibidores de PPX, y pueden mostrar un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente, es decir, en presencia de uno o más herbicidas tales como por ejemplo, flumioxazina, sulfentrazona y saflufenacilo, la proteína PPX mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la proteína PPX de tipo silvestre.

Se proporcionan adicionalmente procedimientos para producir una planta que tiene un gen de PPX mutado, por ejemplo, que tiene una o más mutaciones como se describe en el presente documento; preferentemente la planta mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida relevante. En determinadas realizaciones, los procedimientos incluyen introducir en una

célula de planta una oligonucleobase de reparación de genes con una o más mutaciones dirigidas en el gen PPX (por ejemplo, tal como se desvela en el presente documento) e identificar una célula, semilla o planta que tiene un gen de PPX mutado.

Especies de plantas

- 5 Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, realizaciones, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, las plantas como se desvela en el presente documento pueden ser de cualquier especie de planta dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma, incluyendo cualquier especie de planta leñosa que crezca como un árbol o arbusto, cualquier especie herbácea, o cualquier especie que produzca frutas, semillas o vegetales comestibles, o cualquier especie que produzca flores coloridas o aromáticas. Por ejemplo, la planta o célula de
- 10 planta puede seleccionarse de una especie de planta de entre el grupo que consiste en patata, girasol, remolacha azucarera, maíz, algodón, soja, trigo, centeno, avena, arroz, colza, frutas, verduras, tabaco, cebada, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, zanahoria, lechuga, cebolla, soja spp, caña de azúcar, guisante, haba común, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y pastos forrajeros, lino, colza oleaginosa, pepino, campanilla, bálsamo, pimiento, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, petunia,
- 15 tulipán, iris, lirio, y plantas productoras de nueces en la medida en que no se mencionen ya específicamente. La planta o célula de planta también puede ser de una especie seleccionada de la Tabla 6. La planta o célula de planta también puede ser de una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Solanum phureja*, *Oryza sativa*, *Amaranthus tuberculatus*, *Sorghum bicolor*, *Ricinus communis* y *Zea mays*.
- 20 **Tabla 6.** Resumen de posiciones homólogas de aminoácidos en secuencias de aminoácidos de PPX de plantas de diversas especies. Véase también las Figuras 47 y 48 para resúmenes adicionales de posiciones de aminoácidos homólogos.

Especie	n.º de referencia a Genbank	Loc	G	N	R	F	A	P	A	L	M	S	Q	S	S	S	L	K	L	L	L	L	Y	F	I
<i>Arabidopsis thaliana</i> - At4a01690	AX084732	P	52	85	144	145	180	185	220	226	228	244	272	305	332	357	359	393	403	424	426	478	525	525	
<i>Arabidopsis thaliana</i> - At5a14220	NM_121426	M	ND	41	101	102	137	142	182	188	190	206	235	269	298	323	325	358	371	392	394	444	489	D	
<i>Amaranthus tuberculatus</i>	DQ386117	B	ND	ND	128	129	164	169	210	216	218	234	261	295	324	349	351	384	397	418	420	470	515	E	
<i>Solanum tuberosum</i>	AJ225107	P	N	76	105	164	200	205	240	246	248	264	292	325	352	377	379	413	423	444	446	498	545	S	
<i>Solanum tuberosum</i>	ND véase la Figura 27.	M	ND	ND	98	99	134	139	178	184	186	202	231	265	296	321	323	356	369	390	392	442	487	D	
<i>Zea mays</i>	AF218052	P	ND	ND	142	143	178	3	218	224	226	242	270	303	330	355	357	391	401	422	424	476	523	S	
<i>Zea mays</i>	AF273767	M	ND	70	130	131	166	171	215	221	223	239	268	302	336	361	363	396	410	431	433	483	528	D	
<i>Oryza sativa</i> - Os001g0286600	NM_001049312	P	51	ND	143	144	179	184	219	225	227	243	271	304	331	356	358	392	402	423	425	477	524	S	
<i>Oryza sativa</i> - Os04g0490000	ND véase la Figura 17.	M	D	Q	79	139	140	175	180	224	232	248	277	311	345	370	372	405	419	440	442	492	537	D	
<i>Sorghum bicolor</i> - Sb03g011670	XM_002455439	P	ND	ND	143	144	179	184	219	225	227	243	271	304	331	356	358	392	402	423	425	477	524	A	
<i>Sorghum bicolor</i> - Sb06a020950	XM_002446665	M	ND	70	130	131	166	171	215	221	223	239	268	302	336	361	363	396	410	431	433	483	528	D	
<i>Ricinus communis</i> - Rc1343150	XM_002515127	P	N	51	84	143	144	179	184	219	225	227	243	271	304	331	356	358	392	402	423	425	477	A	
<i>Ricinus communis</i> - Rc1678480	XM_002509502	M	ND	ND	99	100	135	140	181	187	189	205	234	268	299	324	326	359	372	393	395	445	490	D	

† G210 eliminada en DQ386118 que conduce a la tolerancia a inhibidores de PPX

P es plastidial; M es mitocondrial; B es ambos

La oligonucleobase de reparación de genes se puede introducir en una célula de planta usando cualquier procedimiento comúnmente usado en la técnica, que incluye, pero sin limitación, microvehículos (entrega biolística), microfibras, captación mediada por polietilenglicol (PEG), electroporación y microinyección.

5 También se proporcionan procedimientos y composiciones relacionadas con el cultivo de células mutadas de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento con el fin de obtener una planta que produce semillas, en los sucesivos una "planta fértil", y la producción de semillas y plantas adicionales de dicha planta fértil.

También se proporcionan procedimientos para controlar selectivamente malas hierbas en un campo, comprendiendo el campo plantas con las alteraciones del gen PPX y malas hierbas desveladas, comprendiendo el procedimiento la aplicación al campo de un herbicida al que las plantas se han vuelto resistentes.

10 También se proporcionan mutaciones en el gen de PPX que confieren resistencia o tolerancia a un miembro del herbicida relevante a una planta o en el que el gen de PPX mutado tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con PPX de tipo silvestre.

Selección de plantas resistentes a herbicidas y aplicación de herbicida

15 Las plantas y las células de plantas pueden someterse a prueba para resistencia o tolerancia a un herbicida usando procedimientos comúnmente conocidos en la técnica, p. ej., cultivando la planta o célula de la planta en presencia de un herbicida y midiendo la tasa de crecimiento en comparación con la tasa de crecimiento en ausencia del herbicida.

20 Como se usa en el presente documento, el crecimiento sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta se define como una tasa de crecimiento o tasa de división celular de la planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta que es al menos el 35 %, al menos el 50 %, al menos el 60 % o al menos el 75 % de la tasa de crecimiento o tasa de división celular en una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta correspondiente que exprese la proteína PPX de tipo silvestre.

25 Como se usa en el presente documento, el desarrollo sustancialmente normal de una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta se define como la aparición de uno o más eventos de desarrollo en la planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta que son sustancialmente los mismos que ocurren en una planta, órgano de planta, tejido de planta o célula de planta correspondiente que exprese la proteína PPX de tipo silvestre.

30 Conjuntamente con cualquiera de los aspectos, realizaciones, procedimientos y/o composiciones desvelados en el presente documento, los órganos de plantas proporcionados en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, hojas, tallos, raíces, brotes vegetativos, botones florales, meristemos, embriones, cotiledones, endospermo, sépalos, pétalos, pistilos, carpelos, estambres, anteras, microesporas, polen, tubos de polen, óvulos, ovarios y frutos, o secciones, cortes o discos tomados de los mismos. Los tejidos de plantas incluyen, pero sin limitación, tejidos callosos, tejidos triturados, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos foliculares, tejidos de brotes, tejidos radiculares, tejidos de agallas, tejidos tumorales vegetales y tejidos reproductivos. Las células de plantas incluyen, pero sin limitación, células aisladas con paredes celulares, sus agregados de diversos tamaños y protoplastos.

35 Las plantas son sustancialmente "tolerantes" a un herbicida relevante cuando se les somete y proporcionan una curva de dosis/respuesta que se desplaza hacia la derecha cuando se compara con la proporcionada por plantas similares no tolerantes sometidas de forma similar. Dichas curvas de dosis/respuesta tienen una "dosis" representada en el eje X y un "porcentaje de muerte", "efecto herbicida", etc., representado en el eje y. Las plantas tolerantes requerirán más herbicida que las plantas no tolerantes con el fin de producir un efecto herbicida dado. Las plantas que son sustancialmente "resistentes" al herbicida muestran pocas, si las hay, lesiones necróticas, líticas, cloróticas u otras, cuando se las somete a herbicidas en concentraciones y tasas que son típicamente empleadas por la comunidad agroquímica para matar malas hierbas en el campo. Las plantas que son resistentes a un herbicida también son tolerantes del herbicida.

45 En algunas realizaciones una "resistencia incrementada a un herbicida" o "tolerancia incrementada a un herbicida" se refiere a un nivel de resistencia o tolerancia que una planta, semilla o parte de planta que tiene un gen o proteína PPX mutada como se desvela en el presente documento tiene a herbicidas para plantas por encima de un nivel de referencia definido. El nivel de referencia definido de resistencia a un herbicida es el nivel de resistencia exhibido por una planta de la misma especie sin la(s) mutación(es) correspondiente(s). En algunas realizaciones, la resistencia se incrementa sustancialmente por encima del nivel de referencia definido, p. ej., mayor que o igual a 20 % por encima, 50 % por encima, 75 % por encima; o 100 % por encima del nivel de referencia definido.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos, que ilustran procedimientos para practicar la divulgación. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes son en volumen a menos que se indique otra cosa.

55 **Ejemplo 1: Clonación y caracterización del gen PPX plastidial y mitocondrial**

Los genes PPX plastidial y mitocondrial se amplificaron a partir de ADNc y ADN genómico de una variedad cultivada Russet Burbank. Los clones PPX plastidiales se dividen en dos clases, con los nombres StcPPX1 y StcPPX1.1, que probablemente representan alelos de un único gen PPX en la patata. Dentro de la secuencia de codificación de aminoácidos, estos clones difieren en 10 polimorfismos, 3 de los cuales conducen a diferencias de aminoácidos, encontrándose solo dos en la proteína madura. Una diferencia de aminoácidos está en el péptido de tránsito del cloroplasto. En uno de los clones StcPPX1.1, el intrón 3 no se empalmó.

Se obtuvo un clon genómico libre de errores de longitud completa del PPX plastidial. El análisis de aproximadamente 5 Kb de secuencia genómica de 5 clones independientes y los resultados de secuenciación de ADNc de StcPPX indican que la variedad Russet Burbank sujeta a caracterización es heterocigótica, con muy pocos polimorfismos existentes entre los dos alelos.

Primero, se clonaron y se secuenciaron cinco clones de ADN genómico StmPPX de longitud completa. Estos cinco representaron ambos alelos, teniendo los mismos PNU que se encuentran en el ADNc. Los fragmentos de ADN genómico de un amplicón más corto se clonaron y se secuenciaron para probar alelos adicionales. La clonación de este amplicón interno de la PPX mitocondrial indicó que había tres alelos; 6 de 22 clones tenían una delección dentro de uno de los intrones y los otros 16 clones tenían una distribución uniforme de los dos alelos observados en los clones de ADNc. A continuación, se secuenciaron otros 12 clones de ADN genómico StmPPX de longitud completa.

La secuencia completa de los genes PPX mitocondriales en la patata Russet Burbank indicó que hay dos genes, que los investigadores han denominado StmPPX1 y StmPPX2. Hay dos alelos StmPPX2 con 8 PNU identificados entre ellos. Entre StmPPX1 y StmPPX2.1 hay 1 inserción, 4 delecciones y 30 SNP, mientras que entre StmPPX1 y StmPPX2.2 hay 1 inserción, 4 delecciones y 29 PNU. Detalles adicionales se presentan en la Tabla 7.

Se compararon las secuencias génicas de los genes PPX plastidial y mitocondrial de Russet Burbank (*Solanum tuberosum*), usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), con la base de datos de los investigadores instalada localmente basada en aramzones para la reciente liberación del primer genoma de patata completa (*Solanum phureja*). Solo se encontraron un único gen PPX mitocondrial y un plastidial individual.

Tabla 7. Diferencias alélicas entre las formas mitocondriales de PPX en la patata Russet Burbank.

<u>Posición</u> <u>StmPPX nt</u>	<u>Gen nt</u> <u>1</u>	<u>Gen aa</u> <u>1</u>	<u>Gen nt 2</u> <u>Alelo 1</u>	<u>Gen aa 2</u> <u>Alelo 1</u>	<u>Gen nt 2</u> <u>Alelo 2</u>	<u>Gen aa 2</u> <u>Alelo 2</u>	<u>Posición</u> <u>StmPPX</u>	<u>Posición Atc</u> <u>PPX aa</u>
296	A (TAC)	Y	A (TAC)	Y	T (TTC)	F	99	145
360	C (AAC)	N	T (AAT)	N	T (AAT)	N	120	166
402	T (CCT)	P	A (CCA)	P	A (CCA)	P	134	180
528	G (ACG)	T	A (ACA)	T	A (ACA)	T	176	218
680	T (GTA)	V	T (GTA)	V	A (GAA)	E	227	269 270
692	A (CAC)	H	G (CGC)	R	G (CGC)	R	231	272

Ejemplo 2: Complementación de PPX

StcPPX1, menos su péptido de tránsito de cloroplastos, se clonó a partir del ADNc en el vector de exploración funcional patentado de Cibus. Este vector se puede usar tanto para el tamizado funcional como para GRON QC. Los genes PPX de patata se usaron para complementar la cepa mutante HemG de *E. coli*, que carece de un gen HemG funcional, un homólogo bacteriano de PPX. Sin un gen complementario, los medios deben complementarse con hematina para el crecimiento de *E. coli*. Los clones para el gen PPX plastidial (pACYStcPPX Col6) y el gen PPX mitocondrial (pACYStmPPX Col 6, 12 y 21) se transformaron y se demostró que todos los genes/alelos complementan la cepa mutante HemG de *E. coli*, lo que permite que crezca en ausencia de hematina.

Con el fin de evaluar las mutaciones que confieren tolerancia a los inhibidores de PPX como Chateau (flumioxazina-valent/sumitomo), naja (difeniléter-MAI) o kixor (saflufenacilo-BASF). Los herbicidas inhibidores de PPX se muestran en la Tabla 5. Se obtuvieron principios activos puros para los herbicidas inhibidores de PPX Chateau (flumioxazina-valent/sumitomo), spartan (sulfentrazona-FMC) y kixor/sharpen (saflufenacilo-BASF). El clon PPX plastidial de patata de tipo silvestre (pACYStcPPX Col6) se transformó para complementar la cepa de *E. coli* mutante hemG y se seleccionó con una serie de concentraciones del principio activo para el herbicida inhibidor de PPX spartan (sulfentrazona-FMC) para determinar la concentración a la cual no crece la cepa HemG menos complementada. La construcción de tipo silvestre no creció en sulfentrazona 2,5 mM, por lo tanto, la selección de mutantes tolerantes se realizó a esta concentración. Esto se refinó adicionalmente y también se usó sulfentrazona 0,75 mM para seleccionar la tolerancia. La construcción de tipo silvestre tuvo un crecimiento limitado a 10 mM de flumioxazina en

la selección líquida y ningún crecimiento a 0,3 mM de saflufenacilo. En la selección basada en placa, las concentraciones se usaron para probar mutantes tolerantes. Todos los genes y alelos PPX mitocondriales de patata fueron probados para tolerancia natural a sulfentrazona y flumioxazina, pero ninguno fue tolerante.

Ejemplo 3: Mutagénesis PCR de PPX y selección de clones mutagenizados

- 5 Los experimentos de mutagénesis se realizaron inicialmente en dos fragmentos superpuestos (5' y 3') del gen PPX plastidial de patata, para identificar mutaciones en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata que confiere tolerancia a herbicidas.

Estandarización de selección líquida

- 10 Se desarrollaron condiciones de selección de cultivo líquido tanto para sulfentrazona como para flumioxazina. Se probaron cultivos de 1 ml de volumen con concentraciones de sulfentrazona y flumioxazina que oscilan entre 0 y 10 mM. Las muestras de 0 mM tenían 25 µl de DMSO (2,5 %) para imitar la concentración de DMSO en las muestras que contenían 10 mM de herbicida. Cada tubo se inoculó con 10 µl de un cultivo de células HemG de una noche complementado con el plásmido PPX de tipo silvestre para asegurar la uniformidad. Se tomaron lecturas espectrofotométricas (DO600) para cada muestra (dilución 1: 4) y una muestra de cada una se colocó en placas LB-Chlor-IPTG para determinar si la DO600 se correlacionaba con el número de colonias viables. Se colocó en placas una dilución al 10 % del cultivo de una noche para las células tratadas con sulfentrazona y se colocó en placas una dilución al 1 % para las células tratadas con flumioxazina (véanse los resultados en las Tablas 8a-f y 9a-d).

- 20 Tanto la sulfentrazona como la flumioxazina se precipitan en el medio líquido, lo que hace que parezca opaco incluso antes de inocular las bacterias. Como muestran las DO para la sulfentrazona, este herbicida finalmente se disuelve, mientras que la flumioxazina no lo hace. La deficiente solubilidad de la flumioxazina sesga las lecturas de DO, sin embargo, la flumioxazina demostró una disminución constante del número de colonias contra el gen WT, lo que indica la capacidad de las células para absorber la flumioxazina de los medios.

Mutagénesis en el extremo 5'

- 25 El extremo 5' del gen PPX se mutagenizó usando el kit de mutagénesis aleatorio Stratagene GeneMorph II y se clonó en XL-1 Blue para verificar la tasa de mutación. Los resultados mostraron que 14 de las 16 colonias secuenciadas eran mutantes. Las placas XL-1 Blue al 90 % (aproximadamente 4000 colonias) se rasparon, se prepararon con plásmido y se transformaron en HemG y se colocaron en placas en sulfentrazona 2,5 mM. Las placas de sulfentrazona cultivaron aproximadamente 200 colonias y las placas con 10 % de LB-Chlor-IPTG cultivaron un césped de colonias. Las Tablas 9a-d describen las sustituciones de nucleótidos y aminoácidos encontradas en los clones tolerantes.

Selección de clones mutagenizados

- 35 Los plásmidos mutagenizados al azar (extremos 5' y 3') se transformaron en células XL1-Blue de *E. coli*. Las colonias resultantes se combinaron, se aisló el ADN plasmídico y se transformó en células HemG (PPX mutante de *E. coli*). Para la selección con flumioxazina, las células se recuperaron durante 1 h en medio líquido mínimo seguido de la adición de herbicida y la recuperación de las células durante una noche. Al día siguiente, las células se colocaron a una dilución adecuada en placas LB que contenían antibiótico para seleccionar el plásmido complementario. Las colonias de cada placa fueron secuenciadas. Después de la selección del líquido en flumioxazina 10 mM, aparecieron aproximadamente 30 colonias en placas con PPX de tipo silvestre (TS) en comparación con aproximadamente 200-1200 colonias con plásmidos mutagenizados. Para la selección de sulfentrazona, los cultivos se hicieron crecer en medios mínimos durante una noche, se diluyeron y se colocaron en placas con 0 y 0,75 mM de concentración de sulfentrazona. Los recuentos de colonias se compararon entre los dos y la tolerancia a las mutaciones se determinó basándose en el porcentaje de colonias en las placas de sulfentrazona 0,75 mM en comparación con las placas de 0 mM. El número de colonias que aparecen en las placas sirvió como un procedimiento para clasificar las mutaciones.

45 Mutagénesis en el extremo 3'

- 50 La mutagénesis se realizó en el extremo 3' del gen PPX. Los clones se transformaron en HemG y se dejaron crecer durante una noche en 2,5, 5 y 10 mM de flumioxazina para su selección. La selección en flumioxazina 5 mM tenía muchas más colonias que en las placas de selección de 10 mM. La selección para clones mutagenizados usando flumioxazina 10 mM produjo cuatro clones. La selección para clones mutagenizados usando flumioxazina 5 mM produjo 200 colonias. El tercio superior de las 200 colonias obtenidas para la mutagénesis en el extremo 3' se tamizó en flumioxazina 10 mM. Todas las colonias tolerantes (aproximadamente 130) se secuenciaron y los mejores mutantes tolerantes a la flumioxazina, se evaluaron por el recuento de colonias en flumioxazina, el extremo 3' evaluó la tolerancia a la sulfentrazona.

Ejemplo 4: Análisis de sustituciones de aminoácidos que confieren tolerancia

- 55 Se probó la tolerancia de todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada posición que exhibe tolerancia a

la sulfentrazona o flumioxazina. A continuación, se combinaron subunidades de aminoácidos individuales en todas las permutaciones y combinaciones para evaluar la complementación y la tolerancia a herbicidas. Los resultados de combinaciones mutantes únicas y múltiples para flumioxazina se muestran en las Tablas 8a, 8b y 8c, en las que la última columna muestra el número de colonias indicadas para cada mutación en flumioxazina 10 mM. Los resultados de combinaciones mutantes únicas y múltiples para sulfentrazona se muestran en las Tablas 9a y 9b, en las que la última columna muestra el número de colonias indicadas para cada mutación en sulfentrazona 0,75 mM. Los resultados de combinaciones mutantes únicas y múltiples para saflufenacilo se muestran en la Tabla 10, en la que la cuarta columna muestra el número de colonias indicadas para cada mutación en saflufenacilo 0,3 mM.

Tabla 8a. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a flumioxazina.

	<u>Mutación</u>	<u>Plásmido</u>	<u>N.º medio de clones resistentes a la flumioxazina</u>
---	L393V	F1125	0
---	L403R	F1155	2
A180T	Y426F	SD5083	2
---	L424S	F1154	2
F145L	Y426H	SD5055	3
S244G	Y426F	SD5087	10
F145L	L403R	SD5115	10
---	Y426F	F1165	11
F145Y	L424S	SD5106	13
R144C	L424S	SD5102	41
L226M	Y426H	SD5059	55
A220T	L403R	SD5114	69
---	Y426H	F1180	71
A220T	L424S	SD5104	72
F145Y	Y426F	SD5086	75
R144C	L393V	SD5092	81
A220T	L393V	SD5094	107
S244G	L393V	SD5097	114
L226M	L403R	SD5119	123
A180T	Y426H	SD5053	129
L226M	L424S	SD5109	137
L226M	Y426F	SD5089	143
A220T	Y426F	SD5084	147
A220T	Y426H	SD5054	151
R144C	Y426F	SD5082	155
---	---	wt	0

Tabla 8b. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a flumioxazina.

<u>Mutación</u>			<u>Plásmido</u>	<u>N.º medio de clones resistentes a la flumioxazina</u>
R144C	A220T		SD5011 Col 1	701
A220T			F113	667
R144H	S332C		F76	517
R144C	K272F		SD5014 Col 1	300
N52K	R144H	S244T	F72	202
N85D	A220T		SD5007 Col 1	196
R144H	S244T		F96	174
R144C			S7	139
R144C	L226M		SD5012 Col 1	117
M228L			S37	107
L226M			F114	102
N85D	L226M		SD5008 Col 2	50
F145Y			S32	38
N85D	F145Y		SD5004 Col 3	37
S244G			S120	31
R144C	M228L		SD5013 Col 2	31
P185R			SD5016 Col 1	27
N52K			SD5001 Col 3	23
N85D	A180T		SD5005 Col 1	23
A180T			F17	22
N85D	R144C		SD5002 Col 1	21
S332C			SD5019 Col 1	20
F145L			S118	19
N85D			F80	16
K272F			F7	15
S244T			SD5018 Col 3	10
N85D	K272F		SD5010 Col 4	7
N85D	M228L		SD5009 Col 3	6
			wt	43

Tabla 8c. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a flumioxazina.

<u>Mutación</u>		<u>Plásmido</u>	<u>N.º medio de clones resistentes a la flumioxazina</u>
N85D	Y426H	SD5051	30

(continuación)

Mutación		Plásmido	N.º medio de clones resistentes a la flumioxazina
R144C	Y426H	SD5052	48
F145Y	Y426H	SD5056	52
S244T	Y426H	SD5058	73
S244G	Y426H	SD5057	80
A180T	Y426H	SD5053	128
L226M	Y426H	SD5059	228
F145L	Y426H	SD5055	305
A220T	Y426H	SD5054	391
---	Y426H	F1180	210
---	---	Wt	32

Tabla 8d. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX mitocondrial de patata a flumioxazina 5 mM

A404S	
C271R	D274G
C307S	A423V
C434S	T500S
C434Y	
D330E	
D447G	A292G
D454N	
N324K	
R406K	
S396L	K410I
S448A	N324D
Y465F	K470T

Tabla 8e. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX mitocondrial de patata a flumioxazina 5 mM

A101V			
C177S			
D170E			
D58N			
E150K			
E64V			
F121L	E150D		

(continuación)

G74C	R98C		
G84N			
K97R			
L93H	V164A		
N195K			
P214S			
Q157L	H187Q		
R98C			
R98H			
R98L			
R98L	P214H		
R98L	T124I	L188F	K229Q
S119N	N139Y		
S151T	K229E	K230R	
V164F			

Tabla 8f. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX mitocondrial de patata a flumioxazina 10 mM.

Mutante	N.º de colonias con flumioxazina 10 mM
wt	42
R98L	83
P214H	51
R98L/P214H	88
R98L/P214H/T124I	110
R98L/P214H/T124I/K229Q	109

Tabla 9a. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a sulfentrazona.

