



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 354 109**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06724035 .8**

(96) Fecha de presentación : **31.03.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1869186**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

(54) Título: **Métodos y medios para eliminar una secuencia de ADN seleccionada.**

(30) Prioridad: **04.04.2005 EP 05075781**
07.04.2005 US 669243 P

(73) Titular/es: **BAYER BIOSCIENCE N.V.**
Technologiepark 38
9052 Gent, BE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

(72) Inventor/es: **D'Halluin, Kathleen y**
Ruiter, Rene

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

- 1 -

**MÉTODOS Y MEDIOS PARA ELIMINAR UNA SECUENCIA DE ADN
SELECCIONADA****Campo de la invención**

5

La actual invención se refiere a métodos y medios para el intercambio exacto en células vegetales y en plantas de una secuencia de ADN diana por una secuencia de ADN de interés a través de recombinación homóloga, con lo que el marcador seleccionable o identificable usado durante la fase de recombinación homóloga para la selección temporal de los sucesos de sustitución génica se puede eliminar subsiguienteamente sin dejar una huella y sin recurrir al cultivo *in vitro* durante la etapa de eliminación.

15

Antecedentes de la técnica

La eliminación de subfragmentos seleccionados de ADN extraño introducido en células vegetales o en plantas, pero que se han convertido subsiguienteamente en obsoletos o incluso indeseados, por diversas razones, tras la introducción de los mismos, ha sido el objeto de una intensa investigación. Los ejemplos de tales secuencias son, por ejemplo, genes marcadores seleccionables que fueron necesarios para el aislamiento de plantas transgénicas pero que ya no son necesarios en las plantas maduras. Los métodos para lograr la eliminación eficaz de los mismos se basan mayoritariamente en la recombinación específica del sitio o en la transposición (véase, por ejemplo, Hohn et al., Plant Biotechnology p 139-143).

Siebert y Puchta (2002) describieron que las secuencias transgénicas flanqueadas por sitios de una enzima de

restricción de corte rara se pueden cortar eficazmente del genoma de un eucariota superior mediante recombinación homóloga, así como mediante unión de extremos no homólogos.

El documento WO 03/004659 se refiere a sistemas de 5 recombinación y a un método para eliminar una secuencia de ácido nucleico del ADN cromosómico de organismos eucario-
tas. El documento también se refiere a organismos transgé-
nicos (preferiblemente plantas), que contienen los sistemas
descritos o producidos por los métodos descritos.

10 Sin embargo, los métodos descritos requieren en su
mayoría el uso de un método de cultivo *in vitro* para iden-
tificar o seleccionar aquellas células vegetales en las que
ha tenido lugar la eliminación de las secuencias de ADN a
eliminar, y para generar una planta a partir de tales célu-
15 las.

La Solicitud de Patente US 2005/0060769 propone un
método para preparar una planta o célula vegetal de Zea
mays transgénica recombinada a partir de una primera célula
vegetal de Zea mays transgénica, en el que el transgén en
20 la planta o célula vegetal recombinante tiene una estructu-
ra genética alterada con relación a la estructura genética
del transgén en la primera célula vegetal transgénica, de-
bido a la eliminación transgénica mediada por recombinación
homóloga.

25 El documento WO 97/30166 o la patente US 6.407.314
describe fragmentos promotores procedentes de un gen espe-
cífico de microsporas del tabaco, que se pueden usar para
la expresión de genes en microsporas.

El problema que se ha resuelto por la presente inven-
30 ción se refiere al intercambio seleccionado y exacto a tra-
vés de recombinación homóloga de una secuencia de ADN diana
en una célula de una planta por una secuencia de ADN de

sustitución sin dejar huellas del procedimiento, y sin tener que recurrir a métodos de cultivo *in vitro* después de la etapa inicial de recombinación homóloga. Para este fin, se pueden usar convenientemente los métodos para la eliminación eficaz de la subsecuencia seleccionada de una parte de una molécula de ADN previamente insertada en el genoma, preferiblemente el genoma nuclear de células de una planta, a través de recombinación homóloga intracromosómica.