Mutación		Plásmido	Promedio sulf 0,75 mM	Promedio 0 mM	0,75 mM/0 mM
---	Y426F	F1165	8	91	0,8 %
---	L393V	F1125	6	57	1,0 %
L226M	Y426H	SD5059	14	79	1,8 %
S244T	L393V	SD5098	11	53	2,1 %
F145Y	Y426H	SD5056	16	72	2,2 %
---	L403R	F1155	16	72	2,2 %
R144C	S525T	SD5072	19	76	2,6 %
A220T	L393V	SD5094	20	55	3,6 %

(continuación)

<u>Mutación</u>		<u>Plásmido</u>	<u>Promedio sulf 0,75 mM</u>	<u>Promedio 0 mM</u>	<u>0,75 mM/0 mM</u>
---	L424S	F1154	21	56	3,7 %
F145L	L424S	SD5105	18	48	3,8 %
---	Y426H	F1180	29	68	4,2 %
A220T	Y426H	SD5054	19	39	5,0 %
F145Y	L393V	SD5096	55	86	6,3 %
S244T	Y426F	SD5088	58	88	6,5 %
F145Y	L424S	SD5106	49	69	7,1 %
A220T	L403R	SD5114	50	63	7,9 %
L226M	Y426F	SD5089	117	67	17,4 %
N85D	Y426H	SD5051	200	92	21,8 %
L226M	L424S	SD5109	91	40	22,6 %
F145Y	L403R	SD5116	315	110	28,5 %
F145L	L393V	SD5095	381	121	31,6 %
L226M	L403R	SD5119	252	75	33,8 %
R144C	Y426F	SD5082	400	117	34,3 %
S244G	L393V	SD5097	433	125	34,7 %
---	S525T	F1061	278	79	35,3 %
A180T	Y426H	SD5053	331	80	41,4 %
R144C	Y426H	SD5052	709	125	56,6 %
---	—	wt	0	85	0,0 %

Tabla 9b. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a sulfentrazona.

<u>Mutación(es)</u>		<u>Plásmido</u>	<u>N.º medio de clones resistentes a la sulfentrazona</u>
R144C	M228L	SD5013 Col 2	267
R144C	A220T	SD5011 Col 1	260
F145Y		S32	233
R144C	L226M	SD5012 Col 1	186
A220T		F113	149
P185R		SD5016 Col 1	133
R144C	K272F	SD5014 Col 1	118
N52K		SD5001 Col 3	90
M228L		S37	78
N85D	A180T	SD5005 Col 1	75
S244G		S120	68

(continuación)

<u>Mutación(es)</u>			<u>Plásmido</u>	<u>N.º medio de clones resistentes a la sulfentrazona</u>
R144H	S332C		F76	64
N85D	F145Y		SD5004 Col 3	62
K272F			F7	61
L226M			F114	57
R144C			S7	55
S244T			SD5018 Col 3	32
R144H	S244T		F96	31
F145L			S118	29
S332C			SD5019 Col 1	28
N85D	R144C		SD5002 Col 1	25
N85D	A220T		SD5007 Col 1	19
N85D	L226M		SD5008 Col 2	18
A180T			F17	18
N52K	R144H	S244T	F72	18
N85D	M228L		SD5009 Col 3	12
N85D			F80	6
N85D	K272F		SD5010 Col 4	6
			WT	23

Tabla 9c. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX mitocondrial de patata a sulfentrazona.

<u>Conc. de sulf.</u>	<u>Mutante(s)</u>	<u>Colonias</u>	<u>% Prom.</u>
0 mM	R98L/P214H	1341	
0,5 mM	R98L/P214H	349	26,0 %
0,9 mM	R98L/P214H	127	9,5 %
1,0 mM	R98L/P214H	77	5,7 %
1,1 mM	R98L/P214H	67	5,0 %
1,2 mM	R98L/P214H	48	3,6 %
0 mM	R98L	1541	
0,5 mM	R98L	339	22,0 %
0,9 mM	R98L	145	9,4 %
1,0 mM	R98L	110	7,1 %
1,1 mM	R98L	76	4,9 %
1,2 mM	R98L	54	3,5 %
0 mM	R98L/T124I/K229Q	1220	
0,5 mM	R98L/T124I/K229Q	312	25,6 %

(continuación)

Conc. de sulf.	Mutante(s)	Colonias	% Prom.
0,9 mM	R98L/T124I/K229Q	88	7,2 %
1,0 mM	R98L/T124I/K229Q	66	5, 4%
1,1 mM	R98L/T124I/K229Q	40	3,3 %

Tabla 9d. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX mitocondrial de patata a sulfentrazona.

Conc. de sulf.	Mutante(s)	Colonias	% Prom.
0 mM	R98L/P214H	1088	
0,4 mM	R98L/P214H	251	23,1 %
0,5 mM	R98L/P214H	150	13,8 %
0,6 mM	R98L/P214H	105	9,7 %
0,7 mM	R98L/P214H	108	9,9 %
0,8 mM	R98L/P214H	51	4,7 %
0 mM	R98L	1171	
0,4 mM	R98L	174	14,9 %
0,5 mM	R98L	104	8,9 %
0,6 mM	R98L	98	8,4 %
0,7 mM	R98L	92	7,9 %
0,8 mM	R98L	51	4,4 %
0 mM	R98L/T 124I/P214H/K229Q	1134	
0,4 mM	R98L/T124I/P214H/K229Q	724	63,8 %
0,5 mM	R98L/T124I/P214H/K229Q	654	57,7 %
0,6 mM	R98L/T124I/P214H/K229Q	402	35,4 %
0,7 mM	R98L/T124I/P214H/K229Q	302	26,6 %
0,8 mM	R98L/T124I/P214H/K229Q	280	24,7 %
0 mM	P214H	1184	
0,4 mM	P214H	0	0,0 %
0,5 mM	P214H	0	0,0 %
0,6 mM	P214H	0	0,0 %
0,7 mM	P214H	0	0,0 %
0,8 mM	P214H	0	0,0 %

Tabla 10. Tolerancia de combinaciones mutantes únicas y múltiples en la secuencia de codificación de PPX plastidial de patata a gsaflufenacilo medido por el número de colonias indicadas.

	Mutación	Plásmido	N.º medio de clones resistentes a saflufenacilo	Promedio 0	
				mM	0,3 mM/0 mM
---	S525T	F1061	0	69	0,0 %

(continuación)					
Mutación	Plásmido	N.º medio de clones resistentes a saflufenacilo	Promedio 0		
			mM	0,3 mM/0 mM	
N85D	Y426H	SD5051	0	64	0,0 %
F145L	L393V	SD5095	0	114	0,0%
S244G	L393V	SD5097	0	111	0,0 %
F145Y	L403R	SD5116	0	104	0,0 %
L226M	L424S	SD5109	6	50	1,3 %
L226M	Y426F	SD5089	15	96	1,5 %
A220T	L393V	SD5094	116	99	11,7 %
A220T	Y426F	SD5084	190	87	22,0 %
L226M	L403R	SD5119	225	69	32,5 %
R144C	Y426F	SD5082	319	61	52,6 %
R144C	Y426H	SD5052	415	75	55,4 %
A180T	Y426H	SD5053	394	60	65,7 %
A220T	Y426H	SD5054	356	46	77,5 %
---	---	wt	0	96	0,0 %

Ejemplo 5: Curvas de cultivo de células de planta- muerte con herbicidas

Curvas de muerte con flumioxacina

5 Se realizaron experimentos de selección de herbicidas para determinar la concentración de herbicida necesaria para matar microcallos procedentes de protoplastos en un período de tratamiento definido. A la luz de un resultado inicial de curva de muerte en la que una concentración de 125 µM fue suficiente para matar todas las células en una semana, se diseñó una nueva curva de muerte usando concentraciones más bajas de flumioxazina con el objeto de determinar la concentración a la que se mata el 99 % de las células (véase la Tabla 11). El herbicida se suspendió en DMSO, siendo la concentración final de DMSO en los tratamientos herbicidas del 1 %. El desarrollo de las células se evaluó bajo el microscopio una vez a la semana. Exceptuando los tratamientos de control, se evitó la división en todos los tratamientos con flumioxazina después de una semana y después de un mes no se desarrollaron microcallos a ninguna concentración probada. Una concentración de flumioxazina de 0,032 mM es suficiente para evitar el desarrollo de microcallos de los protoplastos de patatas.

15 **Tabla 11.** Resumen de los resultados de los experimentos de la curva de muerte con flumioxazina con suspensión celular y protoplastos procedentes de punta de brote. Los protoplastos se expusieron a flumioxazina durante un período de un mes.

Protoplasto no tratado + peg	N.º de callos en tres cuentas		Interrupción de GFC+ corrección de gron	N.º de callos en tres cuentas	
Conc. de flumioxacina µM	N.º	%	Conc. de flumioxacina µM	N.º	%
Control n.º 1*	185		Control	230	
Control n.º 2**	150		Control	190	
Prom. cont 1 + cont 2	157,5	100	Prom. cont 1 + cont 2	210	100
0,0156	40	25	0,0156	83	39
0,0312	8	5	0,0312	11	4

(continuación)

Protoplasto no tratado + peg	N.º de callos en tres cuentas		Interrupción de GFC+ corrección de gron	N.º de callos en tres cuentas	
0,0468	0,0	0,0	0,0468	0,0	0,0
0,0624	0	0	0,0624	0	0
* Medio de cultivo, sin herbicida ** Medio de cultivo con DMSO al 1 %, sin herbicida					

Curvas de muerte con sulfentrazona

Las curvas de muerte con sulfentrazona en protoplastos procedentes de punta de brote y la suspensión celular mostraron concentraciones de sulfentrazona 7,8 µM que son suficientes para matar todas las células procedentes de protoplastos (véase la Tabla 12). Por lo tanto, se iniciaron nuevas curvas de muerte con concentraciones más bajas de 0, 0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 µM de sulfentrazona, que se muestran en la Tabla 13. Los resultados sugieren que los protoplastos tratados con GRON pueden seleccionarse en concentraciones entre 0,6 µM y 0,7 µM del herbicida.

Tabla 12. Resumen de los resultados de los experimentos de la curva de muerte con sulfentrazona con suspensión celular y protoplastos procedentes de punta de brote. Los protoplastos se expusieron a sulfentrazona durante un periodo de un mes.

Tratamiento con sulfentrazona [µM]	Formación de microcallos
Control: 1*	Sí, abundante
Control: 2**	Sí, abundante
62,5	No
31,25	No
15,6	No
7,8	No
* Medio de cultivo, sin herbicida ** Medio de cultivo con DMSO al 1 %, sin herbicida	

Tabla 13. Resumen de los resultados de los experimentos de la curva de muerte con sulfentrazona con suspensión celular y protoplastos procedentes de punta de brote. Los protoplastos se expusieron al herbicida durante un periodo de un mes.

Protoplasto no tratado + peg	N.º de callos en tres cuentas		Interrupción de GFC+ corrección de gron	N.º de callos en cuentas	
Conc. de sulfentrazona µM	N.º	%	Conc. de sulfentrazona µM	N.º	%
0,0	115	100	0,0	125	100 %
0,5	45	30	0,5	38	30,2
0,6	8	6,9	0,6	12	9,6
0,7	2	1,7	0,7	7	5,6
0,8	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
* Medio de cultivo, sin herbicida ** Medio de cultivo con DMSO al 1 %, sin herbicida					

Ejemplo 6: Curvas de muerte de discos de hojas.

Con el objeto de establecer la concentración de sulfentrazona que inhibirá la formación de callos en los explantes de disco de hojas, los discos de hojas se perforaron con un punzón estéril desde plantas de patata cultivadas *in vitro* de 5 semanas de edad. Los discos de hojas se cultivaron en placas de Petri que contenían medio de cultivo Haberlach

sólido que contenía diversas concentraciones de sulfentrazona en una concentración final de DMSO al 1 %. Seis discos de hojas se cultivaron en cada concentración de herbicida. Las placas se sellaron con cinta de microporos y se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En un experimento inicial, sulfentrazona 7,8 µM, la concentración más baja probada en ese experimento, fue suficiente para detener las formaciones de callos y blanquear todos los discos de hojas en 20 días. Los resultados de la curva de muerte con concentraciones más bajas de sulfentrazona mostraron que una concentración de 3,0 µM de sulfentrazona fue suficiente para inhibir la formación de callos en casi todos los discos de hoja después de 20 días, mientras que el callo se inició después de 13 días en las venas de las hojas de algunos discos de hojas cultivados en 2,0 µM de sulfentrazona. Se realizaron experimentos similares de curva de muerte de disco de hoja usando saflufenacilo en los que 0,5 µM de este herbicida fue suficiente para inhibir la formación de callos en casi todos los discos de hojas después de 20 días.

Ejemplo 7: Materiales y procedimientos para cultivo celular e introducción de GRON

Tabla 14. Secuencias de GRON

GRON	Secuencia
StcPPX1144/C/47/5'Cy3/3'idC	VGTTGGGAGATCCTGATGCGCCTTGCTTTGTCTTG TGGAAGGATAAACH (SEQ ID NO: 33)
StcPPX1144/NC/47/5'Cy3/3'idC	VGTTTATCCTTCCACAAGACAAAGCAAGGCGCATC AGGATCTCCCAACH (SEQ ID NO: 34)
StcPPX1220/C/47/5'Cy3/3'idC	VCATCATTTTACAGGTGTTTACACCGGTGACCCCT CAAAATTGH (SEQ ID NO: 35)
StcPPX1220/NC/47/5'Cy3/3'idC	VCAATTTTGAGGGGTCACCGGTGTAACACCTGTA AAATGATGH (SEQ ID NO: 36)

La base de conversión se muestra en negrita. V=CY3; H=3'DMT dC CPG

Descripción del trabajo de cultivo celular. Los brotes, por ejemplo, procedentes de semillas, tubérculos, brotes axilares, hojas, vapores, raíces, callos o embriones procedentes de microesporas, se propagan en condiciones estériles *in vitro*. Los explantes se subcultivan, por ejemplo, cada 3-4 semanas y se cultivan en vasos de cultivo Magenta GA7 (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS, EE. UU.) Con tapas ventiladas en un volumen de aproximadamente 100 ml de medio de cultivo, por ejemplo medio MS, de acuerdo con Murashige y Skoog (un medio revisado para crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tabaco. *Physiol. Plant* 15 (1962) 473-49), o modificaciones de los mismos. Los vasos pueden sellarse con cinta Micropore (3M Company). Las hojas jóvenes, puntas de los brotes, raíces, microtubérculos o segmentos de tallo largo que poseen una hoja y brote axilar, así como los callos procedentes de estos tejidos, pueden usarse para el aislamiento de protoplastos. Los protoplastos también se pueden aislar a partir de células de cultivo en suspensión procedentes de hojas jóvenes, puntas de los brotes, raíces, microtubérculos o segmentos de tallo largo que poseen una hoja y brote axilar, así como callos procedentes de estos tejidos.

Aislamiento de protoplastos de puntas de brotes

Aproximadamente 200 puntas de brotes de 2 a 8 semanas de edad *in vitro* que se han cultivado bajo un régimen diurno/nocturno regular o, preferentemente, se mantuvieron durante dos días antes del aislamiento de protoplastos en la oscuridad, los brotes se pueden cortar en trozos pequeños con una bisturí en una placa de Petri con agua estéril. Después de cortar todas las puntas, el agua se reemplaza con medio de cultivo de protoplastos, preferentemente BN (sales B5 y vitaminas (Phytotechnology Laboratories), glucosa 20 g/l, manitol 70 g/l, ácido alfa naftaleno acético 5 mg/l, CaCl₂ adicional x 2H₂O 600 mg/l, hidrolizado de caseína 250 mg/l, cisteína-HCl 10 mg/l, polivinilpirrolidona (PM 10.000) 5 g/l. Después de aproximadamente 1-2 h, el medio de cultivo de protoplastos se reemplaza con solución enzimática, por ejemplo, que consiste en medio BN, en el cual se disuelven 0,5 % (p/v) de Cellulase YC y el 0,75 % (p/v) de Macerozyme R10 (ambos de Karlan Research Products, Cottonwood, Arizona), 1 g/l de albúmina de suero bovino y 1 g/l de ácido 2-morfolinoetanosulfónico. La relación del número de puntas de brotes respecto al volumen de solución de enzima puede estar entre 10 y 16, preferentemente 13. La placa con trozos de punta de brote en solución de enzima se incuba a 25 °C-30 °C, preferentemente 28 °C, en la oscuridad con un agitador ajustado a aproximadamente 50 rpm. Después de la incubación durante una noche, la suspensión de protoplastos se purifica usando un gradiente de densidad de iodixanol (adaptado de Optiprep Application Sheet C18; purificación de protoplastos de plantas intactas; Axis-Shield EE.UU., 10 Commerce Way, Norton, MA 02776). Después de la centrifugación en gradiente de densidad, la banda con protoplastos purificados se elimina junto con aproximadamente 5 ml de medio W5 (Frigerio y col., 1998). La densidad y el rendimiento del protoplasto se determinan con un hemocitómetro. La densidad de proteoplastos se ajusta a 1 x 10⁶/ml en medio BN que contiene 2

mg/l de 2,6-diclorobenzonitrilo (inhibidor de la celulosa sintasa), y los protoplastos se cultivan en la oscuridad a 30 °C durante aproximadamente 16 h.

Aislamiento de protoplastos de suspensiones celulares

5 El aislamiento de los protoplastos de las suspensiones celulares sigue el mismo protocolo que el descrito para el aislamiento de protoplastos de las puntas de los brotes, con las siguientes excepciones:

1. Se usan suspensiones celulares de crecimiento rápido, preferentemente tres días después de su último subcultivo. Se transfiere 1,5 ml de volumen de células sedimentadas a aproximadamente 15 ml de medio BN, que después de 2 h se reemplaza con solución de enzima. 2. La purificación de protoplastos es seguida inmediatamente por el tratamiento GRON/PEG.

10 Introducción de oligonucleótidos de reparación de genes (GRON)

La suspensión de protoplastos se mezcla con un volumen igual de medio W5, se transfiere a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifuga durante 10 minutos en el ajuste más bajo de una centrifuga clínica (aproximadamente 50 x g). El sobrenadante se retiró y se reemplazó con medio de TM (Klaus, S. Markerfreie transplastome Tabakpflanzen (marcador libre de plantas de tabaco transplastómicas). PhD Dissertation, 2002, Ludwig-Maximilians-Universität München, 109 pp), ajustando la densidad de protoplastos a 5×10^6 /ml. Alícuotas de 100 μ l que contienen 5×10^5 protoplastos cada una se distribuyen en 12 ml de tubos de centrifuga de fondo redondo. Los GRON (tales como los que se muestran en la Tabla 14) dirigidos a una o más mutaciones en uno o ambos de los genes PPX mitocondriales y plastídicos se introducen luego en los protoplastos usando un tratamiento con PEG. Para introducir los GRON en los protoplastos, se disolvieron 12,5 μ g de GRON en 25 μ l de agua purificada y se añadió 125 μ l de una solución de polietilenglicol (5 g de PEG PM 1500, 638 mg de manitol, 207 mg de $\text{CaNO}_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ y 8,75 ml de agua purificada; pH ajustado a aproximadamente 9,0). Después de una incubación de 10-30 minutos en hielo, la suspensión de protoplastos-PEG se lava con medio W5 y se resuspende en medio BN. La suspensión se mantiene durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente.

25 Los GRON se pueden introducir en protoplastos mediante electroporación, lípidos catiónicos, nanopartículas, policationes como bromuro de hexadimetrina (polibreno) o espermidina, o mediante el uso de GRON formando complejos con una diversidad de péptidos de penetración celular (PPC), que incluyen pero sin limitación, TAT, pVEC, transportan, nona-arginina, péptido inhibidor de BAX (VPMK), o tales como los enumerados en Patel y col., péptidos penetrantes de células: vías intracelulares y perspectivas farmacéuticas. Pharmaceutical Research, 24 (2007) 1977-1992, o Veldhoen y col., desarrollos recientes en la entrega de ácido nucleico basado en péptidos. Revista Internacional de Ciencia Molecular (2008) 1276-1320. En otro ejemplo, los GRON se introducen en protoplastos a través de polímeros cargados negativamente que incluyen, pero sin limitación, dendrímeros tales como poliamidoamina (PAMAM).

35 Los GRON también pueden entregarse en tejidos o células completos usando procedimientos que pueden incluir microinyección, biolística con los GRON revestidos con soportes tales como oro o directamente en forma de gotitas de una suspensión de GRON, bigotes revestidos de GRON o mediante el uso de GRON formando complejos con una diversidad de los polímeros de carga negativa de péptidos de penetración celular (CPP) como se menciona en el párrafo anterior. Otros ejemplos prevén el uso de ultrasonidos, la imbibición en soluciones que contienen GRON, o la permeabilización de las paredes celulares, por ejemplo a través de agentes tales como tolueno o saponina.

Incrustación de protoplastos en alginato de calcio

40 Un día después de la introducción de GRON, los protoplastos son incrustados en alginato de calcio. Se ha demostrado que la incrustación de protoplastos en sustratos de gel (p. ej., agarosa, alginato) potencia la supervivencia de los protoplastos y aumenta las frecuencias de división de las células procedentes de protoplastos. El procedimiento aplicado se basa en lo descrito en Dovzhenko y col., (técnica de capa de alginato fino para el cultivo de protoplastos de protoplastos de hoja de tabaco: formación de brotes en menos de dos semanas. Protoplasma 204 (1998) 114-118).

Cultivo de protoplastos y selección de callos resistentes a herbicidas

50 La selección de callos resistentes a herbicidas se lleva a cabo usando subcultivos secuenciales de los alginatos en medios líquidos de acuerdo con Pelletier y col., (1983). La selección puede comenzarse una semana después del tratamiento con PEG/GRON a una concentración adecuada de herbicida inhibidor de PPX; por ejemplo, 32 μ M de flumioxazina, o 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 7,8 μ M, 15,6 μ M, 31,2 μ M o 62,5 μ M de sulfentrazona.

55 Antes del final de la fase de selección en medio líquido, las células y las colonias se liberan del alginato por tratamiento durante 30-45 minutos con medio de cultivo que contiene 50 mM de citrato de sodio. En el momento de la transferencia de colonias liberadas de medio líquido a sólido Cul (Haberlach y col., aislamiento, cultivo y regeneración de protoplastos de patata y varias especies de *Solanum* relacionadas. Plant Science, 39 (1985) 67-74), la mayoría de las colonias pueden estar muertas, o consistir en un centro verdoso, cubierto con capas externas de

células muertas. En el medio de selección solidificado (Cul + herbicida), la mayoría de los microcallos que todavía contienen células vivas pueden dejar de crecer y volverse de color marrón. El crecimiento limitado de callos individuales continúa ocasionalmente, pero todos los callos no resistentes con el tiempo se vuelven marrones y mueren. Dos o tres semanas después de la transferencia al medio de selección solidificado (ocasionalmente antes), los callos que crecen activamente pueden aparecer entre un fondo de células parduscas y microcallos.

Se realiza la regeneración de plantas a partir de callos tolerantes a herbicidas procedentes de protoplastos, con una mutación confirmada en un gen PPX. Los callos tolerantes a herbicidas inhibidores de PPX que se desarrollan en un medio de selección solidificado y cuyo ADN tras el análisis muestra la presencia de una mutación se transfieren a un medio Cul sin herbicida para acelerar el desarrollo. Las líneas de callos individuales varían en sus tasas de crecimiento y morfologías. En general, el desarrollo hacia la regeneración de brotes sigue estas etapas: Callo verde indiferenciado → callo con áreas de color verde oscuro → desarrollo de las iniciales del brote → desarrollo de una planta.

El desarrollo de líneas de callos individuales es variable, pero a través de subcultivos continuos y multiplicación en medio Cul o cambiando la formulación de medios a medio de diferenciación que incluye, pero sin limitación, medio de diferenciación Habermann, durante un período de tiempo aceptable (1-6 meses) seguido de la transferencia de las líneas de callo a medios de regeneración que incluyen, pero sin limitación, medio de regeneración Bokelmann (Bokelmann GS y Roest S., Z. Pflanzenphysiol. vol 109, página 259-265 (1983)) con el tiempo producen muchos brotes.

Una vez que los brotes con tres o cuatro hojas se forman en el medio de regeneración, se transfieren a un medio de propagación que incluye, pero sin limitación, medio MS. En este medio, con el tiempo, se desarrollan brotes y hojas que son morfológicamente "normales". Después de que las plántulas *in vitro* producen raíces, se usan protocolos convencionales para la adaptación a las condiciones del invernadero.

Tamizado molecular

El uso de técnicas moleculares convencionales y tecnologías basadas en RCP más sensibles se puede utilizar para controlar la frecuencia de mutaciones PPX después de un tratamiento RTDS. Estas técnicas moleculares incluyen, y sin limitación, RCP específica de alelo, secuenciación de ADN y otras tecnologías de identificación de SNP usando técnicas que no son de RCP. Estas técnicas permiten controlar la frecuencia de mutaciones dirigidas a PPX temprano en el procedimiento. En determinados ejemplos, las mutaciones se pueden medir en poblaciones de células individuales. Estas técnicas pueden entonces ser aplicables a lo largo del procedimiento de cultivo para confirmar y controlar las mutaciones presentes en callos seleccionados y plantas regeneradas.