La necesidad de controlar el sitio de integración transgénica en plantas se ha reconocido desde muy temprano, y se han desarrollado varios métodos en un esfuerzo para satisfacer esta necesidad (para un repaso, véase Kumar y Fladung, 2001, Trends in Plant Science, 6, p. 155-159). Estos métodos se basan en su mayoría en la integración transgénica basada en recombinación homóloga, una estrategia que se ha aplicado con éxito en procariotas y eucariotas inferiores (véase, por ejemplo, el documento EP 0317509, o la publicación correspondiente de Paszkowski et al., 1988, EMBO J., 7, p. 4021-4026). Sin embargo, para las plantas, el mecanismo predominante para la integración transgénica se basa en una recombinación ilegítima que implica poca homología entre las hebras de ADN que se recombinan. Por lo tanto, un reto importante en esta área es la detección de los sucesos de recombinación homóloga raros, que están encubiertos por la integración mucho más eficaz del ADN extraño introducido vía recombinación ilegítima.

Una manera de resolver este problema es seleccionando frente a los sucesos de integración que se han producido mediante recombinación ilegítima, tal como se ejemplifica en el documento WO 94/17176.

Otra manera de resolver el problema es mediante la activación del locus diana a través de la inducción de rup-

- 4 -

turas de ADN bicatenarias vía endonucleasas que cortan de forma rara, tales como I-SceI. Se ha demostrado que esta técnica incrementa la frecuencia de recombinación homóloga en al menos dos órdenes de magnitud usando agrobacterias 5 para suministrar el ADN de reparación a las células vegetales (Puchta et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, p. 5055-5060).

El documento WO 96/14408 describe un AND aislado que codifica la enzima I-SceI. Esta secuencia de ADN se puede 10 incorporar en vectores de clonación y de expresión, estirpes celulares transformadas y en animales transgénicos. Los vectores son útiles en el cartografiado de genes y en la inserción de genes dirigida al sitio.

El documento WO 00/46386 describe métodos para modificar, reparar, atenuar e inactivar un gen u otro AND cromosómico en una célula a través de una ruptura bicatenaria mediante I-SceI. También se describen métodos para tratar o para la profilaxis de una enfermedad genética en un individuo que lo necesite. Se describen además endonucleasas de 20 restricción químéricas.

Chilton y Que (2003, Plant Physiol. 133: p. 956-965) y Tzifira et al. (2003, Plant Physiol. 133: p. 1011-1023) informan que el ADN T se integra preferentemente en rupturas de ADN bicatenarias, inducidas artificialmente por las 25 enzimas que escinden de forma rara I-SceI o I-CeuI. Los informes también incluyeron vectores de ADN T donantes que comprendían un sitio de reconocimiento para la enzima respectiva que escinde de forma rara.

Sin embargo, los métodos en la técnica anterior se 30 basan frecuentemente en la reformación o generación, a través de recombinación homóloga, de un gen marcador seleccionable o identificable intacto.

- 5 -

Por lo tanto, todavía sigue existiendo la necesidad de métodos que permitiesen el intercambio selecto de virtualmente cualquier secuencia de ADN diana mediante un ADN de sustitución. Estos y otros problemas se resuelven como 5 se describe en lo sucesivo en las diferentes realizaciones detalladas de la invención, así como en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

10

En una realización de la invención, se proporciona un método para intercambiar una secuencia de ADN diana en el genoma, particularmente el genoma nuclear, de una planta por una secuencia de ADN de interés, que comprende las siguientes etapas:

a. inducir una primera ruptura de ADN bicatenaria en un sitio preseleccionado en el genoma de una célula de una planta, estando localizado el sitio preseleccionado en 20 la secuencia de ADN diana o en la vecindad de la secuencia de ADN diana;

b. introducir una molécula de ADN de interés en la célula vegetal, comprendiendo la molécula de ADN

25 i. la secuencia de ADN de interés situada entre dos regiones de ADN flanqueantes que tiene al menos un 80% de homología de secuencia, preferiblemente 100% de homología de secuencia, con una región de ADN que flanquea a la secuencia de ADN diana, y preferiblemente que flanquea al sitio preseleccionado en el genoma de la célula vegetal;

30 ii. un gen marcador seleccionable o identificable si-

tuado entre las regiones de ADN flanqueantes, estando situado además el gen marcador seleccionable o identificable entre una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial, que comprende parte de la una de las regiones de ADN flanqueantes, situada en la repetición directa;