Ejemplo 8: Pulverización de herbicidas

Solanum tuberosum o las plantas de la variedad cultivada de patata Russet Burbank cuando miden 5,1-15,2 cm de altura (generalmente la etapa de 5-6 hojas) se pulverizan con diversos herbicidas inhibidores de PPX. Los herbicidas se pulverizan en presencia de tensioactivo AU391 al 0,25 %. Los herbicidas se pulverizan, por ejemplo, a las siguientes tasas:

Flumioxazina	0,014 g de principio activo/m ² (g/m ²)
Sulfentrazone	0,031 g p a/m ²
Saflufenacilo	0,007-0,091 g p a/m ²

Los herbicidas se aplican mediante pulverización foliar y las plantas de control no se pulverizan. Ensayos de herbicidas inhibidores de PPX se evalúan 14 días después de la pulverización usando una escala de daño de 1 a 10 con 1 siendo los muertos y 10 siendo los controles no pulverizados no dañados. Las líneas de planta individuales se puntúan en cada tasa de pulverización en comparación con el rendimiento de los controles a esa tasa particular. Los herbicidas inhibidores de PPX tienen una ventana de aplicación potencialmente amplia y pueden usarse como una aplicación "previa" o "posterior" para cultivos, incluida la patata. Las evaluaciones de herbicidas incluyen tanto aplicaciones de invernadero como de campo para controlar el daño a las plantas (cultivos) y/o el control de malas hierbas. Los productos del trabajo de RTDS pueden permitir a los agricultores plantar cultivos como la patata y aplicar herbicidas inhibidores de PPX para eliminar o controlar las malas hierbas en los campos sin dañar los cultivos.

A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Las invenciones descritas ilustrativamente en el presente documento se pueden poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se divulgue específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, las expresiones "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc.

se leerán de forma amplia y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

REIVINDICACIONES

1. Una planta resistente a uno o más herbicidas inhibidores de PPX, comprendiendo dicha planta un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) mutado, en la que dicho gen codifica una proteína que comprende una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1, y una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1, en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de arginina por cisteína o leucina o histidina; y en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina por treonina, en la que la planta no se obtiene exclusivamente mediante un procedimiento esencialmente biológico.
2. Una célula de planta que comprende un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) mutado, en la que dicho gen codifica una proteína que comprende una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1, y una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1, en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de arginina por cisteína o leucina o histidina; y en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina por treonina, en la que la célula de planta no se obtiene exclusivamente mediante un procedimiento esencialmente biológico.
3. La planta o célula de planta de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho gen de PPX mutado codifica una proteína que comprende las sustituciones R144C y A220T.
4. La planta de la reivindicación 1 o 3, en la que dicha planta se selecciona de entre el grupo que consiste en patata, girasol, remolacha azucarera, maíz, algodón, soja, trigo, centeno, avena, arroz, colza, frutas, verduras, tabaco, cebada, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, zanahoria, lechuga, cebolla, soja spp, caña de azúcar, gusante, haba común, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y pastos forrajeros, lino, colza oleaginosa, pepino, campanilla, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, petunia, tulipán, iris, lirio y plantas productoras de nueces, en particular, en la que dicha planta es una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa* y *Zea mays*, o en la que dicha planta es una variedad cultivada de patata Russet Burbank.
5. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en la que dicha planta es resistente a uno o más herbicidas inhibidores de PPX seleccionados de entre acifluorfen-Na, Bifenox, Clometoxifeno, fluoroglicofen-etilo, Fomesafeno, Halosafeno, Lactofeno, Oxifluorfen, Fluazolato, piraflufen-etilo, cinidon-etilo, Flumioxazina, flumiclorac-pentilo, flutiacet-metilo, Tiazimidina, Oxadiazona, Oxadiargilo, Azafenidina, carfentrazona-etilo, Sulfentrazona, Pentoxazona, Benzfendizona, Butafenacilo, Saflufenacilo, Pirazogilo, Profluzol, en particular, en la que dicha planta es resistente a uno o más herbicidas seleccionados de entre el grupo que consiste en flumioxazina, sulfentrazona y saflufenacilo.
6. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5 o la célula de planta de la reivindicación 2 o 3, en la que la planta es una planta no transgénica, o en la que la célula de planta es una célula de planta no transgénica.
7. Un procedimiento de producción de una célula de planta no transgénica con un gen de PPX mutado, que comprende introducir en una célula de planta una oligonucleobase de reparación de genes (GRON) con una mutación dirigida en un gen de protoporfirinógeno IX oxidasa (PPX) para producir una célula de planta con un gen PPX que expresa una proteína PPX que comprende una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1, y una sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1, en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 144 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de arginina por cisteína o leucina o histidina; y en la que la sustitución en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 220 de la SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina por treonina.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, para producir una planta resistente a herbicidas, que comprende además identificar una célula de planta que tiene una tasa de crecimiento o tasa de división celular en presencia de un herbicida que es al menos el 35 % de la tasa de crecimiento o tasa de división celular en una planta correspondiente que expresa la proteína PPX de tipo silvestre en ausencia de herbicida; y regenerar una planta resistente a herbicidas no transgénica que tiene un gen de PPX mutado de dicha célula de planta.
9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que dicho gen de PPX mutado codifica una proteína que comprende las sustituciones R144C y A220T.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicha célula de planta se selecciona de entre el grupo que consiste en patata, girasol, remolacha azucarera, maíz, algodón, soja, trigo, centeno, avena, arroz, colza, frutas, verduras, tabaco, cebada, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, zanahoria, lechuga, cebolla, soja spp, caña de azúcar, guisante, haba común, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y pastos forrajeros, lino, colza oleaginosa, pepino, campanilla, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, petunia, tulipán, iris, lirio y plantas productoras de nueces, en

particular, en el que dicha célula de planta es una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Ricinus communis*, *Brassica napus*, *Glycine max* y *Zea mays*, o en el que dicha célula de planta es una variedad cultivada de patata Russet Burbank.

- 5 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que dicha planta es resistente a uno o más herbicidas inhibidores de PPX seleccionados de entre acifluorfen-Na, Bifenox, Clometoxifeno, fluoroglicofen-etilo, Fomesafeno, Halosafeno, Lactofeno, Oxifluorfen, Fluazolato, piraflufen-etilo, cinidon-etilo, Flumioxazina, flumiclorac-pentilo, flutiacet-metilo, Tiazimidina, Oxadiazona, Oxadiargilo, Azafenidina, carfentrazona-etilo, Sulfentrazona, Pentoxazona, Benzfendizona, Butafenacilo, Saflufenacilo, Pirazogilo, Profluazol, en particular, en el
- 10 que dicha planta es resistente a uno o más herbicidas seleccionados de entre el grupo que consiste en flumioxazina, sulfentrazona y saflufenacilo.

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno oxidasa de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (PPOX-A14g01690) (n.º de referencia AX084732) (SEQ ID NO: 1)

```

1  MELSLRLRPTTQSLLPFSKPNLRLNLYKPLRLRCSVAGGPTVGSSEKIEGG
51  GCTTPTDCVIVGGGLSGLCTAQAALATKHPDAAPNLIVTEAKDRVGGNI I
101  TREENGFLWEEGPNFQPSDFMLFMVVDVSGLKDDLVLGDPTAPRFVLWNG
151  KLRPVPKSLTDLPPFDLMSIQCKIRACFGALGIRPSPGREGESVEEFVRR
201  NLGDEVFERLEPPFCSGVYAGDPSKLSMKAAFGKVKLEQNGGSIIGGTF
251  KAIQEKKNAPKAEKRPRLKPKQGGTVCSEFRKGLRMLPEAISARLGSKVKL
301  SWKLSGITKLESCQYNLTYETPKGLVSVQSKSVVMVTPSHVASGLLRPLS
351  ESAANALSCLYYPVAVVISYKPEAIRTECLIDGELKGFQGLHPRTOGV
401  FTLCCTYSSELEPNKAPPGRILLNLYGGSTNTGILSKSEBELVEAVDRD
451  LRKMLIKPNSLDPKLGVRVWFQAI PQPLVGHFDILDTAKSLTSSQYEG
501  LFLGGNYVAGVALGRCVEGAYETAIEVNNFMMSRYAYK

```

Figura 2: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno oxidasa de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (PPOX-A14g01690) (n.º de referencia AX084732) (SEQ ID NO: 2)

```

1  TGACAAAATT CCGAATTC TC TCGAATTC ATGGAGTTAT CTCTTCTCCG TCCGACGACT
61  CAATCCGCTTC TTCCGTCGTT TTCGAAGCCC AATCTCCGAT TAAATGTTTA TAAGCCTCTT
121  AGACTCCGTT GTTCAGTGGC CGGTGGACCA ACCGTCGGAT CTTCAAAAAT CGAAGGCGGA
181  GGAGGCACCA CCATCACGAC GGATTGIGTG ATTGTCCGGG GAGGTATTAG TGGTCTTTGC
241  ATCCGCTCAGC CGCTTGCTAC TAAGCATCCT GATGCTGCTC CGAATTTAAT TGTGACCGAG
301  GCTAAGGATC GTGTGGAGG CAACATTATC ACTCCTGAAG AGAATGGTTT TCTCTGGGAA
361  GAAGGTCCCA ATAGTTTCA ACGTCTGAT CCTATGCTCA CTATGGTGGT AGATAGTGGT
421  TTGAAGGATG ATTTGGTGT GGGAGATCCT ACTGCGCCAA GGTTTGTGT GTGGAATGGG
481  AAATTGAGGC CGGTTCATC GAAGCTAACA GACTTACCGT TCTTTGATTT GATGAGTATT
541  GGTGGGAAGA TTAGAGCTGG TTTTGGTGA CTTGGCATTC GACCGTCACC TCCAGTCTGT
601  GAAGAATCTG TGGAGGAGT TGTACGCGT AACCTCGGTG ATGAGGTTT TGAGGCGCTG
661  ATTGAACCGT TTTGTTACG TGTATTGCT GGTGATCCTT CAAAACAGAG CATGAAAGCA
721  GCGTTTGGGA AGGTTTGGAA ACTAGAGCAA AATGGTGGAA GCATAATAGG TGCTACTTTF
781  AAGGCAATTC AGGAGAGGAA AAACGCTCCC AAGGCAGAAC GAGACCCGCG CCTGCCAAAA
841  CCACAGGGCC AAACAGTTG TCTTTTCAGG AAGGGACTTC GAATGTTGCC AGAAGCAATA
901  TCTGCAAGAT TAGGTAGCAA ACTTAAGTTG TCTTGAAGC TCTCAGGTAT CACTAAGCTG
961  GAGAGCGGAG GATACAACTT AACATATGAG ACTCCAGATG GTTTAGTTTC CGTGCAGAGC
1021  AAAACTCTTG TAATGACGGT GCCATCTCAT GTTGCAAGTG GTCTCTCGCG CCTCTTTTCT
1081  GAATCTGCTG CAAATGCACT CTCAAAAC TAATTACCCAC CAGTTGCAGC AGTATCTATC
1141  TCGTACCCGA AAGAAGCAAT CCGAACAGAA TGTTTGATAG ATGGTGAACF AAAGGGTTTT
1201  GGGCAATTCG ATCCACGCAC GCAAGGAGTT GAAACATTAG GAACTATCTA CAGCTCCTCA
1261  CTCTTTCCAA ATCGCGCACC GCCCGAAGA ATTTGCTGT TGAACACAT TGGCGGTCTT
1321  ACAAACACCG GAATCTGTG CAAGTCTGAA GGTGAGTTAG TGGAAAGCAGT TGACAGAGAT
1381  TTGAGGAAAA TGCTAATTAA GCCTAATTC ACCGATCCAC TAAATTAGG AGTTAGGCTA
1441  TGGCCTCAAG CCATTCCTCA GTTTCTACTT GGTCACTTTG ATATCCTTGA CACGCTAAA
1501  TCATCTCTAA CGTCTTCGGG CTACGAAGG CTATTTTGG GTGGCAATTA CGTCCGCTGGT
1561  GTAGCCTTAG GCCGCTGTG AGAAGGCGCA TATGAAACCG CGATTGAGGT CAACAACTTC
1621  ATGTCACGGT ACGCTTACAA GTAAATGTAA AACATTAAT CTCCAGCTT GCGTGAATTT
1681  TATTAATAT TTTGAGATAT CCAAAAAA AAAAAAAA

```

Figura 3: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno oxidasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (At5g14220-n.º de referencia NM_121426) (SEQ ID NO: 3)

```

1  MASCAVADHQIEAVSGKRVAVVGAIVSGLAAAYKIKSRGLNVIVFEADGR
51  VGGKLRVVMQGLIWDCAANTMTAEPEVGSLLDDLGLREKQCFPIQKK
101  RYIVRNGVPMLEPTNPELAVTSSVLSQSKFQJLLEFLWKKKSSKVSDA
101  SARESVSEFQRHFQEVVDYLDPPVGGTAAADPDSLKXHSFPELWNV
101  EKSFGSLIVGAIREFFAAKGCKSRITKSSPOTKKSFGSFSRFGMQLP
151  DTLCKSLSDFINLDSKVLSSVNSCERQENWSLSCVSENETQRQNPHYD
201  AVIMTAPLCNVKEMKVMKGGQPFQINFLPBEINYMPLSVLITTEFTXKVKR

```

```

251 PLEGGFVLIPEKQKQKFKTLGCTLFSSMMFPDRSPSDVHLYTTFIGGSRN
301 QELAKASTDFIKQVVTSDLQRLLGVEGEPVSVNHYYWRKAFPLYDSSYDS
351 VMEAIIDKMNELPQFFYAENHRGGLSVGKSIASGCKAAELVTSYLESCSN
401 DRKPNDSL
    
```

Figura 4: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno oxidasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* oxidase (At5gl4220-n.º de referencia NM_121426) (SEQ ID NO: 4)

```

1 TTTCCGTCAC TGCTTTCGAC TGGTCAGAGA TTTTGACTCT GAATTGTTCG AGATAGCAAT
61 GGCCTCTGGA GCAGTAGCAG ATCATCAAAT TGAAGCCGTT TCAGGAAAAA GAGTCGCAGT
121 CGTAGGTGCA GGTGTAAGTG GACTTGCCGC GGCTTACAAG TTGAAATCGA GGGGTTTGAA
181 TGTGACTGTG TTTGAAGCTG ATGGAAGAGT AGGTGGGAAG TTGAGAAGTG TTATGCAAAA
241 TGGTTTGATT TCCGATCAAG CACCAAAACAC CATGACTCAG CCTGAGCCAG AACTTGGCAG
301 TTTACTTGAT GATCTTGGGC TTCCTGAGAA ACAACAATTT CCAATTTCC ACAAAAAGCC
361 GTATATTGTG CCGAATGGTG TACCTGTGAT GCTACCTACC AATCCCATAG AGCTGGTCAC
421 AAGTAGTGTG CTCTCTACCC AATCTAAGTT TCAAATCTTG TTGGAACCAE TTTTATGGA
481 GAAAAAGTCC TCAAAAGTCT CAGATGCATC TGCTGAAGAA AGTCTAAGCG AGTCTTTTCA
541 ACGCCATTTT GGACAAGAGG TTGTTGACTA TCTCATCGAC CCTTTTGTTC GTGGAACAAG
601 TGCTGCCGAC CCTGATCCCC TTTCATGAA GCATTCTTTC CCAGATCTCT GGAATGTAGA
661 GAAAAGTTTT GGCTCTATTA TAGTCGGTGC AATCAGAACA AAGTTTGTCT CTAAAGCTGG
721 TAAAAAGTAG GACACAAAAG GTTCTCCTGG CACAAAAAAG GTTTCCGCTG GGTCAATCTC
781 TTTTAAGGGG GGAATGCAGA TTCTTCCTGA TACGTTGTGC AAAAGTCTCT CACATGATGA
841 GATCAATTTA GACTCCAAGG TACTCTCTTT GTCTTACAAT TCTGGATCAA GACAGGAGAA
901 CTGGTCATTA TCTTGTGTTT CGCATAATGA AACGCAGAGA CAAAACCCCC ATTATGATGC
961 TGTAAATATG ACGGCTCCTC TGTGCAATGT GAAGGAGATG AAGGTATGA AAGGAGGACA
1021 ACCCTTTTCA CTAAACTTTC TCCCGAGAT TAATTACATG CCCCTCTCGG TTTTAATCAC
1081 CACATTCACA AAGGAGAAAG TAAAGAGACC TCTTGAAGGC TTTGGGGTAC TCATTCATC
1141 TAAGGAGCAA AAGCATGGTT TCAAAACTCT AGGTACACTT TTTTCATCAA TGATGTTTCC
1201 AGATCGTTCC CCTAGTGACC TTCACTATA TACAACCTTT ATTGGTGGGA GTAGGAUCCA
1261 GGAATCAGCC AAAGCTTCCA CTGACGAATT AAAACAAGTT GTGACTTCTG ACCTTCAGCG
1321 ACTGTTGGGG GTTGAAGGTG AACCCGTGTC TGTCAACCAT TACTATTGGA GGAAAGCATT
1381 CCCGTTGTAT GACAGCAGCT ATGACTCAGT CATGGAAGCA ATTGACAAGA TGGAGAATGA
1441 TCTACCTGGG TTCTTCTATG CAGGTAATCA TCGAGGGGGG CTCTCTGTTG GGAAATCAAT
1501 AGCACTAGGT TGCAAAAGCAG CTGACCTTGT GATCTCATAC CTGGAGTCTT GCTCAAAATGA
1561 CAGAAAACCA AATGACAGCT TATAACAATG TCAAGGTTTG TCCCTTTTTA TCACCTACTT
1621 TGTAAACTTG TAAAATGCAA CAAGCCGCCG TCCGATTAGC CAACAACCTA GCAAAAACCA
1681 GATCTTCATA AGGCTCACTA ATTCCAGAAT AAACATTTTA TGTATGTTT GGTCTGTTT
1741 CTGTTTGCAT CACTGGTATG GTCTGTCTAG GTAGAAGAA ATGATAGGGT GAGGGATTT
1801 AGGATTGAAG AATCTTTAAA AC
    
```

Figura 5: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno oxidasa mitocondrial de *Amaranthus tuberculatus* (n.º de referencia DQ 386117) (SEQ ID NO:5)

```

1 MVIQSITHLSPNLALPSPLSVSTKNYPVAVMGNISEREPEPTSAKRVAVVG
51 AGVSGLAAYKLSHGLSVTLFEADSRAGGKLTVKKDGFIWDEGANIMT
101 ESEAEVSSLIDDLGLREKQQLPISQNKRYIARAGLPVLLPSNPAALLTSN
151 ILSAKSKLQIMLEPFLWRKHNATELSDEHVQESVGEFFERHFGKEFVDYV
201 IDPFFVAGTCGGDPQSLSMHITFPEVWNI EKRFSGVFAGLTQSTLLSKKEK
251 GGENASIKKPRVRGFSFQGGMQLVDTMCKQLGEDELKLCQCEVLSLSYN
301 QKGIPLGNWSVSSMSNNTSEDOQSYDAVVVTAPIRNVKEMKIMKFGNPF
351 LDFIPEVTYVPLSVMITAFKKDKVKRPLEGFGVLIPEKQHNGLKTLGCTL
401 FSSMMFPDRAPSDMCLFTTFVGGSRNRKLANASTDELKQIVSSDLQQLLG
451 TEDEPSFVNHFWNAFPLYGHNYDSVLRAIDKMEKDLPEFFYAGNHKGG
501 LSVGKAMASGCKAAELVTSYLDHSIYVKMDEKTA
    
```

Figura 6: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno oxidasa mitocondrial de *Amaranthus tuberculatus* (n.º de referencia DQ386117) (SEQ ID NO: 6)

```

1 ATGGTAATTC AATCCATTAC CCACCTTTC CAAAACCTTG CATTGCCATC GCCATTGTCA
    
```

```

61  GTTTCACCCA AGAACTACCC AGTAGCTGTA ATGGGCAACA TTTCTGAGCG GGAAGAACCC
121  ACTTCTGCTA AAAGGGTTGC TGTGTGTGGT GCTGGAGTTA GTGGACTTGC TGCTGCATAT
181  AAGCTAAAT CCCATGGTTT GAGTGTGACA TTCTTTGAAG CTGATTCTAG AGCTGGAGGC
241  AAACCTAAAA CTGTTAAAAA AGATGGTTT ATTTCGGATG ACGGGCCAAA TACTATGACA
301  GAAAGTGGG CAGAGGCTC GAGTTTGATC GATGATCTTG GGCTTCGTGA GAAGCAACAG
361  TTGCCAATTT CACAAAATAA AAGATACATA GCTAGAGCCG GTCTTCCTGT GCTACTACCT
421  TCAAATCCC CTGCACTACT CACGAGCAAT ATCCTTTCAG CAAAATCAA GCTGCAAATF
481  ATGTTGGAAC CATTTCTCTG GAGAAAACAC AATGCTACTG AACTTTCTGA TGAGCATCTT
541  CAGGAAACCG TTGCTGAATT TTTTGAGCGA CATTTTGGGA AAGAGTTTGT TGATTATGTT
601  ATTGACCCTT TTGTTGCGGG TACATGTGGT GGAGATCCCT AATCGCTTTC CATGCACCAT
661  ACATTTCCAG AAGTATGGAA TATTGAAAAA AGCTTTGGCT CTGTCTTTCC CCGACTAATF
721  CAATCAACAT TGTATCTAA GAAGGAAAAG GGTGGAGAAA ATGCTTCTAT TAAGAAGCCT
781  CGTGTACGTC GTTCATTTTC APTTCAAGGT GGAATGCAGA CACTTGTGTA CACAATGTGC
841  AAACAGCTTG GTGAAGATGA ACTCAAATC CACTGTGAGG TGCTGTCCTT GTCATATAAC
901  CAGAAGGGGA TCCCTCCTACT AGGGAATTGG TCAGTCTCTT CTATGTCAA TAATACCAGT
961  GAGATCAAT CTATGATGC TGTGGTTGTC ACTGTCCAA TTCGCAATGT CAAAGTAAIG
1021  AAGATTATGA AATTTGGAAA TCCATTTTCA CTTGACTTTA TTCCAGAGGT GACGTACGTA
1081  CCCCTTTCG TTATGATTAC TGCATTCAAA AAGGATAAAG TGAAGAGACC TCTTGAGGGC
1141  TTCCGAGTTC TTATCCCTCC TAAAGAGCAA CATAATGGAC TGAAGACTCT TGGTACTTTA
1201  TTTTCTCTCA TGATCTTCC TGCATCTGCT CCATCTGACA TGTGTCTCTT TACTACATF
1261  GTCCGAGGAA GCAGAAATAG AAAACTTGCA AACCTTCAA CCGATGAATF GAACCAATA
1321  GTTCTCTCTG ACCTTTCAGCA GCTGTGGGGC ACIGAGGAGC AACCTTCATF TGTCAATCAT
1381  CTCTTTTGGG GCAACGCATF CCCATTTGAT GGACACAATF ACGATCTGTF TTTGAGAGCC
1441  ATAGACAAGA TGGAAAAGGA TCTTCTTGGG TTTTTTTATG CAGGTAACCA TAAGGGTGGG
1501  CTTTCAGTGC GAAAAGCGAT GGCTCCGGT TGAAGGCTG CGGAACCTGT AATATCCTAT
1561  CTGGACTCTC ATATATACGT GAAGATGGAT GAGAAGACC CGTAA

```

Figura 7: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Solanum tuberosum* (n.º de referencia AJ225107) (SEQ ID NO: 7)

```

1  MTTAVANHPSIFTHRSPLPSPSSSSSSPSFELNRTNFTPYFSTSKRNS
51  VNCNCWRTRCSVAKDYTVPPSEVDGNQFPELDCVVVGAGISGLCIKVIS
101  ANYPNLMTVEARDRAGGNITTVBERDGYLWEECPNSFQPSDPMITMAVDCG
151  LKDDLVLGHPDAPRFVWLKDKLRPVFGKLTDLFFDLMSEIPGKLRAGFGA
201  ICLRPSPPGYEESVEQFVRRNLGAEVFERLEFPFCSCVYAGDPSKLINKA
251  AFQKVVWKLQGTGSIITGGTTKALKRRSENPKEPRDPRLPIPKGQFVGSFR
301  KGLRMLPDAICERLGSKVKLSWKLSSITKSEKGGYLLTYETPEGVVSLSR
351  RSIIVMTVPSYVASNHLRPLSVAAADALSSFYVPPVAAYTISYPQEAIRDE
401  RLVDGELKGFQQLHRSQGVETLGTIYSSSLFPNRPNGEVLLLNYIGGA
451  TNETIVSKTESQLVEAVDRDLRKLMIKPKAQDPFVTGVRVWPQAIPOFLV
501  GHLDTLSTAKTALSNDGLDGLFLGGNYVSGVALGRCEVGEYETASEVTGF
551  LSQYAYK