5

10

iii. un sitio de reconocimiento para una enzima que escinde de forma rara, inductora de una ruptura de ADN bicatenaria (DSB), situado entre la una de las regiones de ADN flanqueantes y la región de ADN flanqueante parcial situada en la repetición directa;

15

20

25

c. seleccionar una población de células vegetales que comprenden el marcador seleccionable o identificable;

d. seleccionar una célula vegetal en la que la secuencia de ADN de interés (y el marcador seleccionable o identificable) se ha introducido mediante recombinación homóloga a través de las regiones de ADN flanqueantes, y regenerar una planta a partir de la célula vegetal;

e. cruzar la planta regenerada o una planta que desciende de esta última, que comprende el gen marcador seleccionable, con una planta que comprende un gen qui-mérico que codifica la enzima inductora de la ruptura

prendiendo el gen quimérico los siguientes segmentos de ADN enlazados operablemente:

iv. un promotor específico de microspora;

30

- v. una región de ADN que codifica una enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria que reconoce el sitio de reconocimiento situado en el ADN de interés;
- vi. una región de terminación de la transcripción y

de poliadenilación;

- f. seleccionar una planta descendiente (planta F1) que comprende el gen marcador seleccionable o identificable y el gen químérico que codifica la enzima DSBI;
- 5 g. cruzar la planta descendiente con otra planta, con lo que la planta descendiente se usa como donante de polen;
- h. seleccionar una población de plantas descendientes (población F2) que comprenden el gen químérico que codifica la enzima DSBI; y
- 10 i. seleccionar una planta descendiente en la que el gen marcador seleccionable o identificable se suprime mediante recombinación homóloga entre la una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial que comprende parte de la una de las regiones de ADN flanqueantes.

En otra realización de la invención, se proporciona un vector de ADN para intercambiar una secuencia de ADN diana en el genoma de una célula vegetal por una secuencia de ADN de interés a través de la inducción de una ruptura bicatenaria en un sitio preseleccionado dentro de la secuencia diana o en su vecindad, comprendiendo el vector de ADN

- 25
- a. la secuencia de ADN de interés situada entre dos regiones de ADN flanqueantes que tiene al menos un 80% de homología de secuencia, preferiblemente un 100% de homología de secuencia, con una región de ADN que flanquea a la secuencia de ADN diana y que flanquea al sitio preseleccionado;
 - 30 b. un gen marcador seleccionable o identificable situa-

- 8 -

do entre las regiones de ADN flanqueantes, estando situado además el gen marcador seleccionable o identificable entre una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial que comprende parte de la una de las regiones de ADN flanqueantes situada en la repetición directa; y
5 c. un sitio de reconocimiento para una enzima DSBI situado entre la una de las regiones de ADN flanqueantes y la región de ADN flanqueante parcial situada en la repetición directa.
10

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 3 representan diferentes aplicaciones
15 del método para eliminar una subparte seleccionada de un ADN de interés que se introduce o se ha introducido en una célula de una planta. Sólo sirven para ilustración.

La Figura 1 es una representación esquemática comparativa, sólo para referencia, de un método para introducir un ADN de interés que tiene una subparte seleccionada, que comprende un gen marcador seleccionable o identificable, en una célula de una planta, y eliminar subsiguentemente la subparte seleccionada del ADN de
20 interés. Rasgo: representa cualquier secuencia de ADN de interés; DSB: sitio de reconocimiento para una enzima inductora de una ruptura bicanalicular ("DSBIE"); SMG1: gen marcador seleccionable o gen marcador identificable; drs: secuencia de repetición directa; SMG2:
25 gen marcador seleccionable o identificable asociado con el gen químérico que codifica la DSBIE; MSP: promotor específico de microspora; 3': señal de terminación de
30

- 9 -

la transcripción y de poliadenilación;

la Fig. 2 es una representación esquemática de un método que permite la sustitución exacta de una secuencia de ADN diana por una secuencia de ADN de sustitución.
5 DSBI: sitio de reconocimiento para una primera enzima inductora de una ruptura bicatenaria; FS1: secuencia flanqueante 1; FS2: secuencia flanqueante 2; DSB2: sitio de reconocimiento para una segunda enzima inductora de una ruptura bicatenaria; SMG1: gen marcador seleccionable 1 o gen marcador identificable 1; SMG2: gen marcador seleccionable 2 o gen marcador identificable 2; DSBIE: enzima inductora de una ruptura bicatenaria; dr1: secuencia 1 de repetición directa (que es similar o idéntica a la secuencia 2 de repetición directa que es parte de la secuencia flanqueante 2; también indicada aquí como "región de ADN flanqueante parcial"); MSP: promotor específico de microspora; 3': señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación;
10
15
20

la Fig. 3 es una representación esquemática de un método que permite la sustitución exacta de una secuencia de ADN diana por una secuencia de ADN de sustitución similar al método ilustrado en la Fig. 2. En este caso,
25 drI es una secuencia de repetición directa que es parte de la secuencia flanqueante 1 y que es similar o idéntica a la secuencia 2 de repetición directa (dr2).

Realizaciones detalladas de la invención

30

La actual invención se basa en el hallazgo de que secuencias seleccionadas de una molécula de ADN que están

- 10 -

flanqueadas por dos repeticiones directas, y que están situadas en la vecindad de un sitio de reconocimiento para una enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria que escinde de forma rara se pueden eliminar eficazmente cuando 5 la planta que comprende tal ADN se cruza en primer lugar con una planta que comprende un gen químérico que codifica la enzima que escinde de forma rara inductora de una ruptura de ADN bicatenaria bajo el control de un promotor específico de microspora, y el polen de la planta resultante se 10 usa para polinizar una planta receptora.

De este modo, la invención se basa en el uso de una planta que comprende un gen químérico que codifica una endonucleasa que escinde de forma rara, inductora de una ruptura de ADN bicatenaria, bajo el control de un promotor específico de microspora, para eliminar, mediante cruzamiento, 15 un fragmento de ADN situado en la vecindad de un sitio de reconocimiento para la endonucleasa que escinde de forma rara inductora de una ruptura de ADN bicatenaria, y situado además entre dos secuencias situadas en la orientación de 20 la repetición directa (véase la Fig. 1). La expresión de la endonucleasa DSBI que escinde de forma rara en la microspora durante la formación del polen es suficiente para inducir rupturas de ADN bicatenarias, y de ese modo estimula significativamente la recombinación homóloga intracromosómica 25 entre las secuencias repetidas directamente, dando como resultado una eliminación de las secuencias situadas entre estas secuencias repetidas directamente.

Como se usa aquí, una "endonucleasa que escinde de forma rara inductora de una ruptura de ADN bicatenaria" es 30 una enzima capaz de inducir una ruptura de ADN bicatenaria en una secuencia nucleotídica particular, denominada el "sitio de reconocimiento". Las endonucleasas que escinden

de forma rara, también denominadas algunas veces meganucleasas, tienen un sitio de reconocimiento de 14 a 40 nucleótidos consecutivos. Por lo tanto, las endonucleasas que escinden de forma rara tienen una frecuencia de escisión 5 muy baja, incluso en los genomas de plantas superiores. Las endonucleasas codificadas por intrones que actúan sobre el ADN de la propia célula que las sintetiza constituyen una familia de tales endonucleasas que escinden de forma rara. Pueden ser codificadas por intrones, genes independientes o 10 secuencias interviniéntes, y presentan propiedades estructurales y funcionales sorprendentes que las distinguen de las enzimas de restricción más clásicas, habitualmente de los sistemas de tipo II de restricción y modificación bacterianos. Sus sitios de reconocimiento tienen una asimetría 15 general que contrasta con la simetría de diada característica de la mayoría de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Se ha demostrado que varias endonucleasas codificadas por intrones o inteínas, que actúan sobre el ADN de la propia célula que las sintetiza, promueven 20 el movimiento de sus elementos genéticos respectivos a sitios alélicos sin intrones o sin inteínas. Realizando una ruptura bicatenaria específica del sitio en los alelos sin intrones o sin inteínas, estas nucleasas crean extremos recombinogénicos, que se ven envueltos en un proceso de 25 versión génica que duplica la secuencia codificante y conduce a la inserción de un intrón o una secuencia interviniénte al nivel del ADN.