```

Figura 8: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Solanum tuberosum* (n.º de referencia AJ225107) (SEQ ID NO: 8)

```

ATGACAACAACGGCCGTCGCCAACCAATCTTAGCATTTCCTACTCAACGGTCCGCCGCTGCCGTCGCCGCTGCTCTCTCT
CATCCGCGTCATTTTATTTTTAAACCGTACGAATTTTCATCTCTACTTETCCACCTCCAAGCCCAATAGTGTCAATTG
CAATGCCCTGGAHAACACGATGTTCCGTTGCCAAGGATFATAACAGTTCCTTCCCTCGKAAGTGGACGCTAATCAGTTCCCG
GAGCTGCATTGTGTGGTAGTTCGAGCAGGAATTAGTGGACTCTGCATTTGCTAAGGTGATTTCCGCTAATTTATCCCAAT
TCATGGTGCAGGAGGCGAGGGATCCTCCCGTGGAAACATAACGACCGTGGAAAGAGATGGAIAUTTATGGGAAGAAGG
TCCTAACAGTTTCCAGCCTTCGGATCCTATGTTGACAAATGGCTGTAGATTTGTGGATTGAAGGATGATTTGGTGTGGGA
GATCCTCATGCGCTCCTTTGTCTGTGGAAGGATAAACAAGCCCTGTTCCCGGCAAGCTCACTGATCTTCCCTTCT
TTGATTTGATGAGTATCCCTGGCAAGCTCAGAGCTGGTTTTGTTGCCATTTGGCTTGGCCCTTCCCTCCAGGTTATGA
GGAATCAGTTGAGCAGTTCCTGCGTCTTAATCTTGTCTGCAGAAGTCTTTGACCTTTGATGAAACATTTTGTCTCTGCT
GTTTACCGCGGTGACCCCTCAAATTTGATATGAAAGCAGCATTTGGGAAAGTGTGGAAGCTAGAACAAACTTCTGGTA
GCATTTATTTGCGGAACTTTAAAGCAATTAAGGABAGATCCAGTAAACCTTAAACCGCTCCGTGATCCGCTTTACCAAC
ACCAAAGGACAAACTGTTGGATCATTTAGGAAGGCTCTGAGATCTGCCCCATGCAATTTGTGAAGACTGGGAAGC
AAAGTAAAACATCATGGAAGCTTTCTAGCATTACAAAGTCAAAAAGSAGGATATCTCTTGCATACAGACACACCAG

```

AAGGAGTAGTTCCTCTGCCAAGCTCGAAGCATTTGTCATGACTGTTCCATCCATATGTAGCAAGCAACATATACGCCCTCT
 TTCGGTCGCTGCAGCAGATGCACTTTCAAGTTTCTACTATCCCCAGTAGCAGCAGTGACAATTTTCATATCCTCAAGAG
 GCTATTTCGTGATGAGCGTCTGGTTGATGGTGAACATAAGGGATTTGGGCAGTTGCATCCACGTTCCACAGGGAGTGGAAA
 CACTAGGAACAATATATAGTTCATCACTCTTTCCCTAACCCGCTCCAAATGCCCGGTTGCTACTCTTGAACATACATTGG
 AGGAGCAACAATACTGAAATTTGTGTCTAAGACGGAGAGCCAACTTTGTGGAAGCAGTTGACCGTGACCTCAGAAAAATG
 CTTATAAAACCCAAAGCACAGATCCCTTTGTTACGGGTGTGGAGTATGGCCACAAGCTATCCACAGTTTTGGTTCG
 GACATCTGGATACACTAGCTACTGCAAAAACCTGCTCTAAGTGTATAATGGGCTTGACGGGCTATTCTTTGGGGTAATTA
 TGTGTCTGGTGTAGCATTTGGGAAGGTGTCTTGAAGGTGCTTATGAAATAGCATCTGAGGTAACCTGGATTTCTGTCTCAG
 TATGCATACAAATGA

Figura 9: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX1 (SEQ ID NO: 9)

1	MAPSAGEDKQ	NCPKRVAVIG	AGVSGLAAY	KLKIHGLDVT	VFEAEGRAGG
51	KLRSLSQDGL	IWDEGANMT	ESEGDVIFLL	DSLGLREKQO	FPLSQNKRYI
101	ARNGTPTLIP	SNPIDLIKSN	FLSTGSKLQM	LFEFLWKNK	KLTKVSDHE
151	SVSCFFQRHF	GKEVVDYLID	PFVAGTCGGD	PDSLSMHLF	PELWNLEKRF
201	GSVIVGAIRS	KLSPIKERKQ	GPPKTSVNKK	HQRGSFSLG	GMQTLTDAIC
251	NDLKEDELRL	NSRVLELSCS	CSGDSATDSW	SIFSASPHKR	QAEEDSFDV
301	IMTAPLCDVK	GMKIAKRGNP	FLLNFIPEVD	YVPLSVVIT	FKKESVKHPL
351	EGFVGLVPSE	EQKHGLKTLG	TLFSSMMFPD	RAPNNVLYT	TFVGGSRNRE
401	LAKASRTELK	EIVTSDLKQL	LGAEGEPTV	NHVCWSKAFP	LYGHNYDSVL
451	DAIDKMEKNL	PGLFYAGNHK	GGLSVGKALS	SGCNAADLVI	SYLEAVSTDT
501	KNHR				

Figura 10: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX1 (SEQ ID NO: 10)

1	ATGGCTCCAT	CTGCCGAGA	AGATAAACAA	AATTGTCCCA	AGAGAGTTGC	AGTCATTGGT
61	GCTGCCCTCA	CTGGACTTGC	TGCAGCATA	AAGTTGAAAA	TTCATGGCTT	GGATGTCA
121	GTATTCGAAG	CAGAAGGGAG	AGCTGGAGGG	AAGTTACGAA	GCCTGACTCA	AGATCGCCTA
181	ATATGGGATG	AAGGCGCAA	TACTATGACT	GAAAGTGAAG	GTGATGTCAC	ATTTTGGCTT
241	GATTCGCTTG	GACTCCGAGA	AAAACAACAA	TITCCACTTT	CACAGAACAA	GCGTACATP
301	GCAGAAATG	GTAATCTTAC	TCTGATACCT	TCAAATCCAA	TTGACCTCAT	CAAAAGCAAC
361	TTCTTTTCCA	CTGGATCAA	GCTTCAGATG	CTTTTCGAGC	CTCTTTTCTG	GAAGAATAAA
421	AAGCTTACAA	AGGTGTCTGA	CGAACACGAA	AGTGTGAGTG	GACTCTTCCA	GCGTCAATTT
481	GGAAAGGAGG	TTGTGACTA	TCTAATGAT	CCTTTTCTTG	CTGCAACCTG	TGTTGGTGT
541	CCTGACICGC	TTTCAATGCA	CCTTTCGTTT	CCAGAGTTGT	GGAAATTAGA	GAAAAGGTTT
601	GGCTCAGTCA	TAGTTGGGGC	AATTCGATCC	AAGTTATCAC	CTATAAAGGA	AAAGAAACAA
661	GGACCACCCA	AACTTCACT	AAATAACAAC	CACCAGCGGC	GGTCCCTTTC	ATTTTGGGC
721	GGAATGCAA	CACTTACTGA	CGCAATATCC	AATGATCTCA	AAGAAGATGA	ACTTAGGCTA
781	AACCTAGAG	TTCTGGAATT	ATCTGTAGC	TGTAGTGGGG	ACTGTGGCAC	AGATAGCTGG
841	TCAATTTTTT	CTGCCACACC	ACACAAGCGG	CAAGCAGAAG	AAGATTCATT	TGATGCTGTA
901	ATTATGACCG	CCCCTCTCTG	TGACGTTAAG	GGTATGAAGA	TTGCTAAGAG	AGGAAATCCA
961	TTTCTGCTCA	ACFTTATCC	TGACGTTGAT	TATGTACCAC	TATCTCTCTG	TATAACCACA
1021	TTTAAGAAGG	AGAGTGTAAA	GCATCCTCTT	GAGGGTTTTG	GAGTGCTTGT	ACCTTCCGAG
1081	GAGCAAAAAC	ATGCTCTGAA	GACATTAGGC	ACCCTCTCT	CTTCTATGAT	GTTTCCACAT
1141	CGTGCACCCA	ACAATCTCTA	TCTCTATACT	ACATTTGTTG	GTGGAAGCCG	AAATAGAGAA
1201	CTCGCGAAAG	CCTCGAGGAC	TGAGCTGAAA	GATATAGTAA	CTTCTGACCT	TAAGCAGTTG
1261	TTGGGTGCTG	AGGGAGAGCC	AACATATGTG	AATCATGTAT	GCTGGAGTAA	AGCATTTCCG
1321	TTGTACGGGC	ATAACTATGA	TTCACTCCTC	GATGCAATTG	ACAAAATGGA	GAAAATCTT
1381	CCTGGATTAT	TCTATGCAGG	TAACCACAAG	GGAGGATTGT	CAGTTGGCAA	AGCACTATCT
1441	TCTGGATGTA	ATGCAGCAGA	TCTTGTATA	TCATATCTTG	AAGCCGTTTC	AACGGACACC
1501	AAAAACCATA	GGTGAATCT	ATTCTCTCAT	GCAGCTTGCC	GTTCTTTGTT	CCACAAAATC
1561	GTTAACTTC	ATGACGAGGA	GCAACTTAA	CGTGCAGCCA	GTGACCCA	

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Zea mays* (n.º de referencia AF218052) (SEQ ID NO: 11)

1 MVAATATAMATAASPLENGTREPDLRLHRLGIVRCAAVAGGAARAPASTG

```

E1  ARLSALCVVVGGGISGLCTAQAALATRHGVCDVLVTEARARPCGNITTVVER
101  PEKGYLMEEGPNSFQPSDPVLTMAVDSGLKDDLVPDNPAPRFVWEGKL
151  RVPVSKPADLPPFDLMSI PGKLRAGLQALGIRPPPPGRRESVEEFVRRNL
201  GAIVFERLIEPFCQVYACDPSKLSKKAAPFKVWRLBETGCSITGCTIKT
251  IQHRKSKNRPKPDARLEPRFKGQTVASFRRKGLAMLENAITSSLGSKVKLSW
301  KLFSTIKSDDKQYVLEYETPEGVVSVQAKSVIMYI PSYVASNLRPLSSD
351  AADALSRYFYPPVAAYTVSYPKAIPKQCLIDGELQCFQLHPRSQGVET
401  LGTYSSSLDFNRPDGRVLLNYIGGATNTGIVSKTESLVEAVDRDLR
451  KMLINSTAVDPLVLGVRVWPAI PQPIVGHLDLLEAKAALDRGGYDGLF
501  LGGNYVAGVALCRQVEGAYESASQISDFLTKYAYK
    
```

Figura 12: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa de *Zea mays* (n.º de referencia AF218052) (SEQ ID NO: 12))

```

1  ATGGTCGCCG CCACAGCCAC CGCCATGGCC ACCGCTGCAT CGCCGCTACT CAACGGGACC
61  CGAATACCTG CGCGGCTCCG CCATCGAGGA CTCAGCGTGC GCTGCGCTGC TGTGGCGGGC
121  GCGCGCGCCG AGGCACCGGC ATCCACCGGC GCGCGGCTGT CGCGGACTC CGTTCGTGGT
181  GCGCGAGGCA TCAGTGGCCT CTCACCGCGC CAGGCGCTGG CCACCGGCA CGCGCTCGG
241  GACGTGCTTG TCACGGAGGC CGCGCGCCGC CCCGGCGCA ACATACCAC CGTTCGAGCG
301  CCCGAGCAAG CGTACCTCTG CGAGGAGGGT CCCAACAGT TCCACCCCTC CGACCCCGTT
361  CTCACCATGG CCGTGGACAG CGGACTGAAG GATGACTTGG TTTTGGGGA CCCAAACCGC
421  CCGCGTTTCG TGCTGTGGGA GGGGAAGCTG AGGCCCGTGC CATCCAAGCC CGCCGACTC
481  CCGTTCCTCG ATCTCATGAG CATCCAGGG AAGCTCAGGG CCGTCTAGG CGCGCTTGGC
541  ATCCGCGCGC CTCCTCCAGG CCGCAAGAG TCAGTGGAGG AGTTCGTGGC CGCAACCTC
601  GGTGCTGAGG TCTTTGAGCG CCTCATTCAG CTTTCTGCT CAGGTGTCTA TGCTGGTGT
661  CCTTCTAAGC TCAGCATGAA GGCTGCATTT GGGAAAGTTT GCGGTTGGA AGAACTGGA
721  GCTAGTATTA TTGGTGAAC CATCAAGACA ATTCAGGAGA GGAGCAAGAA TCCAAAACCA
781  CCGAGGGATG CCCGCTTCC GAAGCCAAAA GGGCAGACAG TTGCATCTTT CAGGAAGCGT
841  CTGCCCATGC TTCCAAATGC CATTACATCC AGCTTGGTA GTAAAGTCAA ACTATCATGG
901  AAACCTACGA GCATTACAAA ATCAGATGAC AAGGGATATG TTTGGAGTA TGAACCGCA
961  GAAGGGGTTG TTTGGTGA GGCATAAAGT GTTATCATGA CTACTCCATC ATATGTTGCT
1021  AGCAACATTT TGCGTCCACT TTCAAGCGAT GCTGCAGATG CTCATCAAG ATTCTATTAT
1081  CCACCGCTTG CTGCTGTAAC TCTTTCTAT CCAAAGGAA CAATTAGAAA AGAATGCTTA
1141  ATTGATGGG AACTCCAGG CTTTGGCCAG TTGCATCCAC GTAGTCAAG GTTTAGACA
1201  TTAGGAACAA TATACAGTTC CTCACTTTT CCAAATCGTG CTCCTGACGG TAGGGTGTTA
1261  CTTCTAAACT ACATAGGACC TGCTACAAAC ACAGGAATTG TTTCCAAGAC TGAAGCTGAG
1321  CTGGTGGAG CAGTTGACCG TGACCTCCGA AAAATGCTTA TAAATTTCTAC AGCAGTGGAC
1381  CCTTATGTC TTGGTGTTCG AGTTTGGCCA CAAGCATACT CTCAGTTCCT GGTAGGACAT
1441  CTTGATCTTC TGAAGCCGC AAAAGCTGCC CTGGACCGAG GTGGCTACGA TGGGCTGTT
1501  CTAGGAGGCA ACTATGTTGC AGGAGTTGCC CTGGGCAGAT GCGTTGAGCG CCCGTATGAA
1561  AGTCCCTCGC AAATATCTGA CTTCTTGACC AAGTATGCCT ACAAGTGA
    
```

Figura 13: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Zea mays* (n.º de referencia AF273767) (SEQ ID NO: 13)

```

1  MLALTASASSASSHPYRHASAHTRRPRLRAVLAMAGSDDPRAAPARSVAV
51  VGAGVSGLAAYRLRQSGVNVTVFEAADRAGGKIRTNSEGGFVWDEGANT
101  MTEGEWEASRLIDDLGLQDKQQYPNSQHKRYIVKDGAPALIPSDPISLMK
151  SSVLSTKSKIALFFPFLYKKANTRNSGKVSBEHLSESVGSFCEHFHGRE
201  VVDYFVDPFVAGTSAGDFESLSIRHAFPALWNLERKYGSVIVGAILSKLA
251  AKGDPVKTRHDSSGKRRNRVSPFHGGMQSLINALHNEVGDDNVKLGTE
301  VLSLACTFDGVPALGRWESI SVDSKDSGDKDLASNCTPDAVIMTAPLSNVR
351  RMKFTKGGAPVVDLFLPKMDYLP LSLMVTAFFKDDVKKPLEGFGVLI PYK
401  EQQKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPDDQYLYTTFVGGSHNRDLGAPTSIL
451  KQLVTSDLKLLGVGEGQPTFVKHVVWGNAPFLYGHYSSVLEAIEKMEKN
501  LPGFFYAGNSKDLAVGSVTIAGSKAADLAISYLESHTKHNNSH
    
```

Figura 14: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa de *Zea mays* (n.º de referencia AF273767) (SEQ ID NO: 14)

```

1 CTCTCCTACC TCCACCTCCA CGACAACAAG CAAATCCCCA TCCAGTTCOA AACCCTAACT
51 CAAATGCTCG CTTTGACTGC CTCAGCCTCA TCCGCTTCGT CCCATCCTTA TCGCCACGCC
121 TCCGCGCACA CTCGTGCCCC CCGCCTACGT GCGGTCTCTG CGATGGCGGG CTCCGACGAC
181 CCCCCTGCAG CGCCCGCCAG ATCGGTCTGC GTCTGTCGGG CCGGGGTGAG CCGGCTCGCG
241 GCGGCTTACA CGCTCAGACA GAGCGCGGTG AACGTAACGG TGTTCGAAGC GCGCGACAGG
301 GCGGGAGGAA AGATACGGAC CAATCCGAG GCGGGTTCG TCTGGGATCA ACGAOCCTAAC
361 ACCATGACAG AAGGTGAATG GGAGGCCAGT AGACTGATG ATGATCTTGG TCTACAAGAC
421 AAACAGCAGT ATCCTAACTC CCAACACAAG CGTACATTTG TCAAAGATGG AGCACCAGCA
481 CTGATTCCTT CGGATCCCAT TTCGCTAATG AAAAGCAGTG TTCTTTGAC AAATCAAAG
541 ATTGCTTAT TTTTGAACC ATTTCTCTAC AAGAAAGCTA ACACAAGAAA CTCTGGAAA
601 CTCTCTGAGG AGCACTTGAG TGAGAGTGT GGSAGCTTCT GTGAACGCCA CTTTGGGAAGA
661 GAAGTTGTTG ACTATTTTGT TGATCCATTT GTAGCTGAA CAACTCCAGC AGATCCAGAC
721 TCACATCTTA TTCGTCTATG ATTCCCAGCA TTGTGGAATT TGGAAAAGAAA GTATGGTTCA
781 GTTATTCCTG GTCCATCTT GTCTAAGCTA GCAGCTAAAG GTGATCCAGT AARGACAAGA
841 CATGATTCAT CAGGGAAAAG AAGGAATAGA CAGTGTCTT TTTTATTTC TGTGGGAATG
901 CAGTCACTAA TAAATGCACT TCACAATGAA GTTGGAGATG ATRATGTGAA GCTTGGTACA
961 CAAGTGTGT CATTTGGCATG TACATTTGAT GGAGTTCCTG CACTAGGCAG GTGGTCAATT
1021 TCTGTTGATG CGAAGGATAG CCGTGACAAG GACCTTGCTA GTRACCAAAC CTTTGTATGT
1081 GTTATAATGA CAGCTCCATT GTCAAATGTC CCGAGGATGA AGTTCACCAA AGCTCGAGCT
1141 CCGGTGTGTT TIGACTTTCT TCCTAAGATG GATTATCTAC CACTATCTCT CATGGTGACT
1201 GCTTTTAAGA ACGATGATGT CAAGAAACCT CTGGAAGGAT TTTGGGTTCT ARTACCTTAC
1261 AAGGAACAGC AAAAACATGG TCTGAAAACC CTTGGGACTC TCTTTTCTCT AATGATGCTC
1321 CCAGATCGAG CTCCTGATGA CCAATATTTA TATAACAACAT TTGTGGGGG TAGCCACAAT
1381 AGAGATCTTG CTGGAGCTCC AACGTCATTT CTGAAAACAAC TTGTGACCTC TGACCTTAA
1441 AAACCTCTGG CCGTAGAGGG GCAACCAACT TTTCTCAAGC ATGTATACTG GCCAAATGCT
1501 TTCTCTTTGT ATGCCCATGA TTATAGTTCT GTATTGGAAG CTATAGAAAA GATGGAGAAA
1561 AACCTTCCAG GGTCTCTCTA CGCAGGAAAT AGCAAGGATG GGCTTGCTGT TGGAAAGTGT
1621 ATAGCTTCAG GAAGCAAGCC TCCCTACCTT CCAATCTCAT ATCTTGAATC TCACACCAAG
1681 CATAATAATT CACATTGAAA GTGTCTGACC TATCTCTAG CAGTTGTCGA CAAATTTCTC
1741 CAGTTCATGT ACAGTAGAAA CCGATGCGTT GCAGTTTCAG AACATCTTCA CTTCTTCAGA
1801 TATTAACCCT TCGTTGAACA TCCACCAGAA AGGTAGTCAC ATGTGTAAGT GGGAAAATGA
1861 GGTAAAAAAC TATTATGGCG GCCGAAATGT TCCTTTTGT TTTCTCACA ACTGCGCTAC
1921 GACACTTGAT GTTGGAAATA CATTAAATT TGTGGAATG TTTGAGAACA CATGCGTGAC
1981 GTGTAATATT TGCCTATTGT GATTTAGCA GTAGTCTTGG CCAGATTATG CTTTACGCT
2041 TT

```

Figura 15: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Oryza sativa* (Os01g0286600 - n.º de referencia NM_001049312) (SEQ ID NO: 15)

```

1 MAAAAAMATATSATAAPPLRIRDAARRRRRHVRCVASGAAEAAPAF
51 GARVSADCVVVGGLISGLCTAQALATKHGVDVLTPEARARPGNITTAE
101 RAGEGYLWEEGPNSFQPSDPVLTMAVDSGLKDDLDFGDPNAPRFVWEGK
151 LRPVPSKPGDLFFDLMSIPGKLRAGLGALGVRAPFPGREESVEDFVRN
201 LGAEVFERLIEPFCSCVYAGDPSKLSMKAAPGKVRLEDITGGSIIGGPIK
251 TIQERGNPKPPRPRLPTPKQTVASFRKGLTMDAITSRLGSKVKLS
301 WKLTSITKSDNKGYALVYETPEGVVSVQAKTVVMTIPSYVASDILRPLSS
351 DAADALSIFYYPVAAVTVSYPKEATRKECLIDGELQGFQQLHPRSQVE
401 TLGTYSSSLFPNRPAGRVLLLNYYGGSTNTGIVSKTESSELVEAVDRDL
451 RKMLINPKAVDPLVLCVRVWPQAIPQFLIGHLDHLAAKSAQKGGVYDGL
501 FLGGNYVAGVALGRVVEGAYESASQISDYLTKEYAYK

```

Figura 16: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa de *Oryza sativa* (Os01g0286600 - n.º de referencia NM_001049312) (SEQ ID NO: 16)

```

1 ATCCACTCCCT CTCAGTCTC CCGCGCGTC CGCATCCCGC AGCCGCTCGT CAGCGACGGA
51 CATGGCCGCG GCCCGCCGAG CCATGGCCAC CGCCAUCPCG GCCACGGCAG CGCCGCGCT

```

```

121 CCGCATTGCG GACGCCGCGA GGAGGACCCG CCGACCGCGC CACCTTCGGT GCGCCGTGCG
181 CAGCCGCGCG GCCGAGGCGC CCGCGGCGCC CCGGGCGCGG GTGTCGGCGG ACTGCGTCGT
241 GGTGGGCGGC GGCATCAGCG GGCTCTGCAC CGCGCAGGCG CTGGCCACAA AGCACGGCGT
301 CCGCGACGTG CTCGTACCGG AGGCCCGCGC CCGCCCGCGC GGCAACATCA CCACCGCCGA
361 GCGCGCCGCG GAGGGCTACC TCTGGGAGGA GGGGCCCAAC AGCTTCCAGC CTTCGCAACC
421 CGTCCTCACC ATGGCCGTGG ACAGCGGGCT CAAGGACGAT CTCGTGTTCC GGGACCCCAA
481 CCGCGCGCGG TTCGTGCTGT GGGAGGGGAA GCTAAGGCG GTGCCCTCCA AGCCCGCGGA
541 CCTGCCGTTT TCGACCTCA TGAGCATCCC CCGCAAGCTC AGGGCCGGCC TTGGCGCGCT
601 CCGCGTTCGA GCGCCACCTC CAGGGCGTGA GGAGTCGGTG GAGGACTTCG TCGCGGCGAA
661 CCTCGCGCGG GAGGTCTTTG AGCGCCTCAT TGAGCCTTTC TGCTCAGGTG TGTATGCTGG
721 TGATCCTTCA AAGCTCAGTA TGAAGGCTGC ATTTGGGAAG GTGTGGAGGC TGGAGGATAC
781 TGGAGGTAGC ATTATGGTG GAACCATCAA AACAAATCCAG GAGAGGGGGA AAAACCCCAA
841 ACCGCGGAGG GATCCCGGCC TTCCAACGCC AAAGGGGCG ACAGTTGCAT CTTTCAGGAA
901 GGTCTGACT ATGCTCCCGG ATGCTATTAC ATCTAGGTTG GGTAGCAAAG TCAAACCTTC
961 ATGGAAGTTG ACAAGCATT AAGTCTAGA CAACAAAGGA TATGCATTAG TGTATGAAAC
1021 ACCAGAAGGG GTGCTCTCGG TCGAAGCTAA AACTGTGTTC ATGACCATCC CATCATATGT
1081 TGAGACTGAT ATCTTGCGCG CACTTTCAGG TGATGCAGCA GATGCTCTGT CAATATTCTA
1141 TTATCCACCA GTTCTGCTG TAACTGTTC ATATCCAAA GAAGCAATTA GAAAAGAATG
1201 CTTAATTGAC GGAGAGCTCC AGGGTTTCGG CCAGCTGCAT CCGCGTAGTC AGGGAGTTGA
1261 GACTTTAGGA ACAATATATA GCTCATCACT CTTTCCAAAT CGTCTCCAG CTGGAAGGGT
1321 GTTACTTCTG AACTACATAG GAGGTTCTAC AAATACAGGG ATTGTTTCCA AGACTGAAAG
1381 TGAGCTGGTA GAAGCAGTTG ACCGTGACCT CAGGAAGATG CTGATAAATC CTAAGCAGT
1441 GGACCTTTTG GTCTTGCGG TCCGGGTATG GCCACAAGCC ATACCACAGT TCCCTATTGG
1501 CCATCTTGAT CATCTTGAGG CTGCAAAATC TGCCCTGGGC AAAGGTGGTT ATGATGGATT
1561 GTTCTCGGA GGAACATATG TTGCAGGAGT TGCCCTGGGC CGATGCGTTG AAGGTGCATA
1621 TGAGACTGCC TCACAAATAT CTCACTACTT GACCAAGTAC GCCTACAAGT GATCAAAGTT
1681 GGCCTGCTCC TTTTGGCACA TAGATGTGAG GCTTCTAGCA GCAAAAATTT CATGCCATC
1741 TTTTATCCT GATCTAATT AGTTAGAATT TAGAATTGTA GAGGAATGTT CCATTTGCAG
1801 TTCATAATAG TTGTTAGAT TTCAGCCATT CAATTTGTGC AGCCATTTAC TATATGTAGT
1861 ATGATCTTGT AAGTACTACT AAGAACAAAT CAATTTATAT TTCCTGCG

```

Figura 17: Secuencia de aminoácidos de una protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial prevista de *Oryza sativa* (Os04g0490000 prevista) (SEQ ID NO: 17)

```

1 MLSPATTFSSSSSSSPSRAHARAPTRFAVAASARAARFRPARAMASDD
51 PRGGRSVAVVGAGVSGIAAAAYRLRKRGVQVTVFEADRAGGKIRTNSEGG
101 FIWDFCANTMTFSFLFASRLIDDIQLQKQYQYQNSQHKRYIVKDCAPTLLT
151 PSDPIALMKSTVLSLTKSKLKLFLFLEPFLYEKSSRRISGKVSDEHLSSESVAS
201 FFERHFKFVVDVYLIDPFVAGTSGGDPELSLIRHAFPALWNLENKYGCVI
251 AGAILSKLSTKGDVKTGGASPGKGRNKRVSFSFHGGMQSLTDALHNEVG
301 DGNVKLSTFVLSLACCCDGVSSSGOWSLSVDSKDAKGDRLRNQSFDAVI
351 MTAPLSNVQRMKFTKGGVPPVLDLFLPKVDYLP LSLMVTAFKKEDVKKPLE
401 GFGALIPYKEQCKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPNDQYLYTSFIGGSHNRD
451 LAGAPTAIILKQLVTSDLRKLGLVFGQPTFVKHVHWRNAFPLYGQNYDLVL
501 FAIARKMNNLPGFFYAGNNKDLGAVGNV IASGSKAADLVISYLESCTDQD
551 N

```

Figura 18: Secuencia nucleótida de una protoporfirinógeno IX oxidasa prevista de *Oryza sativa* (Os04g0490000 prevista) (SEQ ID NO: 18)

```

1 CGATCCGAAG GACGAACCCC GCACAAGACA ACAAGTAAAT CCCCATCCAT AGCTATCCAA
61 GAGCCCCAAA TCAGATCCTC TCTCTCCCA CCACCTTCTC CTCTCTCTCC TCCCTCCCTT
121 CCGCGTCGCG CGCCCACGCT CCGCTTCCA CCGCTTCGC GGTCCGAGCA TCCGCGCGCG
181 CCGCAGGCTT CCGCCCGCGG CCGCCATGG CCGCCCTCGA CGACCCCGC GCGCGGAGGT
241 CCGTCCCTCT CCGTGGCGCC CGCGTCAGTC GGCCTGGGCT GCGCTACAGG CCGAGGAGGC
301 CGCGCTTCTA GGTGACGGTG TTCGAGCGCG CCGACAGGCG CCGCGGGAAG ATACGCAACA
361 ACTCCGAGGG CCGGTTCAAT TCGGACGAG CCGCCACAC CATGACAGAG AGTGAATTGG
421 AGCCAGCGAG CATTATTGAC GATCTTGCC TACAAGGCAA ACACAGTAT CTTAATCTAC
481 AACACAAGCG TTACAATGTC AAGATGGAG CACCAACACT CATTCCTCCA CATCCCATGG

```

```

541 CGCTCAEGAA AAGCACTGTT CTTTCTACAA AATCAAAGCT CAAGCTATTT CTGGAACCAT
601 TTCTCTATGA GAAATCTAGC AGAAGGACCT CGGGAAAAGT GTCTGATGAA CATTTAAGTG
661 AGACTGTTGC AAGTTTCTTT GAACGCCACT TTGGAAAAGA GGTGTTGAT TATCTTATTG
721 ATCCATTTGT GGCTGGAACA AGCGGAGGAG ATCCTGAGTC ATTATCAATT COTCATGCAT
781 TTCCAGCATT ATGGAATTTG GAGAATAAGT ATGGCTCTGT CATTCGCTGGT GCCATCTGT
841 CCAAACATC CACTAAGGGT GATTCAGTGA AGACAGGAGG TGCTTCGCCA GGGAAAAGAA
901 GGAATAAACG TGTGTCATTT TCATTTCAATG GTGGAAATGCA GTCACATAA GATGCACTTC
961 ACAATGAAGT TGGAGATGGT AACGTGAAGC TTGGTACAGA ACTGTTGTCA TTGGCATGTT
1021 GCTGTGATGG AGTCTCTTCT TCTGGTGGTT GGTC AATTTT TGTGATTC A AAGATGCTA
1081 AAGGGAAGA TCTCAGAAAG AACCAATCTT TCGATGCTGT TATAATGACT GCTCCATTGT
1141 CTAATGTCCA GAGGATGAAG TTTACAAAAG CTGGASTTCC CTTTGTGCTA CACTTCTTC
1201 CTAAGGTCGA TTACTTACCA CTATCTCTCA TGGTAACAGC TTTTAAGAA G AAGATGTCA
1261 AAAAACCATT GGAAGGATTT GGTGCCCTGA TACCCTATAA GGAACAGCAA AAGCATGGTC
1321 TCAAAACCTT TGGGACCCTC TTCTCCTCGA TGATGTTTCC AGATCGAGCT CCTATATGATC
1381 AATATCTATA TACATCTTTC ATTTGGGGGA GCCATAATAG AGACCTCGCT GGGGCTCCAA
1441 CGCCTATTCT GAAACAACCT GTGACCTCTG ACCTAAGAAA GCTCTTGGGT GTTGAGGGAC
1501 AACCTACTTT TGTGAAGCAT GTACATGGA GAAATGCTTT TCTTTTATAT GGCCAGAATT
1561 ATGATCTGGT ACTGGAAGCT ATAGCAAAA TGGAGAACA TCTTCCAGGG TCTTTTACG
1621 CAGGAAATAA CAAGGATGGG TTGGTCTTG GAAATGTTAT AGCTTCAGGA AGCAAGGCTG
1681 CTGACCTTGT GATCTCTTAT CTTGAATCTT GCACAGATCA GGACAATTAG CATTTAAGCT
1741 ATCTGACCTT AAGCAATTT AGACAAATTT GCTCACTTTA TGTAATTTGA AAAGTTTAC
1801 ATGATTTCCA GTTTCATATT TTTCTCTTGC TATAGTATAT CCACTCATGT AAAGATGGGA
1861 ACATAGTCTT AAAAGACATT ATGGTCCCTT GAGATGCTCA TGTTTTTTTG AACAGTGATT
1921 CTTGACTTGT ACTATTTTTT GACAACCAA TAAATTTCTC AATGTTCCG AG

```

Figura 19: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Sorghum bicolor* (Sb03g011670 - n.º de referencia XM_002455439) (SEQ ID NO: 19)

```

1 MLSPATTFSSSSSSSSPSRAHARAPTRFAVAASARAARFRPARAMAASDD
51 MGGKRSVAVVVGAGVSGLAARYLKRKRGVQVTVFEADRAGGKIRTNSEGG
101 FLWDEGANTMTSELEASRLIDDLGLQGKQYQYVNSQHKRYIVKDGAPQLI
151 PSDPIALMKSTVLSTKSKLKLPLEPFLYKSSRRTSGKVSDEHLSSESVAS
201 FFERHFGKKEVDYLIIDPFVAGTSGGDPELSIRHAFPALWNLNENKYGSVI
251 AQAILSKLSTKGDVSKTGGASPGKGRNKRVSFSPHGGMQSLIDALHNEVG
301 DENVKLSTEVLSLACCCDGVSSSGGWSISVDSKDAKGLDRKNQSFDAVI
351 MTAPI.SNVQRMKFTKGGVPFVLDLFLPKVDYLPLESLMVTAFKKEEDVKKPLE
401 GFGALPYKEQQKHGLKTLGLTFSSMMFPDRAPNDQYLYTSFTGGSHNRD
451 LAGAPTAIILKQLVTSDLRKLKLCVEGQPTFVKVHVRNAPPLYGQNYDLVL
501 EAJAKMENNLPFFYAGNNKDGAVGNV IASGSKAADLVI SYLESCTDQD
551 N

```

Figura 20: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Sorghum bicolor* (Sb03g011670 - n.º de referencia XM_002455439) (SEQ ID NO: 20)

```

1 ATGGTCGCCG CCGCCGCCAT GGCCAACCGT GCATCCGGCG CCGCGCCGCT ACTCACGGG
61 ACCCGAAGGC CTGCGAGGCT CCGCCGTCGC GACTCCGCG TCGGCTGGCC CCTGTGGCC
121 GCGCGCGCGG CCGAGGCACC GGCCCTCCACC GCGCGCGCGC TGTCCGCGGA CTGCGTCTG
181 GTGGCGGGCG GGATCAGTGG CCTCTGLACC GCGCAGGGCG TCGCCACCGG GACCGGCGTC
241 GGGGAGGTGC TTGTCACGGA GGCCCGCGCC CGACCCGGCG GCAACATCAC CACCGTCGAG
301 CGCCCGGAGG AAGGGTACCT CTGGGAGGAG GCTCCCAACA GCTCCAGCC ATCCGACCC
361 GTTCTCTCCA TGGCCGTGGA CAGCGGCTG AACGATGAC TGGTCTTTGG GATCCCAAC
421 GCGCCGCGGT TCGTGTCTGT GAGGGGGAAG CTGAGGCGCG TGCCATCCAA GCCCGCGAC
481 CTCCCGTTCT TCGATCTCAT GAGCATCCCT GGCAAGCTCA GGGCCGCTCT CCGCGCGCTI
541 GGCATCCGCC CGCCTCCTCC AGGCCCGGAG GAGTCAGTGG ACGAGTGTGT GCGCCGCAAC
601 CTCGGTGTCT AGGTCTTTGA GCGCCTAAT GAGCCTTCT GCTCAGGTGT CTATGCTGGT
661 GATCCTTCCA AGCTCAGTAT GAAGCTTCCA TTTGGTAAG TGTGGCGGT AGAAGAASCT
721 GGAGGTAGTA TTATTGCTGG AACCATCAAG ACGATCAGG AGAGAGGAAA GATCCAAAA
781 CCACCGAGGG ATCCCGCCTT TCCGAAGCCA AAAGGGCAGA CAATTGCATC TTTCAGGAG
841 GGTCTTGCCA TGCTTCCAAA TGCCATCAAR TCCAGTTCG GTAGTAAAGT CAACCATCA

```

```

901 TGGAAACTCA CGAGCATTAC AAAATCAGAT GGCAAGGGGT ATGTTTTGGA GTATGAAACA
961 CCAGAAGGGC TTGTTTGGT GCAGGCTAAA AGTGTTATCA TGACCATCC ATCATATGTT
1021 GCTAGCGACA TTTTGCCTCC ACTTTCAGGT GATGCTGCAG ATGCTCTATC AAGATCTAT
1081 TATCCACCAG TTGCTGCTGT AACGGTTTCG TATCCAAAAGC AAGCAATTAG AAAAGAATGC
1141 TTAATFGATG GSGAACTCCA GGGTTTTGGC CAGTTGCATC CACGTAGTCA AGGAGTTGAG
1201 ACATTAGGAA CAATATACAG CTCATCACTC TTTCAAAATC GTGCTCCTGC TGGTAGGGTG
1261 TTACTTCTAA ACTACATAGG AGGTGCTACA AACACAGGAA TTGTTCCCAA GACTGAAAAGT
1321 GAGCTGGTAG AAGCAGTTGA CCGTGACCTC CGAAAATGC TTATAAATC TACAGCAGTG
1381 GACCCTTAG TCCTTGGTGT CCGAGTTTGG CCACAAGCCA TACCTCAGTT CCTGGTAGGA
1441 CATCTTGATC TTCTGGAGGT CGCAAAATCT GCCCTGGACC AAGGTGGCTA TGTGGGCTG
1501 TTCCTAGGAG GGAACATATC TGCAGGAGTT GCCCTGGGCA GATGCATTA GGGCGCATAT
1561 GAGAGTCCCG CACAAATATA TGACTTCTTG ACCAAGTATG CCTACAAGTG ATGGAAGAAG
1621 TGGAGCGCTG CTCTTAATC GTTATGTTGC ATAGATGAGG TGAGACCAGG AGTAGTAAAA
1681 GGCATTACGA GTATTTTTCA TTCTTATTTT GTAAATGCA CTCTGTTTT TTTTCTCTG
1741 CAGTAATTAG TTAGATTTTA GTTCTGTAGG AGATTGTTGT GTTCACTGCC CTGCAAAAAG
1801 ATTTTTATT TGCATTCCTT TATGAGAGCT GTGCAGACTT ATGTAACGTT TFACTGTAAG
1861 TATCAACAAA ATCAGATACT ATTCGCAAG AGCTAACAGA ATGTGCAACT GAGATTCCCT
1921 TG

```

Figura 21: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Sorghum bicolor* (Sb06g020950 - n.º de referencia XM_002446665) (SEQ ID NO: 21)

```

1 MLARTATVSSSTSSSHSPYRPTSARSLRLRPVLMAGSDDSRAPARSVAV
51 VGAGVSLVAAYRLRKSQVNVVFEAADRAGGKIRTNSEGGFLWDEGANT
101 MTEGELEASRLIDDLGLQDKQQYPNSQHKRYIVKDGAPALIPSDPISLMK
151 SSVLSTKSKIALFFEPFLYKKANTRNPGKVSDEHLSSEVGSFFERHFGRE
201 VVDYLIDPFVAGTSAGDPESLSICHAFPALWNLERKYGSVVVVGAILSKLT
251 AKGDVPKTRRDSAKRRNRVVSFPHGGMQSLINALHNEVGDDNVKLGTE
301 VLSLACTLDGAPAPGGWSISDDSKDASGKDLAKNQTFDAVIMTAPLSNVQ
351 RMKFTKSGAPFVLDPLPKVDYLPKSLMVTAFKKEDVKKPLEGFGVLIPIYK
401 EQQKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPDDQYLYTTFVGGSHNRDLGAPTSIL
451 KQLVTSDLKLLGVQGGQPTFVKHIYWGNAFPLYGHYNSVLEAIEKMEKN
501 LPGFFYAGNNKGLAVGSVIASGSKAADLAISYLESHTKHNHLH

```

Figura 22: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Sorghum bicolor* (Sb06g020950 - n.º de referencia XM_002446665) (SEQ ID NO: 22)

```

1 ATGCTCGCTC GGAAGTCCAC GGTCTCCTCC ACTTCGTCCC ACTCCCATCC TTATCGCCCC
61 ACCTCCGCTC GCAGTCTCCG CCTACGTCGG CTCCTCGCGA TGGCGGGCTC CGACGACTCC
121 CGCGCAGCTC CCGCCAGGTC GGTCCGCTGC CTCGGCGCCG GGGTCAGCGG GCTCGTGGCG
181 GCGTACAGGC TCAGGAAGAG CCGCCGTAAT GTGACGCTGT TCGAGGCGGC CGACAGGGCG
241 CGAGGAAGA TACGGACCA TTCCGAGGGC GGGTTTCTCT GGGATGAAGG AGCGAACACC
301 ATGACAGAAG GTGAATTGGA GGCAGTAGA CTGATAGATG ATCTCGGICT ACAAGACAAA
361 CAGCAGTATC CTAACCTCCA ACACAAGCGT TACATGTCA AACATGGAGC ACCAGCACTG
421 ATTCCITCGG ATCCCATTTT GCTGATGAAA AGCAGTGTTC TTTCTACAAA ATCAAAGATT
481 CGCTTATTTT TTGAACCATT TCTCTACAAG AAAGCTAACA CAAGAAACCC TGGAAAAGTA
541 TCTGATGAGC ATTTGAGTGA GAGTGTGGG AGCTTCTTTG AACGCCACTT CCGAAGAGAA
601 GTTGTGACT ATCTTATTGA TCCATTGTGA GCTGGAACAA GTGACAGAGA TCCAGAGTCA
661 CTATCTATTT GTCATGCATT CCCAGCACTG TGGAAATTTG AAAGAAATA TGGTTCAGTT
721 GTTGTGGTG CCACTTGTG TAAGCTAACA GCTAAAGGTG ATCCAGTAAA GACAAGACGT
781 GATTCATCAG CGAAAAGAAG GAATAGACGC GTGTCGTTTT CATTTCATGG TCGAATCCAG
841 TCACAAATAA ATGCACTTCA CAATGAAGTT GGAGATGATA ATGTGAAGCT TGGTACAGAA
901 GIGTTGTCAT TGGCTGTAC ATTAGATGGA GCCCTGCAC CAGGCGGGTG GTCAATTTCT
961 GATGATTCGA AGGATGCTAG TGGCAAGGAC CTTGCTAAAA ACCAAACCTT TGTATGCTGT
1021 ATAATGACAG CTCATTTGTC AAATGTCAG AGGATGAAGT TCACAAAAGG TGGAGCTCCT
1081 TTTCTCTAG ACTTCTTCC TAAGGTGGAT TATCTACCAC TATCTCTCAT GGTGACTGCT
1141 TTTAAGAAGC AAGATGTCAA GAAACCTCTG GAAGGATTTG CCTCTTAAT ACCCTACAAG
1201 GAACAGCAAA AACATGGTCT AAAAACCTTT GGGACTCTCT TCTCTCAAT GATGTTCCCA
1261 GATCGAGCTC CTGACGACCA ATATTTATAT ACAACATTTG TTGGGGGTAG CCACAATAGA

```

```

1321 GATCTTGCTG GAGCTCCAAC GTCTATTCTG AAACAACCTG TGACCTCTGA CCTTAAAAAA
1381 CTCTTAGGCG TACAGGGGCA ACCAACTTTT GTCAAGCATA TATACTGGGG AAATGCTTTT
1441 CCTTTCTATG GTCATGATTA CAATTCTGTA TTGGAAGCTA TAGAAAAGAT GGAGAAAANT
1501 CTTCCAGGST TCTTCTACGC AGGAAATAAC AAGGATGGGC TTGCTGTTCG CAGTGTATA
1561 GCTTCAGGAA GCAAGGCTGC TGACCTTGA ATCTCTGATC TTGAATCTCA CACCAAGCAT
1621 AATAATETAC ATTGA
    
```

Figura 23: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Ricinus communis* (Rc1343150 - n.º de referencia XM_002515127) (SEQ ID NO: 23)

```

1 MANLADEFSLFLRSTPSLVPSYPKTFINKRLKQLKRCSTPEQSTTTTISPGG
51 NSQSEADCVIVCGGTSGLCIAQALSTRKIRDIAFNVIIVTEARDRVOGNITP
101 IERDGYLWEEGFNSFQSPDMLTMVVDSSGLKDDLVLDGDPNAPRFVLWNGK
151 LRPVPSKPTDLPPFDLMSFGGKLRAGFGALGLRFPFPPGFESVVEEFVRRN
201 LQDEVFERLIEFFCSGVYAGDPSKLSMKAAFQKVVWLEQIGGSVIGSTFK
251 TTQERNKIPEPRDPRLPTEPKGQTVGSFRKGLMLPDAIAKRLGSNVKLS
301 WKLSSITKLENGCYSLTFETPDGVSLSLQTKSVVMVPSHTASSFLHPLSA
351 AADALSKPYYPVAAVSVYPKDAIRAELIDGELKGFQQLHPRSQQVE
401 TLGTIYSSSLFENRAPAGRILLNLYIGGATNFGILSKTEPELVEAVDRDL
451 RKMLIKPNAKDPFVLGVRVWPQAIPQFLVGHLDILDSAKGALGDAGLEGL
501 PLGGNYVSCVALGRVCGAYEVAAEVITWFLSQNAYK
    
```

Figura 24: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Ricinus communis* (Rc1343150 - n.º de referencia XM_002515127)(SEQ ID NO: 24)

```

1 CACCACCTGA GTTACAGAAG AGTCATCCGG TGTGATTGCC TCTCGAATTC GAATTCTGCC
61 ATGGCCAATC TCGCAGACTT CTCTCTTTT CTCCGGTCAA CACCCTCCCT TGTCCCTCC
121 TATCCGAAAA CCACAATCAA CAGAACGTTA AAACCTCAA TCCGGTGCTC AATCACAGAG
181 CAATGACTA CTACAATTC CCCTGGCGGA AATTCCTCAAT CACCAGCGGA TTGCGTGATT
241 GTAGGAGCGG GAATTAGCGG CCTATGCATC CCCCAGGCTC TCTCTACCAA GCACCGTGAT
301 ATAGCTACCA ATGTGATTGT CACTGAGGCC AGAGACCGCG TTGGTGGCAA CATCACAAAC
361 ATCGAAAGAG ACGGTTATCT TTGGGAAGAG GGCCCCAATA GTTCCAGCC CTCCTGCTCT
421 ATGCTAACCA TGGTGGTGA TAGTGGGTTA AAAGATGATF TAGTTTGGG AGATCCTAAT
481 GCGCCTCGTT TTGTGCTCTG GAATGGGAAA TTGAGACCAG TTCCGTCAA GCCTACTGAC
541 TTGCCCTTTT TTGACTTGAT GAGCTTTGGT GGGAAAATTA GAGCTGGATT TGGTGTCTCT
601 GGACTTCGAC CTCCACCACC AGGACATGAG GAGTCAGTTG AAGAGTTTGT CCGGCGTAAT
661 CTGGTGATG AAGTTTTTGA GCGTCTAATC CAGCCCTPTT GTTCACCTCT TTATCCAGGT
721 GATCCCTCAA AACTAAGCAT GAAAGCAGCA TTTGGAAAAG TTTGGAAGCT AGGACAAATF
781 GGTGCCAGTG TCATTGGCGG CACTTTCAA ACAATTCAGG AGAGAAATAA GATACCCAAG
841 CCTCCTCGAG ACCCGCGCTT ACCAACACCG AAGGGTCAA CAGTAGGATC TTTTAGAAAG
901 GGACTTATCA TGTTGCCTGA TCGGATTGCC AAAAGGTTGG GTAGCAATGT TAAATGTCT
961 TGAAGCTTT CAAGTATPAC TAAATGGAA AATGGAGGGT ATAGTCTAAC ATTTGAAACA
1021 CCTGATGGGT CAGTTTCGCT GCAAACGAAA AGTGTGTAA TGACAGTCC ATCCACATT
1081 GCAAGCAGCT TCTTACATCC TCTTCTGCT GCTGCTGCTG ACGCCCTATC AAAATTTTAT
1141 TACCCGCCAG TTGCAGCAGT GTCAGTTTCA TACCCAAAAG ATGCAATTCC GGCAGAATGC
1201 TTAATAGATG GTGAGCTTAA GGGGTTCCGC CAGTTGCATC CACGGAGCCA AGGGGTAGAA
1261 ACATTAGGAA CTATATACAG CTCTCACTT TTTCCCAATC GTGCACCAGC AGGAAGGATT
1321 TTGCTCTTGA ACTACATPAG AGGGGCGACC AATCCTGGGA TTTGTCCAA GACGAAACT
1381 GAACCTGTAG AGGCAGTTGA CCGTGATTG AGGAAGATGC TCATAAAACC CAATGCCAAG
1441 GATCCATPAG TTCTAGGTGT GCGAGTGTGG CCCCAGCCA TTCCACAATT CTTGCTTCT
1501 CATTTAGATA TCCTAGATAG TGCAAAAGGT GCTCTGGGAG ATGCAGGCTT GGAAGGGCTG
1561 TTTCTGGGG GCAACTATGT ATCAGGCGTT GCTTGGGCC GATGTGTGA AGGAGCATAT
1621 GAAGTTGCAG CAGAGGTGAC CAATTTCTC TCGCAGAATG CTTATAAATG A
    
```

Figura 25: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Ricinus communis* (Rc1678480 - n.º de referencia XM_002509502) (SEQ ID NO: 25)

```

1 MCSVIREDRNPSHYKRVAVVVGACVSGLAAYKLSRGLKVIIVFEAEERAG
51 GKLRVSNHDLIWDGANTMTSEMEVKSLIGNLGIKREKQFPISQNKRY
    
```

```

101 IVRNGKPIILIFNPIALITGNILSAQSKFQIILEPFLWKKRESSETHNAY
151 TEEVSVEFFQRHFQKFEVVDYLIDPFVAGTSAGDPESLSVCHSFPFLWNLE
201 KRFGSIIAGVVQAKLSTRKRSQETKSSVKKKQQRGSFSFFQGMQTLTD
251 TLCKALARDELRLLESKVFELSYPNPKSAVENWSLSYAFKQAKHLQNSSY
301 DAVMTAPLCNVKEMKIKTNRNIFSLNPLPEVSYMFLSVVITTFKKDNVK
351 SPLEGFQVLVPSKEQQNGLKTLGLTLFSSMMFPDRAPNDLYLYTTFVGGSR
401 NKBELAKASTDDIKQIVTSDLRQLLGAEGEPTFVNHFYWSKAPPLYGRNYD
451 AVLEADTMEKDLFGFFYAGNIHKGGLSVGKATASGCKAADLVIISYLESSS
501 DDKMLKEGPHN
    
```