Una endonucleasa de traslado de intrones o inteínas bien caracterizada es I-SceI. I-SceI es una endonucleasa 30 específica del sitio, responsable de la movilidad intrónica en mitocondrias en *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima es codificada por el intrón opcional Sc LSU.1 del gen de ARNr

- 12 -

21S, e inicia una ruptura de ADN bicatenaria en el sitio de inserción del intrón, generando un corte escalonado de 4 pb con salientes 3'-OH. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa I-SceI se extiende a lo largo de una secuencia no simétrica de 18 pb (Colleaux et al. 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6022-6026). La secuencia de aminoácidos para I-SceI y un equivalente de código universal del gen de I-SceI mitocondrial se ha proporcionado mediante, por ejemplo, el documento WO 96/14408. El documento WO 96/14408 describe además un número de variantes de la proteína I-SceI que todavía son funcionales.

La Solicitud PCT PCT/EP04/013122 proporciona variantes de secuencias nucleotídicas sintéticas de I-SceI que se han optimizado para la expresión en plantas. La secuencia nucleotídica de tales regiones codificantes de I-SceI sintéticas se expone en SEC ID No 1 en el código DE IUPAC. Los símbolos del código de IUPAC tienen su significado habitual, es decir, N = A o C o G o T; R = A o G; Y = C o T; B = C o G o T (no A); V = A o C o G (no T); D = A o G o T (no C); H = A o C o T (no G); K = G o T; M = A o C; S = G o C; W = A o T.

En la Tabla I del documento WO 03/004659 (páginas 17 a 20) se proporciona una lista de otras enzimas inductoras de DSB que escinden de forma rara y sus sitios de reconocimiento respectivos. Estos incluyen I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I o PI-Tsp I.

Además, existen métodos para diseñar endonucleasas que escinden de forma rara personalizadas para cada usuario que reconocen básicamente cualquier secuencia nucleotídica diana de elección. De forma breve, las enzimas de restricción químéricas se pueden preparar usando híbridos entre un dominio de dedos de cinc diseñado para reconocer una secuencia nucleotídica específica y el dominio de escisión de ADN no específico procedente de una enzima de restricción natural, tal como FokI. Tales métodos se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 03/080809, WO 94/1831 o WO 95/09233, y en Isalan et al., 2001, Nature Biotechnology 19, 656-660; Liu et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5525-5530. En el documento WO 2004/067736 se describe otra manera de producir meganucleasas personalizadas, mediante selección de una librería de variantes.

Como se usa aquí, "flanqueada por dos secuencias dispuestas en la repetición directa" indica que la secuencia a eliminar de la molécula de ADN introducida está precedida y seguida inmediatamente por dos regiones de ADN, una en cada extremo, en la que dichas dos regiones de ADN son esencialmente similares en secuencia nucleotídica. Las secuencias directamente repetidas no necesitan ser idénticas, sino que pueden variar entre alrededor de 75% y alrededor de 100% de identidad de secuencia. Cuanto más corta sea la secuencia repetida, más restrictivo es preferiblemente el requisito de similitud de secuencia. Sin embargo, a fin de restaurar la secuencia de ADN sin dejar una huella, como se describe después aquí, las secuencias de ADN dispuestas en la repetición directa deberían ser preferiblemente idénticas. Para evitar dudas, si las dos regiones de ADN esencialmente similares en la secuencia nucleotídica están contenidas en una molécula de ADN bícatenario, estas secuencias de ADN se

- 14 -

han de localizar en la misma hebra de ADN, en la misma dirección 5'→3'.

La secuencia de ADN repetida puede tener una longitud de al menos 10, 50 ó 100 nucleótidos, pero por supuesto la 5 secuencia puede ser más larga. Sin embargo, se ha encontrado que las repeticiones mayores que 300 nucleótidos ya no potencian significativamente más la recombinación homóloga intracromosómica dando como resultado la eliminación de la secuencia de ADN situada entre las secuencias de repetición 10 directa.

Para los fines de esta invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias alineadas óptimamente que tienen restos idénticos ($\times 100$) dividido entre el número de posiciones comparadas. Un salto, es decir, una posición en un alineamiento en el que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. El alineamiento de 15 las dos secuencias se lleva a cabo mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch 1970). El alineamiento de secuencias asistido por ordenador se puede llevar a cabo convenientemente usando un programa de software estándar tal como GAP, que es parte del Wisconsin Package 20 Versión 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), usando la matriz de puntuación por defecto con una penalización de creación de salto de 50 y una penalización 25 de extensión de salto de 3.