Figura 26: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Ricinus communis* (Rc1678480 - n.º de referencia XM_002509502) (SEQ ID NO: 26)

```

1 ATCTCTTCAG TTATCAAAGA AGACAGAAAC CCAAGTCATG TTAAGAAGAGT AGCTGTTGTA
61 GGTGCTGGGG TTAGTGGGCT TGCTGCAGCT TACAAACTGA AATCACATGG CTTGAAAGTT
121 ACAGTATTTG AAGCTGAAGA AAGAGCTGGA GGGAAAGCTCA CAACCGTTAA CCATGATGGT
181 TTAATTTGGG ATGAAGGTGC AAATACCATG ACTGAGAGTG AAATGGAGGT CAAAAGTTTA
241 ATTGGCAATC TTGGGATTCG TGAAAAGCAA CAATTTCCGA TTTCACAGAA CAAAAGGTAT
301 ATTGTAAGAA ATCGGAAGCC AATATTAATA CCCACAAATC CCATCCCACT GATCACCAGC
361 AACATTTCTCT CTGCACAGTC AAAGTTTCAA ATCATTCTGG AGCCATTTT CTGGAAGAAA
421 CGTCAATCTT CAGAAAACGCA CAATGCTTAT ACTGAGGAAA GTGTTGGTGA GTTTTCCAA
481 CGTCATTTTG GTAAAGAGCT TGTGATTAT CTTATTGACC CTTTGTTC GGGCACTAGT
541 GCTGGAGATC CTGAATCTCT TTCTGTATGC CATTTCTTTC CAGAGCTATG CAATCTOGAG
601 AAACGATTG GATCTATTAT AGCTGGGGTA GTTCAGGCAA AATTATCTAC CAAAAGAGGG
661 AAGACCCAAG AAACCAACC ATCATCCCTA AAGAAGAACC AGCACCGTGG TFCATTTCTT
721 TTTTGGTG GAATGCAGAC GCTAACTGAT ACATTGTGCA AAGCACTTCC GAAGGATGAG
781 CTTAGATTAC AATCAAAGGT CTTCTCTTTG TCTTACAATC CTGATTCTAA GTCAGCAGTA
841 GAGAATGGGT CACTTTCTTA TCCCTTTAAG GCGGCCAAGC ATTTGCAAAA CTCATCTTAT
901 GATGCTATTG TCATGACGGC ACCATTGTGC AATGTTAAAG AAATCAAGAT CACAAAAAAC
961 AGAAATATCT TTTCACTGAA TTTCTTCTCT GAGGTGAGTT ATATGCCCGCT ATCAGTTCTT
1021 ATTACCCTT TTAAGAAGCA TAATGTCAAG AGCCCCCTTG AAGGCTTTGG AGTTCTTGT
1081 CCTTCTAAGG AGCAACAGAA TGCTCTAAAA ACCCTTGCTA CACTCTTTTC CTCTATGATG
1141 TTCCAGATC GTGCACCCAA TGATCTGTAT CTCTATACAA CCTTTGTTGG AGGGAGTCGA
1201 AACAAAGAAC TCCCAAAAGC TTCAACGGAT GATCTGAAGC AGATTGTTAC CTCACACTT
1261 AGCAATTCG TAGGAGCAGA AGCGAGGCC ACATTTGTTA ATCATTCTA CTGGAGTAAA
1321 GCATTTCCAT TATATGGGAG GAACTATGAT GCAGTACTTG AAGCCATTGA TACGATCCAA
1381 AAGATCTTC CTGATCTCT CTATGCAGGT AACCACAAAG GTGCACTATC GGTGGCAAA
1441 GCAATAGCCT CTGGATGCAA AGCAGCTGAT CTTGTAATAT CCTATTGGA ATCTCTTCA
1501 GATGACAAGA TCCTGAAGGA AGGCCATCA AATTAG
    
```

Figura 27: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* (SEQ ID NO: 27)

```

MAPSAGEDKQNCPRKRVAVIGAGVSLAAAYKLIKIHGI.XVIVFVEAEGRAGCKLRSLSDGXIWDEGANTMTESECDVTFLL
LDSTGLREKQFPLSQNKRYLARNCTPTLIPSNPILDIKSNFLSTGSKLQMLFEPILLWKNXKLTKVSDHEHSVSGFFQR
HFGKEVVDYLIDPFVAGTCGGDPDLSMHLSPFELWNLEKRFQSVIVGAIRSKLSPIKEKKQGPVKTSVNNKRRQGSFS
FLGGMQTLTDAICKDLKEDELRLNSRVLELSCSCGSDAIDSWSLFSASPHKRQAEESFDVAVIMTAPLCDVKSMKIAK
RGNPFLLNFIPEVDYVPLSVVITTFKKEVVKHPLEGFVGLVPSXEQKHGLKTLGLTLFSSMMFPDRAPNNVLYTTFVGG
SRNRELAKASRTELKEIVTSDLRQLLGAEGEPTFVNHVCSKAPPLYGHNYDSVLDALDKMEKNLPLGFYAGNHKGLS
VGKALSSGCNAADLVISYLEAVSTDXKNHS
    
```

Figura 28: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* (n.º de referencia AJ225108) (SEQ ID NO: 28)

```

ATGGCTCCATCTCCCGGAGAAGATAAACAAAAATGTCCTCMAAGACRGTTCACGTCATPTGGTGTTCGCGTCACTGCACTTTC
TGGCAGCAATACAGSTTGAATAATYCATGGSTTGRAFGTCCACAGTATTYGAGCAGAGGGGAGACCTCGAGCCAACTTACG
AAGCCTGACTCAAGATCGSMTAATATGGGATGAAGGCGCAATACTATGACTGAAAGTGAAGGTGATGTACATTTTTCG
CTTGATTCGCTTGGACTCCGAGAAAARCAACAATTTCCACTTTACAGAACAAACCGCTACATTTGCCAGAAATGGYACTC
CTACTCTGATACCTTCAAATCCAATTGACCTGATCAAAAACAATTTTCTTTCCACTGGATCAAGCTTCAGATGCTTTT
    
```

CGAGCCACTTTTGTGGAAGAATAAWAAGCTTACAAAGGTGCTCOCAGAACACGAAAGTGTCACTGGATTCTTCCAGCGT
 CATPTTGGRAAGGAGGTGTTGACTATCTAATFGAYCCTTTGTTGCTGGAACATGTGGTGGTGTATCCTGACTCGCTTT
 CAATGCACCTTTCGTTCCAGAGTTGTGGAATTTAGAGAAAAGGPTTGCCTCAGTCATAGTTGGGGCAATTCGATCCAA
 GTTATCACCTATAAAGGAAAAGAAACAAGCGCCNCCAAAACCTTCAGTAAATAAGAAGCCCCAGCCGGGCTCCCTTTCA
 TTTTGGGCGGAATGCAAAACACTTACTGAGCGCAATATGCAAAAGATCTCAAAGAAGATGAACCTTAGGCTAAAACCTAGAG
 TTCTGGAATTTCTGTAGCTGTAGTGGGACTCTGCGATAGATAGCTGGTCAATTTTTCTGCTCACCACACAAGCG
 GCAAGCAGAAGAAGAAATCATTTGATGCTGTAATTTATGACGGCCCTCTCTGTGACGTTAAGAGTATGAAGATTGCTAAG
 AGAGGAAATCCATTTCTGCTCAACTTTATTCCTGAGSTYGATTATGTACCACATCTGTGTGTATAACCACATTTAAGA
 AQCACACTGTAAAGCATCCVCTTGAGGGPTTTGGAGTCTTGTACCCTCCSAGGAGCAAAAACATGGTCTGAAGACAYT
 AGGCACCTCTCTCTCTATGATGTTTCCAGATCGTGACCCCAACAATGTCTATCTCTAFACTACATTTGTTGGTGGG
 AGCCGAAATFAGAGAACTYGGGAAAGCCCTCGAAGACTGACTGAAAGAGATAGTAACTTCTGACCTTAAGCAGTCTCTCG
 GTGCTGAGGGAGAGCCAACATATGTGAATCATGTATGCTGGAGTAAAGCATTTCCGTTGTACGGGCATAACTATGATTC
 AGTMCTCGATGCAATFGACAAAATGGAGAAAATCTCTCTGGATTAATCTATGACAGTAAACACAAGGGAGGATGTCA
 GTTGGCAAAGCACATCTCTCTGGATGTAATGCAGCAGATCTTGTATATCAIATCTTGAAGCCGTTTCAACGGACWCCA
 AAAACCATAGCTGA

Figura 29: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.1 (SEQ ID NO: 29)

1	MAPSAGEDKQ	NCPKRVAVIG	AGVSGLAAAY	KLKIHGLDVT	VFEAEGRAGG
51	KLRSLSDQGI	TWDEGANMT	ESEGDTVFL	DSLGLREKQQ	FPLSQNKRYI
101	ARNGPTPLIP	SNPIDLIKSN	FLSTGSKLQM	LFEPLLWKNK	KLTKVSDHEE
151	SVSGFFQRHF	GKEVVVDYLID	PFVAGTCGGD	PDSLMSHLSF	PELWNLEKRF
201	GSVIVGAI RS	KLSPIKEKKQ	GPPKTSVNK	RQRGSF SFLG	GMQTLFDAIC
251	NDLKEDELRL	NSRYLELSCS	CSGDSATDSW	SIFSASPHKR	QAEEDSFDVA
301	IMTAPLCDVK	GMKIAKRGNP	FLNFIPEVD	YVPLSVVIT	FKKESVKHPL
351	EGFGLVLPSE	EQKHGLKTLG	TLFSSMMFPD	RAPNNVLYT	TFVCGSRNRE
401	LAKASRTELK	EIVTSDLKQL	LGAEGETYV	NHVCWSKAFP	LYGHNYDSVL
451	DAIDKMEKNL	PGLFYAGNHK	GGLSVGKALS	SGCNAADLVI	SYLEAVSTDT
501	KNHR				

Figura 30: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.1 (SEQ ID NO: 30)

1	ATGGCTCCAT	CTGCCGGACA	ACATAAACAA	AAATTGTCCA	AGAGAGTGC	AGTCATGGT
61	GCTGGCGTCA	GTGGACTTGC	TGCAGCATA	AAGTTGAAAA	TTCATGGCTT	GGATGTACA
121	GTATTCGAAG	CAGAAGGGAG	ACCTGGAGGG	AAGTTACGAA	GCCTGAGTCA	AGATGGCCTA
181	ATATGGGATG	AAGGCGCAA	TACTATGACT	GAAAGTGAAG	GTGATGTAC	ATTTTGTCTT
241	GATTCGCITG	GACTCCGAGA	AAAACAACAA	TTTCCACTTT	CACAGAACAA	CCGCTACATT
301	GCCAGAAATG	GTACTCCTAC	TCTGATACCT	TCAAATCCAA	TTGACCTGAT	CAAAGCAAT
361	TTTCTTTCCA	CTGGATCAAA	GCTTCAGATG	CTTTTCGAGC	CACCTTTCTG	GAAGAATAAA
421	AAGCTTACAA	AGGTGTCTGA	CGAACACGAA	AGTGTCACTG	GATTCTTCCA	GCCTCATTTT
481	GGAAAGGAGG	TTGTTGACTA	TCTAATTGAT	CCTTTTGTG	CTGGAACATG	TGGTGGTGTAT
541	CCTGACTCGC	TTTCAATGCA	CCTTTCTGTT	CCAGAGTTGT	GGAATTTAGA	GAAGAGGTTT
601	CGCTCAGTCA	TAGTTGGGGC	AATTCGATCC	AAGTTATCAC	CTATAAAGGA	AAAGAAACAA
661	CGACCACCCA	AAACTTCAGT	AAATAAGAAG	CGCCAGCGGG	GGTCTCTTTC	ATTTTGGGC
721	GGAAATGCAA	CACTTACTGA	CGCAATATGC	AAATGATCTCA	AAGAAGATGA	ACTTAGGCTA
781	AACTCTAGAG	TTCTGGAATT	ATCTTGTAGC	TGTAGTGGGG	ACTCTGCAC	AGATAGCTGG
841	TCAATTTTFT	CTGCCCTCAC	ACACAAGCGG	CAAGCAGAAG	AAGATTCATT	TGATGCTGTA
901	ATTATGACGG	CCCTCTCTG	TGACGTTAAG	GGTATGAAGA	TGCTAAGAG	AGGAAATCCA
961	TTTCTGTCTA	ACTTTATTCC	TGAGGTTGAT	TATGTACCAC	TATCTGTTGT	TATAACCACA
1021	TTTAAGAAGG	AGAGTGTAAA	GCATCCTCTT	GAGGGTTTGG	GAGTGTCTGT	ACCTCCGAG
1081	GAGCAAAAAC	ATGCTCTGAA	GACATTAGGC	ACCCTCTTCT	CTTCTATGAT	GTTTCCAGAT
1141	CGTGCACCCA	ACAAATGTCTA	TCTCTATACT	ACATTTGTTG	GTGGAAGCCG	AAATAGAGAA
1201	CTCGCGAAG	CCTCGAGGAC	TGAGCTGAAA	GAGATAGTAA	CTTCTGACCT	TAAGCAGTTG
1261	TTGGGTGCTG	AGGGAGAGCC	AACATATGTT	AATCATGTAT	GCTGGAGTAA	AGCATTTCCG
1321	TTGTACGGCC	ATAACTATGA	TTCACTCTTC	GATGCAATTG	ACAAAATGGA	GAAAAATCTT
1381	CCTGGATTAT	TCTATGCAGG	TAACCACAAG	GGAGGATTGT	CAGTTGGCAA	ACCACTATCT
1441	TCTGGATGTA	ATGCAGCAGA	TCTTGTATATA	TCATATCTTG	AAGCCGTTTC	AACGGACACC

1501 AAAAACCATA GGTGAAATCT ATTCTCTCAT GCAGCTTGCC GTTCTTTGTT CCACAAAATC
 1561 GTTTAACTTC ATGACGAGGA GCAACTTTAA CGTGCAGCCA GTGACGCA

Figura 31: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.2 (SEQ ID NO: 31)

1 MAPSAGEDKQ NCPKRVAVIG AQVSGLAAY KLKIHGLDVT VFEAEGRAGG
 51 KLRSLSQDGL IWDGANTMT ESEGDVTFLL DSLGLREKQQ FPLSQNKRFI
 101 ARNGTPTLIP SNPIDLKSN FLSTGSKLQM LFEPLLWKNK KLTKVSDEHE
 151 SVSGFPQRHF GKEVVVDYLID PFVAGTCGGD PDSLSMHLSF PELWNLEKRF
 201 GSVIVGATRS KLSPIKEKKQ GPPKTSENKK RQRGSFSLG GMQTLTDAIC
 251 NDLKEDELRL NSRVLELSCS CSGDSATDSW SIFSASPHKR QAEEDSFDAV
 301 IMTAPLCDVK GMKIAKRGNP FLLNFIPEVD YVPLSVVITF FKKESVKHPL
 351 EGFVVLVPS E QKHGLKTLG TLFSSMMFPD RAPNNVLYT TFVCGSRNRE
 401 LAKASRTELK EIVTSDLKQL LGAEGETYV NHVCWSKAPF LYGHNYDSVL
 451 DAIDRMEKNL PGLFYAGNHK GGLSVGKALS SCNAADLVI SYLEAVSTDT
 501 KNHR

Figura 32: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Solanum tuberosum* StmPPX2.2 (SEQ ID NO: 32)

1 ATGGCTCCAT CTGCCGGAGA AGATAAACAA AATTGTCCCA AGAGAGTTGC AGTCATTGGT
 61 GCTGGCGTCA GTGGACTTGC TGCAGCATA AAGTTGAAA TTCATGGCTT GGATGTACA
 121 GTATTCGAAC CAGAAGCGAG AGCTGCAGG AAGTTACGA GCCTGAGTCA AGATGGCCTA
 181 ATATGGGATG AAGCGGCAAA TACTATGACT GAAAGTGAAG GTGATGTAC ATTTTTGCTT
 241 GATTCGCTTG GACTCCGAGA AAAACAACAA TTTCCACTTT CACAGAACAA CGGCTTCATT
 301 GCCAGAAATC GTACTCCTAC TCTGATACCT TCAAATCCAA TTGACCTGAT CAAAAGCAAT
 361 TTTCTTTCCA CTGGATCAA CCTTCAGATG CTTTTCGAGC CACTTTTGTG GAAGAAATAA
 421 AAGCTTACAA AGGTGCTTGA CGAACACGAA AGTGTCACTG GATCTTCCA CGCTCATTTT
 481 GGAAAGGAGG TTGTTGACTA TCTAATGAT CTTTTTGTG CTGGAACATG TGGTGGTGTG
 541 CCTGACTCGC TTTCAATGCA CCTTTCGITT CCAGAGTTGT GGAATTTAGA GAAAAGGTTT
 601 GGCTCAGTCA TAGTTGGGGC AATTCGATCC AAGTTATCAC CTATAAAGGA AAAGAACA
 661 GGACCACCCA AAACCTCAGA AAATAAGAAG CGCCAGCGGG GGTCTTTTGT ATTTTTGGGC
 721 GGAATGCAAA CACTTACTCA CGCAATATGC AATGATCTCA AAGAAGATGA ACTTAGGCTA
 781 AACTCTAGAG TTCTGGAATT ATCTTGTAGC TGTAGTGGG ACCTCTCCGAC AGATAGCTGG
 841 TCAATTTTTT CTGCCTCACC ACACAAGCGG CAAGCAGAAG AAGATTCAAT TGATGCTGTA
 901 APTATGACCG CCCCTCTCTG TGACGTTAAG GGTATGAAGA TTGCTAAGAG AGGAAATCCA
 961 TTTCTGCTCA ACTTTATTC TGAGGTTGAT TATGTACCAC TATCTGTTGT TATAACCACA
 1021 TPIAAGAAGG AGAGTGTAAA GCATCCCTCT GAGGGTTTTG GAGTGCCTGT ACCTTCGGAG
 1081 GAGCAAAAAC ATGGTCTGAA GACATTAGGC ACCCTCTCT CTCTATGAT GTTTCAGAT
 1141 CGTGCACCCA ACAATGCTA TCTCTATACT ACATTTGTTG GTGGAAGCCG AAATAGAGAA
 1201 CTCGCGAAAG CCTCGAGGAC TGAGCTGAAA GAGATAGTAA CTCTGACCT TAAGCAGTTG
 1261 TTGCGTGTG AGGGAGAGCC AACATATGTG AATCATGTAT GCTGCAGTAA AGCATTTCCG
 1321 TTGTACGGGC ATAACATGA TTCAGTCTC CATGCAATTG ACAAATGGA GAAAATCTT
 1381 CCTGGATTAT TCTATGCAG TAACCACAAG CGAGGATTGT CACTTGGCAA AGCCTATCT
 1441 TCTGGATGTA ATGCAGCAGA TCTTGTATA TCATATCTTG AAGCCGTTT AACCAGACCC
 1501 AAAAACCATA GGTGAAATCT ATTCTCTCAT GCAGCTTGCC GTTCTTTGTT CCACAAAATC
 1561 GTTTAACTTC ATGACGAGGA GCAACTTTAA CGTGCAGCCA GTGACGCA

Figura 33: Secuencia de aminoácidos de contiguos para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX1 (SEQ ID NO: 33)

1 MDLSLLRQPF FLSPPSNFFF RSRPYKPLNL RCSVSGGSV SSTIEGGGGC KTVTADCVIV
 61 GGGTSGLCIA QALVTKHPDA AKVMVTEAK DRVGNLITR EBQFLWEEG PNSFQSDPM
 121 LTMVVDVSLK DDLVLGDPTA PRFVLWNGKL RPVPSKLTDL PFFDLMSIGG KIRAGFGAIG
 181 IRPSPPGREG SVEEFVRRNL GDEVFERLIE PFCSCVYACD PAKLSMKAAP GKVWKLEENG
 241 GSIIGGAFKA IQAKNKAPKT TRDPRLPKFK GQTVGSFRKG LTMLPDAISA RLGDVKVSVW
 301 KLSSISKLPS GGYSLTVEYP EGIIVTVQSKS VVWTVPSHVA SLLRPLSDS AAEALSKLYY

361 PPVAAVSISY PKEAIRSECL IDGELKGFQ LHPRTQKVEI LGTIYSSSLF PNRAPPGRVL
 421 LLNYIGGATN TGILSKSEGE LVEAVDRDLR KMLIKPSSTD PLVLGVKWF QAIPOFLIGH
 481 IDLVDAAKAS LSSSGHEGLF LGGNYVAGVA LGRCVEGAYE TATQVNDFMS RYAYK

Figura 34: Secuencia nucleótida de contigios para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX1 (SEQ ID NO: 34)

1 TTCAACAAG AGGCTGGACC GGTCCGGAAT TCCCGGGATA TCGTCCAGCC ACCCGTCCGG
 61 TCGACGCTGA TCGGAGATAA GAGTCGACAA AATTGAGGAT TCTCCTTCTC GCGGGCGATC
 121 GCCATGCATT TATCTCTTCT CCGTCCGCAG CCATTCCATAT CGCCATTCTC AAATCCATT
 181 CCTCGGTCCG GTCCCTACAA GCCTCTCAAC CFCCTTTCCT CCGTATCCGG TCGATCCGTC
 241 GTCTCTTCTA CAATCGAAGG CCGAGGAGGA GGTAAAACCG TCACGGCGGA CTGCGTGATC
 301 GTCGGCCGAG GAATCAGCCG CTTGTGCATT GCGCAAGCGC TCGTGACGAA GCACCCAGAC
 361 GCTGCAAAGA ATGTGATGCT GACCGAGCCG AAGGACCGTG TCGGAGCGAA TATCATCAG
 421 CGAGAGGAGC AAGGGTTTCT ATGGGAAGAA GGTCCCAATA GCTTTCAGCC GTCTGATCCT
 481 ATGCTCACTA TGGTGTAGA TAGTGGTTTG AAAGATGATC TAGTCTTGGG AGATCCTACT
 541 GCTCCGAGGT TTGTCTTGTG CAATCCGAAG CTGAGCCCGG TTCCTCGAA CTAACCTGAC
 601 TTGCCTTTCT TTGACTGAT GAGTATTGGA GGAAGATA GAGCTGGGTT TGGTGCCATT
 661 GTTATCCGAC CTTACCTCC GGGTCGTGAG GAATCAGTGG AAGAGTTTGT AAGGCCTAAT
 721 CTTGGTGTAT AGCTTTTGA CCGCTTGATT GAACCTTTT GCTCAGGTGT TTATGCGGGA
 781 GATCCTGCGA AACTGAGTAT GAAAGCAGCT TTTGGGAAGG TTTGGAAGCT AGAGGAGAAT
 841 GGTGGGAGCA TCATTGGTGG TGCTTTTAAG GCAATCAAG CGAAAATAA AGCTCCCAAG
 901 ACAACCCGAG ACCCGCTCT GCCAAAGCCA AAGGGCCAAA CASTTGGTTC TTTCAGGAAA
 961 GGAATCACA TGCTGCCAGA CGCAATCTCT GCAAGGTTGG GTGACAAGCT GAAAGTTCT
 1021 TGAAGCTCT CAAGTATCAG TAAGCTGCC AGCGGAGGAT ATAGCTTAAC TTACGAAACT
 1081 CCGGAGCCGA TAGTCACTGT ACAGAGCAAA AGTGTGTGA TGAATGTGCC ATCTCATGTT
 1141 GGTAGTAGTC TCTTGCGCC TCTCTGTGAC TGTGCAGCTC AAGCGTCTC AAAACTCTAC
 1201 TATCCACCAG TTGCAGCAGT ATCTATCTCA TACCCGAAAG AAGCAATCCG AAGCGAATGT
 1261 TTAATAGATG GTGAACTAAA AGGTTCCGGC CAGTTGCATC CAGCAGCACA GAAAGTGAA
 1321 ACTCTTGGAA CAATATACAG TTCATCGCTC TTTCCCTAAC GAGCACCACC TGAAGAGTGT
 1381 TTGCTACTGA ACTACATCGG TGGAGCTACC AACACTGGGA TCTTATCAA GTCAGAAAGT
 1441 GAGTTAGTGG AAGCAGTGG TAGAGACTTG AGGAAGATGC TGATAAAGCC AAGCTCGACC
 1501 GATCCACTTG TACTTGCAGT AAAAGTTTGG CCTCAAGCCA TTCCTCAGTT TCTGATAGGT
 1561 CACATTGATT TGGTAGACGC AGCGAAAGCA TCTCTCTCGT CATCTGGCCA TGAGGGCTTA
 1621 TTCTTGGGTG GAAATTACGT TGCCGGTSTA GCATTGGGTC GGTGTGTGGA AGGTGCTTAT
 1681 GAAACTGCAA CCCAAGTGA CGATTTCATG TCGAGGTACG CTTACAAATA ATGTAACCCA
 1741 GCAACGGTTT GATACTAAGT TGTAGATTGC AGTTTGGACT CTGTTTGTGA AAAATCAAG
 1801 TCTATGATTG AGTAAATTTA TATGTATTAA

Figura 35: Secuencia de aminoácidos de contigios para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX2 (SEQ ID NO: 33)

1 MDLSLLRPQP FLSPFSNPPF RSRPYKPLNL RCSVSGGSVV VGSSTIEGGG GGKTVAADCV
 61 IVGGGISGLC IAQALVTKHP DAAKSVMTVE AKDRVGNII TREEQFLWE EGPNSFQPSD
 121 PMLTMVVDSS LKDDLVLGDP TAPRFVLWNG KLRPVPKLT DLPFFDLMSI GSKIRAGFGA
 181 IGIRPSPPPGR EESVEEFVRR NLGDEVFERL IEPFCSGVYA GDPAKLSMKA ALGKVKLKE
 241 NGGSIIGGAF KAIQAKNKAP KTRDRPLPK PKQTVGSFR KGLTMLPDAI SARLGDKVKV
 301 SWKLSSISKL PSCGYSLEYE TPEGIVTVQS KSVVMTVPSH VASSLLRPLS DSAEALSKL
 361 YFPPVAAVSI SYPKEAIRSE CLIDGELKGF QQLHPRTPQKV ETLGTIYSSS LFPNRAPPGR
 421 VLLLNYYIGGA TNGILSKSE GELVEAVDRD LRKMLIKPSS TDPLVLGVKV WPQAIPOFLI
 481 GHIDLVDAAK ASLSSSGHEG LFLGGNYVAG VALGRCVEGA YBTATQVNDF MSRYAYK

Figura 36: Secuencia nucleótida de contigios para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX2 (SEQ ID NO: 34)

1 GATCCAGGAT AAGCTTGAAG AAATGAGAA TCCCTCCTCT CGCGGGCCAT CCCCATGGAT
 61 TTATCTCTTC TCCCTCCGCA GCCATTCCCA TCGCCATCTT CAAATCCATT TCCCTCGTCC
 121 CCTCCCTACA AGCCTCCCA CCTCCGTTCC TCCGTATCCG GTGGATCCGT CCTCGTCCG

```

181 TCGTCCACAA TCGAAGGCGG AGGAGGAGCT AAAACCGTGG CGGCGGATFG CGTGTATGTC
241 GCGGGAGGAA TCAGCGGCCT GTGCATTECG CAAGCGCTCG TGAOGAAGCA CCGCGAGCCT
301 GCGAAGAGTG TGATGGTGAC GGAGGCGAAG GACCGCGTGG GAGGGAATAT CATCACGCGA
361 GAGGAGCAAC GGTTCCTATG GGAAGAAGGT CCCAACAGCT TTCAGCCGTC TGATCCTATG
421 CTCACATATG TGGIAGATAC TGGTTTGAAG GATGATCTAG TCTTGGGAGA TCCTACTGCG
481 CCGAGGTTGG TGTGTGGAA TGGGAAGCTG AGGCGGTTTC CGTGGAGCTT AACTGACTTG
541 CCTTCTTTG ACTTGATGAG CATTGGAGGG AAGATTAGAG CTGGGTTTGG TGCCATGGC
601 ATTGACCCGT CACCTCCAGG TCGTGAGGAA TCTGTGGAAG AGTTTGTAAG GCGTAACCTT
661 GGTGATGAGG TTTTGGAGCG TTTGATGAA CCCTTTTGTG CAGGTCTTTA TGCCGGAGAT
721 CCTGCGAAAC TGAGTATGAA AGCAGCTTTG GGGAAAGTTT GGAAACTAAA GGAGAATGTT
781 GGAAGCATCA TAGGTGGTGC TTTTAAAGCA ATTCAGCGA AAAATAAAGC TCCCAAGACA
841 ACCCGAGACC CGCGTCTGCC AAAGCCAAAG GGCCAAACAG TTGGTTCTTT CAGGAAAGCA
901 CTCACAATGC TGCCAGACGC AATCTCTGCA AGGTTGGGTG ACAAGGTGAA AGTTTCTTGG
961 AAGCTCTCAA GTATCACTAA GCTGCCACG GGAGGATATA GCTTAACTTA CGAAACTCCG
1021 GAGGGGATAG TCACTGTACA GAGCAAAAGT GTTGTGATGA CTGTGCCATC TCATGTACTG
1081 AGTAGTCTCT TGGCGCCTCT CTCTGACTCT GCAGCTGAAG CGCTCTCAA ACTCTACTAT
1141 CCACCAGTTC CAGCAGTATC TATCTCATA CCGAAAGAAG CAATCCGAG CGAATGTTTA
1201 ATAGATGGTG AACTAAAAGG GTTCGGCCAG TTGCATCCAC GCACGCAGAA AGTGAAACT
1261 CTTGGAACAA TATACAGTTC ATCGCTCTTT CCTAACCGAG CACCACCTGG AAGAGTGTG
1321 CTACTGAACT ACATCGCTGG AGCTACCAAC ACTGGGATCT TATCAAAGTC AGAAGGTGAG
1381 TTAGTGGGAG CAGTGGATAG AGACTTGAGG AAGATGCTGA TAAAGCCAAG CTCGACCGAT
1441 CCACTTGTAC TTGGAGTAAA AGTTTGGCCT CAAGCCATTC CTCAGTTTCT GATAGGTAC
1501 ATTGATTTGG TAGACGCAGC GAAAGCATCT CTCTCGTCAT CTGGCCATGA GGGCTTATTC
1561 TTGGGTGGAA ATTACGTTGC CGGTGTAGCA TTGGTCCGT GTGTGGGAGG TGCTTATGAA
1621 ACTGCAACCC AAGTGAACGA TTTTATGTCG AAGTACGCTT ACAAGTAA

```

Figura 37: Secuencia parcial de aminoácidos de contigios para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX3 (SEQ ID NO: 37)

```

1 VTVQSKSVVM TVPSHVASEL LRFLESDSAE ALSKLYYPPV AAVSISYAKE AIRSECLIDG
61 ELKGFQQLHP RTQKVETLST FYSSSLFPNR APPGRVLLLN YIGGATNTOI LSKSEGEIWE
121 AVDRDLRKLK IKPSSIDPLV LQVKLWPPQAI PQFLIGHIDL VDAAKASLSS SGHEGLFLGG
181 NVVAGVALGR QVEGAYETAT QVNDPMSRYA YK

```

Figura 38: Secuencia nucleótida parcial de contigios para protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Brassica napus* Bnc PPX3 (SEQ ID NO: 38)

```

1 TAGTCACTGT ACAGAGCAAA AGTGTAGTGA TGACTGTGCC ATCTCATGTA GCTAGTAGTC
61 TCTTGCSCCC TCTCTCTGAT TCTGCAGCTG AAGCGCTCTC AAAACTCTAC TATCCGCCAG
121 TTGCAGCCGT ATCCATCTCA TACCAGAAAG AAGCAATCCG AAGCGAATGC TTAATAGATG
181 GTGAACTAAA AGGGTTGGGC CAGTTGCATC CAGGCACGCA AAAAGTGGAA ACTCTGGAA
241 CAATATACAG TTCATCGCTC TTTCCCAACC GAGCACCGCC TGGAAAGAGTA TTGCTATTGA
301 ACTACATCGG TGGAGCTACC AACACTGGGA TCTTATCAAA GTCCGAAGGT GAGTGTAGTG
361 AAGCAGTAGA TAGAGACTTG AGGAAGATGC TGATAAAGCC AAGCTCGACC GATCCACTTG
421 TACTTGGAGT AAAATFATGG COTCAAGCCA TTCTCAGTT TCTGATAGGT CACATFATG
481 TGGTAGACGC AGCGAAAGCA TCGCTCTCGT CATCTGGTCA TGAGGGCTTA TTCTTGGGTG
541 GAAATFACGT TGCCGGTGTG GCATTGGGTC GGTGTGTGGA AGGTGCTTAT GAAACTGCAA
601 CCCAAGTGA TGAATTCATG TCAAGGTATG CTTACAAGTA ATGTAACGCA GCAACGATTT
661 GATACTAAGT AGTAGATTTG GCAGTTCTGA CTTTAAAGAC ACTCTGTTTG TGA AAAATTC
721 AAGTCTGTGA TTGAGTAAAT TTATGTATTA TTACTAA

```

Figura 39: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Glycine max* GmcPPX1-1 Gm02G01000 (SEQ ID NO: 39)

```

1 MVAAAAMATA ASAAAFLNNG TRRPARLRRR GLEVRCAAVA GGAAEAPAST GARLSADCVV
61 VGGGISGLCT AQLDATHRGV GEVLVTEARA RGGNITTVR RPEEGLWEE GPNSFPQSPD
121 VLSMAVDSGL KDDLVFQDPN APRFVLEWEG LRPVPSKPAD LPFFDLMSIP GKLRAGLGAL
181 GIRPPPPGRE ESVEEFVRRN LGAEVFERLI EPFCSGVYAG DPSKLSMKAA PGKVVRIIEA

```

241 GSSIIGSTIK TIQERGNPK PPRDPRLPK KGQTVASFRK GLAMLPNAIT SSLGSKVKLS
 301 WKLTSITKSD GKGYVLEYET PEGVVLVQAK SVIMTIPSYV ASDILRPLSG DAADALSIFY
 361 YPPVAAVTVS YPKEAIRKEC LIDGELQGFQ QLHPRSQQVE TLGTIYSSSL FPNRAPGRV
 421 LLLNYIGGAT NTGIVSKTES ELVEAVDRDL RKMLINSTAV DPLVLGVRVW PQALPQFLVG
 481 HLDLLEVAKS ALDOGGYDGL FLGGNYVAGV ALGRCTEGAY ESAAQIYDFL TKYAYK

Figura 40: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Glycine max* GmcPPX1-2 Gm02G01000 (SEQ ID NO: 40)

1 MVSVPNDILF PPNQTLSPST FFTSPTRKFP RSRPNPILRC SIABESTESR PKTGDSPPPP
 61 LMEALAVVHR PGRPHOARQC QHCWGDNRAR DRVGGCNITF MESGGYLWEE GPNSFQPSDF
 121 MLTMMVDSGL KDQLVLGDDP APRFVLWNGK LRPVPGKPTD LPFFDLMSIG GKIRAGFGVL
 181 CIRPPPPVEE FVRNRLGDDV FERLIEPFCS GENTCIPKPV GALLLWGGC RRSEKIKYES
 241 SIWESLEAGK NGGSIIGSTF KAIQERNQAS KPRDPRLPK PKGQTVGSFR KGLIMLPDAI
 301 SARLGNKVKL SWKLSISKL DSGEYSLIYE TPEGVVBLOC RTVVLTIPGY VASTLLRPLS
 361 AAAADTSLKF YPPVVAVSI SYPKEAIRSE CLIDGELKGF GAIYSSSLFS RRAPPGRVLL
 421 LNYIGGATNT GIYQSFSGKL QGWEXELIIF TGGLEFGCFKQ LRPNGLVSNF DSELVATVDR
 481 DLRKILINPN AQDFVVGVR LWPQATPQFL IGHLDLDDVA KASLRNTGFE GLFLGGNYVS
 541 GVALGRWVEG A

Figura 41: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Glycine max* GmcPPX1-2 Gm02G01000 (SEQ ID NO: 41)

1 ATGGTTCCTCG TCTTCAACGA CATCCTATTC CCGCCTAACC AAACCCCTTC CCCAACGTCC
 61 TTCTTCACCT CTCCCCTCG AAAATTCCCT CGCTCTCGCC CTAACCCAT TCTCCGCTGC
 121 TCCATCCGGG AGGAGTCCAC CGAGTCTCGG CCCAAAACCG GAGACTCCCC CCCCCCGCG
 181 TGCATGGAGG CCTTAGCGGT CTGGCATCGC CCAGGCCCTC GCCACCAAGC ACGCCAATGC
 241 CAACACTGTT GGGGAGATTC GAGGGCCCGA GACCGTGTGG GCGGGCGCAA CATCACCACG
 301 ATGGAGAGTG GCGGATACCT CTGGGAAGAA GGCCCCAACA GCTTTCAGCC CTTGATCCA
 361 ATGCTCACCA TGGTGGTGGG CAGTGGCTTA AAGGATCAGC TTGTTTTGGG GGATCCTGAT
 421 GCACCTCGGT TTCTCTTCTG CAATGGGAAG TTGAGGCCAG TGCCCTGGGA GCGACTGAT
 481 TTGCCCTTCT TTGACTTGAT GAGCATCGGT GGCAAAATCA CCGCTGGCTT TGGTGTGCTT
 541 GGTATTCCGGC CTCTCCTCC AGTTGAAGAG TTTGTCTGTC GGAACCTGG TGATGATGTT
 601 TTTGAACGAT TGATAGAGCC TTTTGTGTCG GGGGGCAATA CTTGTATATT TAAATTTGTG
 661 GSAGCATTAC TCATATTGTG GGGTCTATGC AGGCGATCCT TCAAAAATTA GTATGAAAGC
 721 AGCATTGGGG AAAGTTTGGG GGCTGGAAA AATGGTGGTA GCATAATTGC TGGAACCTTC
 781 AAAGCAATC AAGAGAGAAA TGGAGCTCA AAACCACCTC GAGATCCACG TCTGCCAAAA
 841 CCAAAGGGT AGACTGTTGG ATCTTTTCGG AAGGGACTTA TCATGTTGCC GATGCAATT
 901 TCTGCAAGAT TAGGCAACAA AGTAAAGTTA TCTTGGGAGC TTTCAAGTAT TAGTAAATC
 961 GATAGTGGAG AGTACAGTTT GACATATGAA ACACCCGAAG GAGTGGTTTC TTPGCAGTGC
 1021 AAAACCGTTG TCCTGACCAT TCCTTCTAT GTTGCTAGTA CATTGCTGCG TCCTCTGTCT
 1081 GCTGCTGCTG CAGATACGCT TTCAAAGTTT TATTACCCTC CAGTTGTTCC AGTTTCCATA
 1141 TCCTATCCAA AAGAAGCTAT TAGATCAGAA TGCTTGATAG ATGGTGAGTT GAAGGGGTTT
 1201 GGAGCTATAT ACAGCTCATC ACTATCTCC AATCGAGCAC CACCTGGAAG GGTCTACTC
 1261 TTGAATTACA TTGGAGGAGC TACTAATACT GGAATTTATC AAAGTPTTTC TGGGAAACTT
 1321 CAAGSATGGT TFAAAGAACT AATCATCTTC ACCAGCGGGT TATTTCGGTG TTTTAAACAA
 1381 CTCAGGCCA ATGGTCTTGT TTCGAATACG GACAGTGAAC TTGTCGCAAC AGTTGATCGA
 1441 GATTTGAGAA AAATCCTTAT AAACCCAAAT GCCCAGGATC CATTCTAGT GGGGGTGA
 1501 CTGTGGCTC AAGCTATTCC ACAGTCTTA ATGGCCATC TTGATCTTCT AGATGTTGCT
 1561 AAACCTTCTC TCAGAAATAC TGGCTTTGAA CCGCTCTTCC TTGGCGTAA CTATGTCTCT
 1621 GGTGTTGCC TGGGACGATG GGTGAGGGA GCCCTGA

Figura 42: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Glycine max* GmcPPX2 – Gm10G27890 (SEQ ID NO: 42)

1 MVSVFNEILF PPNQTLRPS LHSPTSPTFS PTRKFRSRP NPILRCSIAE ESTASPPKTR
 61 DSAPVDCVVV GGGVSLCIA QALATKHANA NVVVTEARDR VGNITTMER DGYLWEEGPN

```

121 SFQSPDPLMT MVVDSGLKDE LVLGDEDPAPR FVLWNRKLRP VEGKLTDLFF PDLMSIGGKI
181 RAGFGALGIR PPPPGHEESV EEFVRRNLGD EVFERLIEPF CSGVYAGDPS KLSMKAAFVK
241 VMKLEKNGGS IIGGTPKAIQ ERNGASKFPR DPRLPKPKGQ TVGSFRKGLT MLPDAISARL
301 GNKVKLSWKL SSIKLEBSGE YSLTYETPEG VVSLQCKTVV LTI PSYVAST LLRPLSAAAA
361 DALSKFYYPV VAAVSISYPK EAERSECLID GELKGFQQLH PRSQGVETLG TIYSSSLFPN
421 RAPPGRVLLL NYIGGATNTG ILSKTDSELV ETVDRDLRKI LIMPNAQDPF VVGVRLLWPOA
481 IPQFLVCHLD LLDVAKASIR NTGPEGLEFLG GNYVSGVALG ROVEGAYEVA AEVNDPLTNR
541 VYK
    
```

Figura 43: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa plastidial de *Glycine max* GmcPPX2 - Gm10G27890 (SEQ ID NO: 43)

```

1 ATGGTTCCCG TCTTCAACGA GATCCTATTC CCGCCGAACC AAACCCCTCT TCGCCCTCC
61 CTCCATTCCC CAACCTCTTT CTTACCTCT CCCACTCGAA AATTCCTCCG CTCTCGCCCT
121 AACCTTATTC TAGCTGCTC CATTGCGGAG GAATCCACCC CGTCTCCGCC CAAAACCAGA
181 GACTCCGCC CCGTGGACTG CGTCGTCGTC GCGCGAGGCG TCAGCGGCC CTGCATCGCC
241 CAGGCCCTCG CCACCAAACA CGCCAATGCC AACGTGCTCG TCACGGAGGC CCGAGACCGC
301 GTCGCGGGCA ACATCACCAC GATGGAGAGG GACGGATACC TCTGGGAAGA AGGCCCCAAC
361 AGCTTCCAGC CTTCTGATCC AATGCTCACC ATGGTGGTGG ACAGTGGTTT AAAGSATGAG
421 CTTGTTTTGG GGGATCCTGA TGCACCTCGG TTTGIGTTGT GGAACAGGAA GTTGAGGCCG
481 GTCCCCGGGA AGCTGACTGA TTTGCCTTTC TTTGACTTGA TGAGCATTGG TGGCAAAATC
541 AGGGCTGGCT TTGGTGGCCT TGAATTCGG CCTCCTCCTC CAGGTCATGA GGAATCGGTT
601 GAAGAGTTTG TTCGTCSGAA CCTTGGTGAT GAGGTTTTTG AACGGTTGAT AGAGCCTTTT
661 TCTTCAGGGG TCTATGCAAG CGATCCTTCA AAATTAAGTA TGAAAGCAGC ATTCGGGAAA
721 GTTTGGAAGC TGGAAAAAAA TGGTGGTAGC ATTATTGGTG GAACTTTCAA AGCAATACAA
781 GAGAGAAATG GAGCTTCAA ACCACTCGA GATCCGCGTC TGCCAAAACC AAAAGGTGAG
841 ACTGTGGGAT CTTTCCGGAA GGGACTTACC ATGTTGCCGT ATGCAATTTT TGCCAGACTA
901 GGCACAAAG TAAAGTTATC TTGGAAGCTT TCAAGTATA GTAAACTGGA TAGTGAGAG
961 TACAGTTTGA CATATGAAAC ACCAGAAGGA GTGGTTTCTT TGCAGTGCAA AACTGTTGTC
1021 CTGACCATT CTTCTATGTT TGCTAGTACA TTGCTGCGTC CTCTGCTGTC TGCTGCTGCA
1081 GATGCACTTT CAAAGTTTTA TTACCTCCA GTTGCTGCAG TTCCATATC CTATCCAAAA
1141 GAAGCTATTA GATCAGAATG CTTGATAGAT GGTGAGTTGA AGGGGTTTGG TCAATTTGAT
1201 CCACGTAGCC AAGGAGTGG AACTTAGGA ACTATATACA GCTCACTACT ATTCCCAAC
1261 CGAGCACCAC CTGGAAGGGT TCTACTCTTG AATTACATTG GAGGAGCAAC TAATACTGGA
1321 ATTPTATCGA AGACGGACAG TGAATTGTG GAAACAGTTG ATCGAGATTT GAGGAAAATC
1381 CTATATAAAC CAARTGCCA GGATCCATTT GTAGTGGGGG TGAGACTGTG GCCTCAAGCT
1441 ATTCCACAGT TCTTAGTTGG CCATCTGAT CTTCTAGATG TTGCTAAAAGC TTCTATCAGA
1501 AATACTGGGT TTGAAGGGCT CTTCTTGGG GGTAATTATG TGTCTGGTGT TGCCTTGGGA
1561 CGATGCCTTG AGGCAGCCTA TGAGGTAGCA GCTGAAGTAA ACGATTTTCT CACAAATPAG
1621 GTGTACAAAT AG
    
```

Figura 44: Secuencia de aminoácidos de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Glycine max* GmcPPX-Gm19g25100 (SEQ ID NO: 44)

```

1 MASSATDDNF RSVKRVAVVG AGVSGLAAY FLKSHGLDVT VFFAEGRAGG RLRVVSQDGL
61 TWDEGANVMT ESEIEVKGLI DAUGLQEKQQ FPISQHKRYI VKNGAPLLVP TNPAAILKSK
121 LLSAQSKIH IYEPFMWERS DPSNVCDENS VESVGRFFER HFGKEVVDYL IDPFVGGTSA
181 ADFEESLMRH SFPELWNLEK RFGSIIAAL QSKLFAKREK TGENRTALRK NKHKRGEFSF
241 QGGMQTLTDF LCKELGKDEL KLNERVLTLE YGHDGSSSSQ NWSITSASNQ STQDVIDAVIM
301 ENLHYLKHSL HNGQAPLYNV KDUKTKRGT PPTLNPLPEV SYVPIVMTT TPKKENVKRP
361 LEQFGVLVPS KEQKNLKLTL GILFSSMMFP DRAPSDLYLY TPIGGTQNR ELAQASIDEL
421 RKIVTSDLRK LLGAEGETP VNHFYWSEGF PLYGRNYGSV LQALDKIEKD LPGFFTAGNY
481 KQKLSVGKAI ASGCKAADLV ISYLNASLEN IVPDK
    
```

Figura 45: Secuencia nucleótida de protoporfirinógeno IX oxidasa mitocondrial de *Glycine max* GmcPPX-Gm19g25100 (SEQ ID NO: 45)

```

1 ATGGCTTCCT CTGCAACAGA CGATAACCCA AGATCTGTAA AAAGAGTAGC TGTTGTTGGT
61 GCTGGGGTAA GTGGGCTTGC TGCGCTTAC AAATGAAAT CACATGGTCT GGATGCTACT
    
```

ES 2 688 285 T3

121 CTATTTGAAG CTGAGGGAAG AGCTGCAGGG AGCTTGAGAA GTGTTTCTCA GGATGGTCTA
 181 ATTTGGGATG AGGGAGCTAA TACAAIGACT GAAAGTGAAA TTGAGGTTAA AGCTTTGATF
 241 GATGCTCTTG GACTTCAAGA AAAGCAGCAG TTCCCAATAT CACAGCATAA GCCCTATATT
 301 GTGAAAAATG GGGCACCACF TCTGGTIACCC ACAAATCCFG CTGCACTACT GAAGAGTAAA
 361 CTGCTTTCTG CACAATCAA GATCCATCTC ATTTTGTGAC CATTTATGTG GAAAAGAAGT
 421 GACCCCTCTA ATGTGTGTGA TGAAAATTCT GTGGAAAGTG TAGGCAGGTT CTTTGAACGT
 481 CATTTTGGAA AAGAGGTFGT GGACTATCTG ATTGATCCFT TTGTGGGGG CACTAGTGC
 541 GCAGATCTG AATCTCTCTC TATGCGCCAT TCTTTCCCG AGCTATGGAA TTGGAGAAA
 601 AGCTTTGGCT CCATTATAGC CGGGGCATTG CAATCTAAGT TATTCGCCAA AAGGGAAAA
 661 ACTGCAGAAA ATAGGACTGC ACTAAGAAAA AACAAACACA AGCCTGCTC GTTTCTTTT
 721 CAGGCTGGGA TGCAGACACT GACAGATACA TTCTGCAAG AGCTTGGCAA AGACGACCTT
 781 AAATIAAATG AAAAGGTTTT GACATTAGCT TATGGTCATG ATGGAAGTTC CTCTTCACAA
 841 AACTGGTCTA TFACTAGTGC TTCTAACCAA AGTACACAAG ATGTTGATGC AGTAATCATG
 901 ACGAATCTGC ATTATTTAAA CCATTCCTTG CATAATGGTC AAGCTCCTCT ATATAATGTC
 961 AAGGACATCA AGATCACAAA AAGGGGAAC CCCTTTCCAC TTAATTTTCT TCCCAGGCTA
 1021 AGCTACGTC CAATCTCAGT CATGATTACT ACCTTCAAAA AGGAGAATGT AAAGAGACCT
 1081 TTGGAGGGAT TTGGAGTCTT TGTTCCTTCT AAAGAGCAA AAAATGGTTT AAAAACCTT
 1141 GGTACACTTT TTCTCTCTAT GATGTTCCCA GATCGTGCAC CTAGTGATTT ATATCTCTAT
 1201 ACCACCTTCA TTGGCGGAAC TCAAAACAGG GAACITGCTC AAGCTTCAAC TGACGAGCTT
 1261 AGGAAAATG TTAATCTGGA CCTGAGAAAAG TTGTGGGGAG CAGAGGGGGA ACCAACATTT
 1321 GTTAAACATT TCTATTGGAG TAAAGGCTTT CCTTGTATG GACCTAATA TGGGTCACTT
 1381 CTCAAGCAA TTGATAAGAT AGAAAAAGAT CTTCCCGGAT TTTCTTTG CAGGTAACACT
 1441 AAAGTGGAC TCTCAGTTGG CAAAGCAATA GCCTCAGGCT GCAAGCAGC TGATCTTTG
 1501 ATATCTTACC TCAACTCTGC TTCAGACAAC ACAGTGCCTG ATAAATGA

Figura 46

	1	10	20	30	40	50	60
ADNc de At4g01690 - AX084732t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de At5g14220 HEMG2/MEE61-NM_121426	(1)	---	---	---	---	MELSLRPT	---TQS
StmPPX1t	(1)	---	---	---	---	---	---
StmPPX2-1t	(1)	---	---	---	---	---	---
StmPPX2-2t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de cloroplasto de StPPO - AJ225107t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc mitocondrial de StPPO - AJ225108t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386117t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386118t	(1)	---	---	---	---	---	---
CDS de cóntigos de BncPPX1	(1)	---	---	---	---	---	---
CDS de cóntigos de BncPPX2	(1)	---	---	---	---	---	---
CDS parcial de BncPPX3	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX de Gmm - Gm19g25100	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX1-1 de Gmc - Gm02G01000	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX1-2 de Gmc - Gm02G01000	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX2 de Gmc - Gm10G217890	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Os01g0286600 - NM_001049312t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de lc de PPX de OsmPPX Os04g0490000 prevista	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX1de Ptc - Pt0014510720	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX2 de Ptc - Pt0002S18740	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Rc167848D - XM_002509502t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Rc134315D - XM_002515127t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Sb03g01167D - XM_002455439t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Sb06g02095D - XM_002446665t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Zm - AF273767t	(1)	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Zm - AF218052t	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX de Cpc - CP0057G0026	(1)	---	---	---	---	---	---
PPX de Vvc - VV7G0627	(1)	---	---	---	---	---	---
Consenso	(1)	---	---	---	---	---	---

Figura 46

	61	70	80	90	100	110	120	Sección 2
ADNc de At4g01690 - AX084732t	(61)	LLPSESKPNLR	---	---	---	---	---	---
ADNc de At5g14220 HEMG2/MEE61-NM_121426	(13)	---	---	---	---	---	---	---
StmPPX1t	(1)	---	---	---	---	---	---	---
StmPPX2-1t	(1)	---	---	---	---	---	---	---
StmPPX2-2t	(1)	---	---	---	---	---	---	---
ADNc de cloroplasto de StPPO - A1225107t	(25)	SSSSPSEFLFLNRTNEIPIYFESTSKRNSVNCNGWR	---	---	---	---	---	---
ADNc mitocondrial de StPPO - A1225108t	(1)	---	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386117t	(14)	ALPSP	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386118t	(14)	ALPSP	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386118t	(11)	FLSPFSNDFPR	---	---	---	---	---	---
CDS de cóntigos de BncPPX1	(11)	FLSPFSNDFPR	---	---	---	---	---	---
CDS de cóntigos de BncPPX2	(11)	FLSPFSNDFPR	---	---	---	---	---	---
CDS parcial de BncPPX3	(1)	---	---	---	---	---	---	---
PPX de Gmm - Gm19g25100	(1)	---	---	---	---	---	---	---
PPX1-1 de Gmc - Gm02G01000	(20)	GTRRPARLR	---	---	---	---	---	---
PPX1-2 de Gmc - Gm02G01000	(21)	FFISPTRKFP	---	---	---	---	---	---
PPX2 de Gmc - Gm10G217890	(27)	FFTSPTKFP	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Os01g0286600 - NM_001049312t	(21)	RIRDAART	---	---	---	---	---	---
ADNc de lc de PPX de OsmPPX Os04g0490000 prevista	(13)	SSSSPSRAHARAP	---	---	---	---	---	---
PPX1de Ptc - Pt0014510720	(58)	LIPSS	---	---	---	---	---	---
PPX2 de Ptc - Pt0002518740	(17)	LIPSS	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Rc167848D - XM_002509502t	(1)	---	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Rc134315D - XM_002515127t	(17)	LVPSYP	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Sb03g01167D - XM_002455439t	(20)	GTRRPARLR	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Sb06g02095D - XM_002446665t	(13)	SHSHP	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Zm - AF273767t	(13)	SHPYR	---	---	---	---	---	---
ADNc de PPX de Zm - AF218052t	(19)	GTRIPARLR	---	---	---	---	---	---
PPX de Cpc - CP0057G0026	(17)	LFPSTSTSNLR	---	---	---	---	---	---
PPX de VVc - VV7G0627	(22)	RSTSISSPTFCRP	---	---	---	---	---	---
Consenso	(61)	---	---	---	---	---	---	---

Figura 46

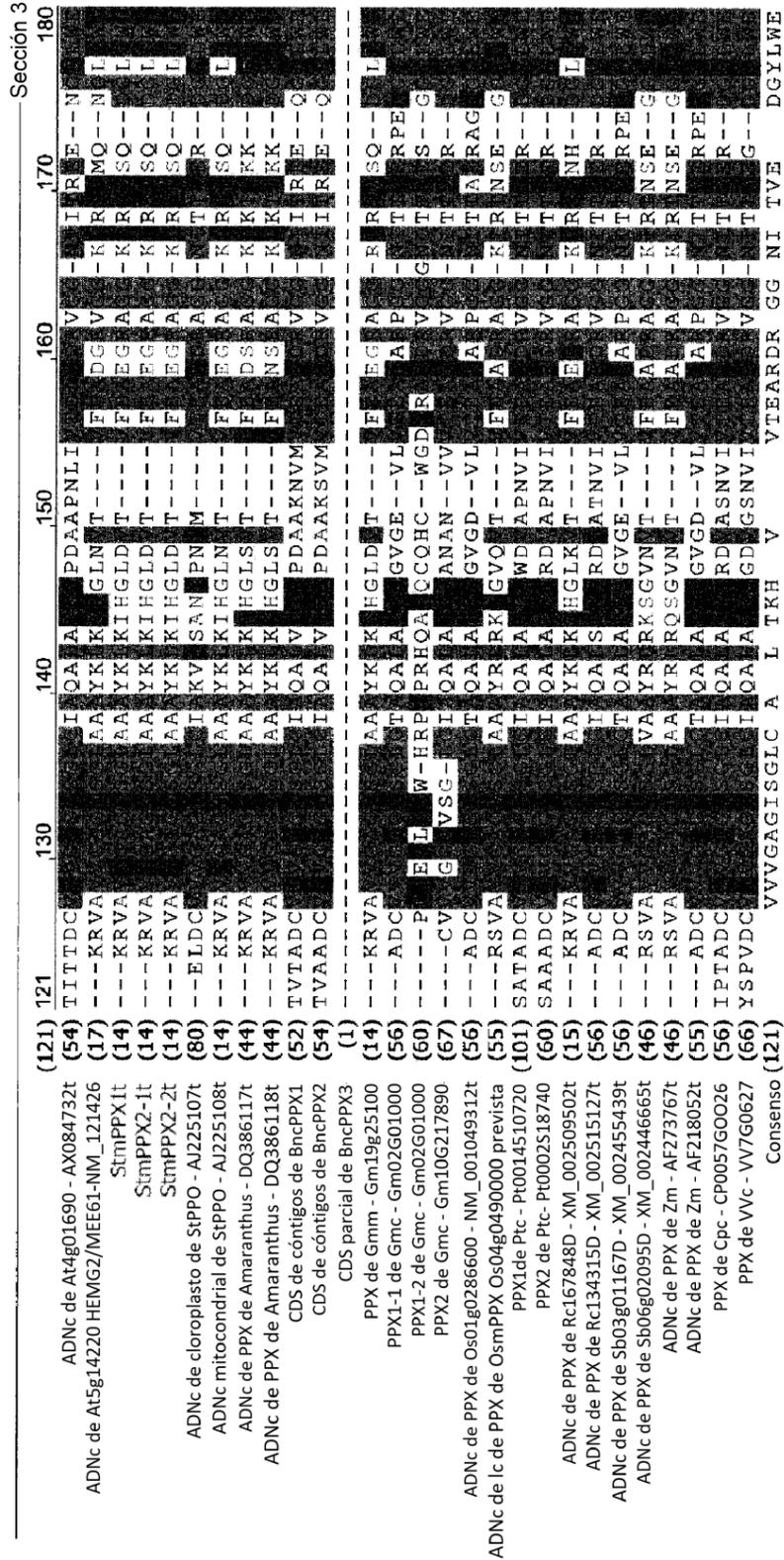


Figura 46

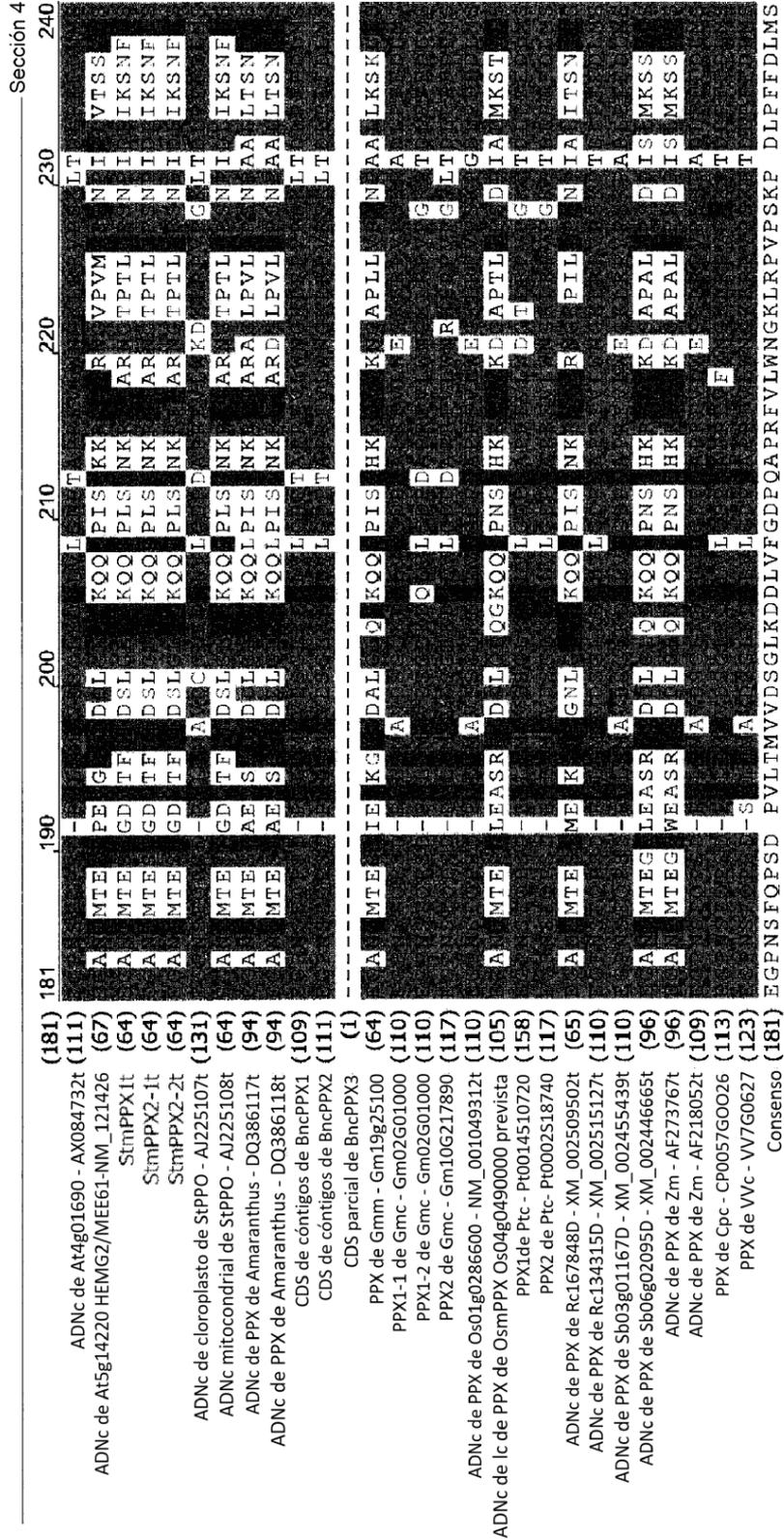


Figura 46

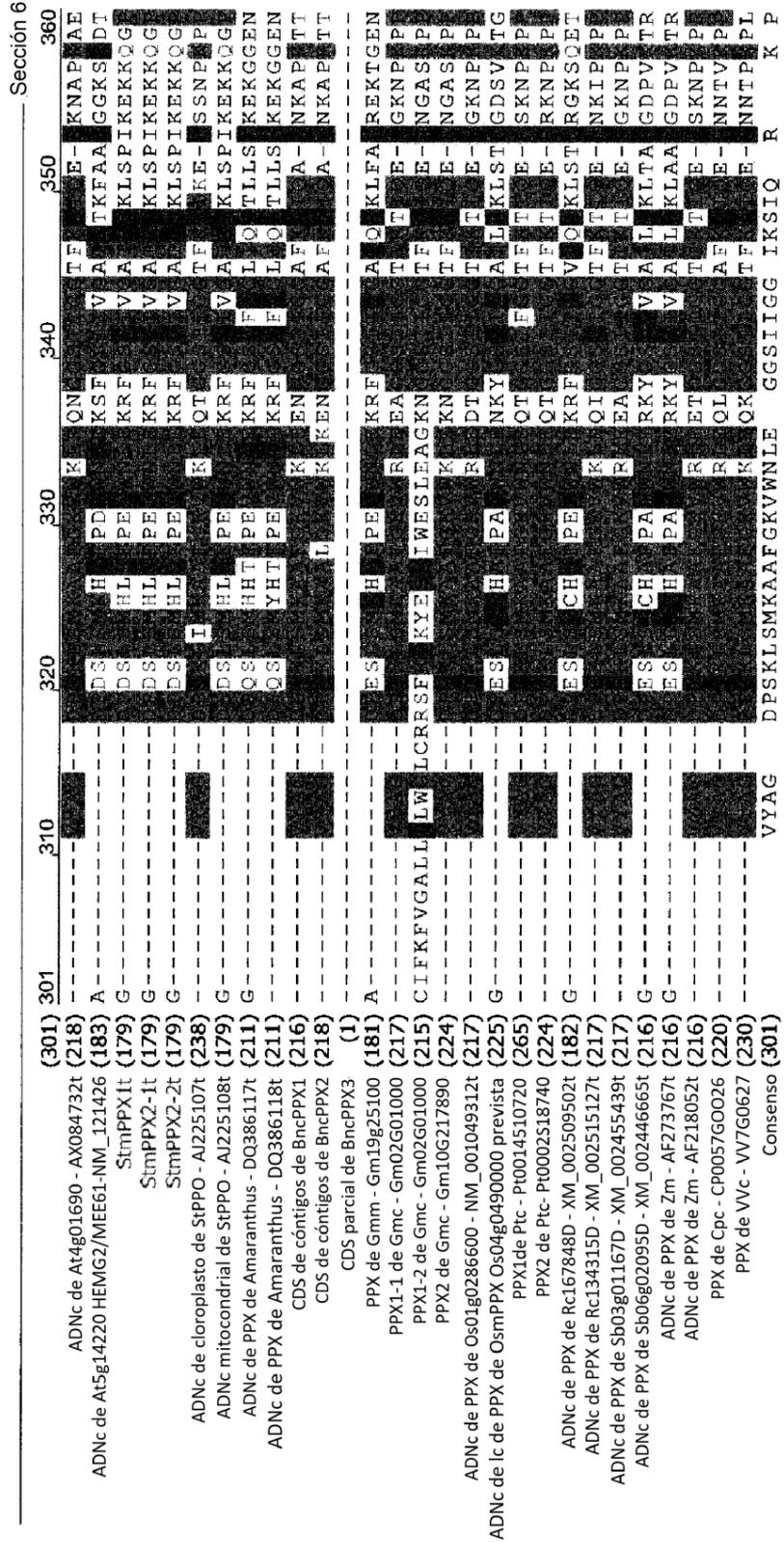


Figura 46

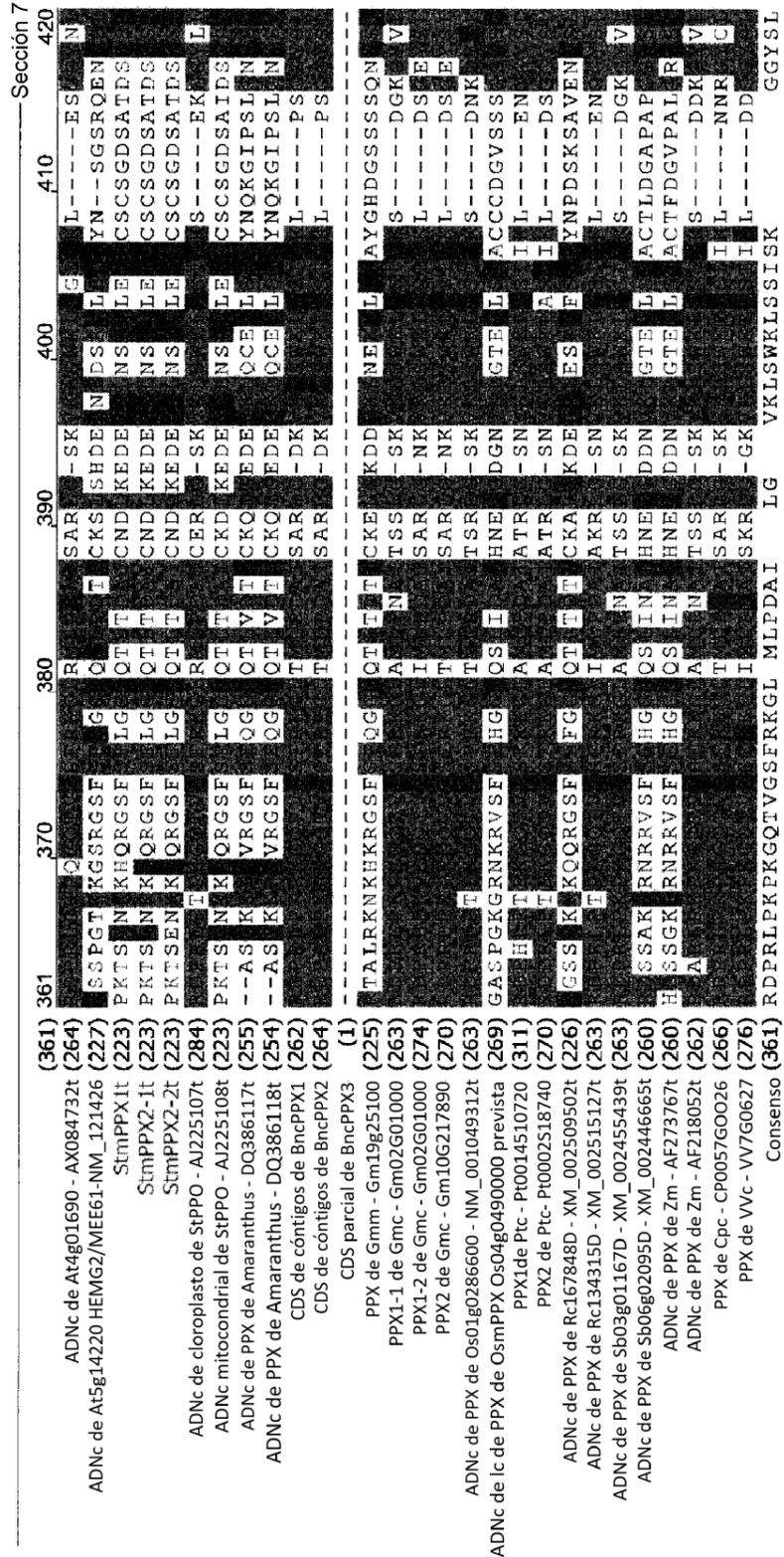


Figura 46

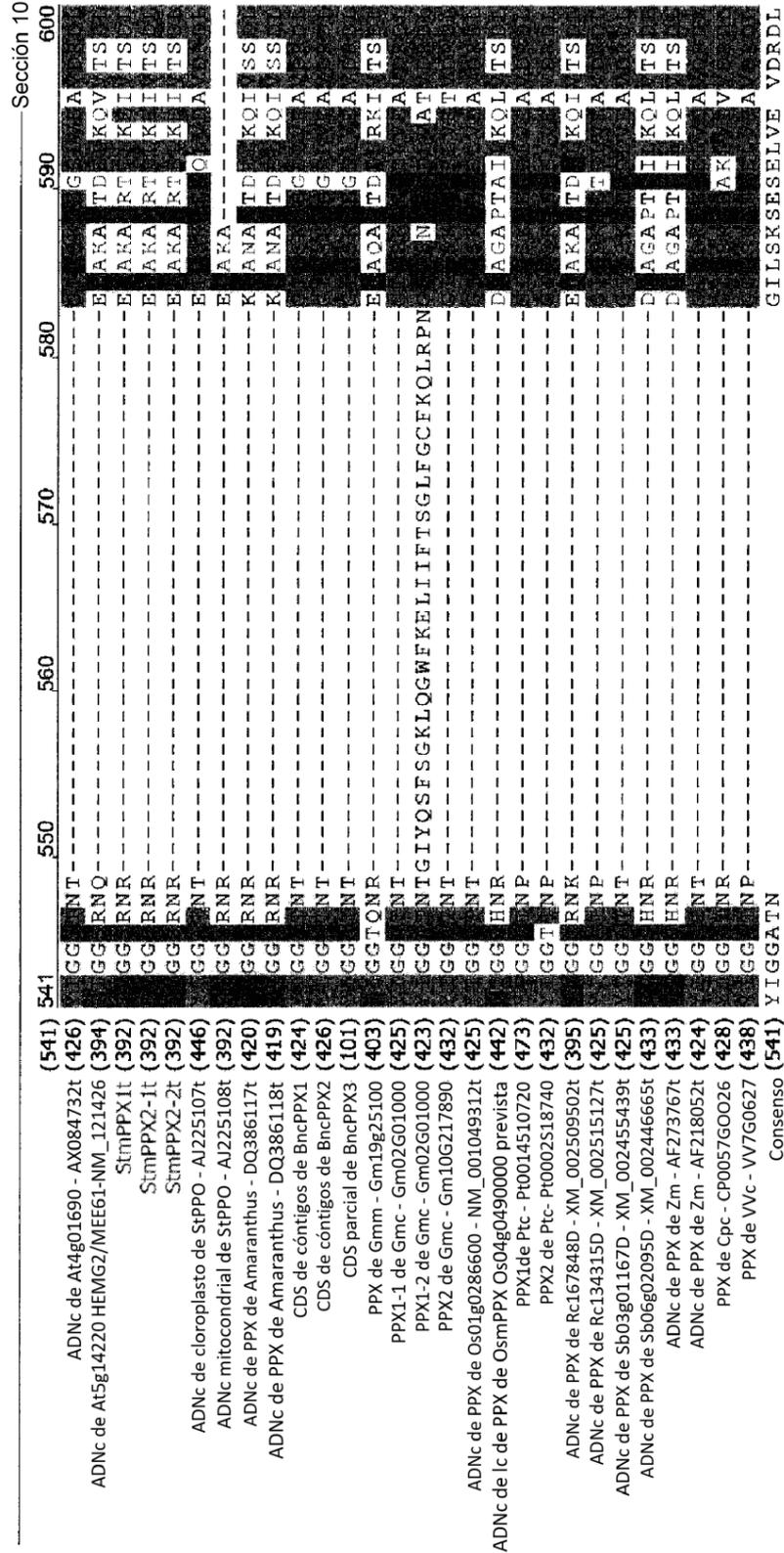


Figura 46

Sección 12

	661	670	680	695
(661)	T	I	R	---
ADNc de At4g01690 - AX084732t (512)	IE NN	DL IS	ESC	NDKKPNDSL--
ADNc de At5g14220 HEMG2/MEE61-NM_121426 (476)	DL IS	DL IS	EAV	TDTKNHR---
StmPPX1t (474)	DL IS	DL IS	EAV	TDTKNHR---
StmPPX2-1t (474)	DL IS	DL IS	EAV	TDTKNHR---
StmPPX2-2t (532)	SE TG	Q	Q	---
ADNc de cloroplasto de StPPO - AJ225107t (505)	---	---	---	---
ADNc mitocondrial de StPPO - AJ225108t (405)	---	---	---	---
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386117t (502)	EL IS	EL IS	DS I	VKMDEKTA--
ADNc de PPX de Amaranthus - DQ386118t (501)	EL IS	EL IS	DS I	VKMDEKTA--
CDS de cóntigos de BncPPX1 (510)	TQ ND	R	R	---
CDS de cóntigos de BncPPX2 (512)	TQ ND	R	R	---
CDS parcial de BncPPX3 (187)	TQ ND	R	R	---
PPX de Gmm - Gm19g25100 (485)	DL IS	DL IS	NSA	DNTVPDK---
PPX1-1 de Gmc - Gm02G01000 (511)	AQ YD	K	K	---
PPX1-2 de Gmc - Gm02G01000 (543)	---	---	---	---
PPX2 de Gmc - Gm10G217890 (518)	---	---	---	---
ADNc de PPX de Os01g0286600 - NM_001049312t (511)	VAE ND	NRV	NRV	---
ADNc de lc de PPX de OsmPPX Os04g0490000 prevista (524)	SQ SD	K	K	---
PPX1de Ptc - Pt0014510720 (559)	DL IS	ESCTDQDN	---	---
PPX2 de Ptc - Pt0002S18740 (518)	SE TD	Q	Q	---
ADNc de PPX de Rc167848D - XM_002509502t (477)	AE TD	Q	N	---
ADNc de PPX de Rc134315D - XM_002515127t (511)	DL IS	ESS	DEKMLKEGPSN	---
ADNc de PPX de Sb03g01167D - XM_0024545439t (511)	AE TN	QN	---	---
ADNc de PPX de Sb06g02095D - XM_002446665t (515)	AQ YD	K	---	---
ADNc de PPX de Zm - AF273767t (515)	DLAIS	ES	TKHNNLH---	---
ADNc de PPX de Zm - AF218052t (510)	DLAIS	ES	TKHNNSH---	---
PPX de Cpc - CP0057G0026 (514)	SQ SD	K	T	---
PPX de VVc - VV7G0627 (524)	AE NS	Q	T	---
Consenso (661)	ALGR	VEGAYEAA	V FLS	YAYK