Aunque el sitio de reconocimiento DSBI está situado 30 preferiblemente entre las secuencias de ADN directamente repetidas, esto no es esencial ni es necesario. De hecho,

- 15 -

el sitio de reconocimiento DSBI podría ser también parte de una de las secuencias de ADN repetidas.

Como se usa aquí, "situada en la vecindad" se refiere a que la DSBI está situada a una distancia entre 500 pb, 1
5 kpb a 10 kpb de las secuencias de ADN directamente repetidas.

Los métodos descritos aquí requieren el uso de un gen quimérico que codifica una enzima inductora de una ruptura bicatenaria que escinde de forma rara, con lo que la región
10 codificante para la endonucleasa está bajo el control de un fragmento de un promotor específico de microspora.

Como se usa aquí, "una región de un promotor específico de microspora" o "un promotor específico de microspora", o un "fragmento de un promotor específico de microspora", es una región promotora o un promotor o fragmento promotor que puede promover selectivamente, preferiblemente de forma específica, la transcripción en la microspora unicelular de una planta. En las plantas angiospermas, la reproducción sexual requiere la producción de gametofitos machos
15 y hembras viables. El polen, como gametofito macho, se forma en la antera y se inicia a partir de células esporógenas, que se desarrollan en meiocitos. El meiocito sufre una meiosis para formar una tétrada de microsporas haploides, que son liberadas subsiguientemente en el lóculo de la antera. Tras la expansión y vacuolización, una mitosis asimétrica de la microspora da como resultado polen bicelular,
20 que contiene una célula vegetativa y una célula generativa. En la mayoría de las especies, el polen se desprende en condición bicelular. Una región de un promotor específico
25 de microspora adecuada se describe en el documento WO 97/30166 (véase también SEC ID No 3) como la región promotora procedente del gen NTM19 en el tabaco. Un fragmento
30

- 16 -

funcional del mismo se ha incorporado en el gen quimérico de los Ejemplos SEC ID No 6). Un fragmento de un promotor específico de microspora podría incluir la secuencia nucleotídica de SEC ID No 3 desde la posición 1 hasta la posición 5 954, o desde la posición 1 hasta la posición 993, o la secuencia nucleotídica de SEC ID No 6 desde la posición 1941 a 2926.

Como se usa aquí, "región codificante de una endonucleasa inductora de una ruptura bicatenaria que escinde de forma rara", o "región codificante de una enzima inductora de una ruptura bicatenaria que escinde de forma rara", es una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que se caracteriza como una enzima DSBI que escinde de forma rara, tal como las endonucleasas codificadas por intrones o 10 inteínas que actúan sobre el ADN de la propia célula que las sintetiza, o las endonucleasas químéricas descritas en cualquier otra parte en esta solicitud. La región codificante puede comprender así cualquier secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 15 las endonucleasas codificadas por intrones o inteínas que actúan sobre el ADN de la propia célula que las sintetiza enumeradas en la siguiente tabla, que se pueden encontrar en las bases de datos públicas con los número de acceso 20 mencionados:

25

Enzima DSBI	Número de acceso
I-AniI	P03880
I-CvuI	P56347
I-CreI	P05725
I-ChuI	032001
I-OpaI - I-CpaIII -	Q39562/ Q8WKZ5/ Q8WKZ6/

- 17 -

I-CpaIV - I-CpaV	Q8WKZ8
I-CpaII	Q39559
I-CeuI	P32761
I-DmoI	P21505
I-SceI	P03882
I-SceII	P03878
I-SceIII	Q9ZZX3
PI-SceI	P17255
I-NanI	025535
I-NitI	Q25567
I-NjaI	025568
I-PpoI	094702
PI-PfuI	073954
PI-PkoI	P77933
PI-PkoII	P77933
PI-PspI	051334
PI-Tfu	P74918
PI-TfuiI	P74918
PI-ThyI	09HH05
PI-ThyII	09HH05
PI-TliI	P30317
PI-TliII	P30317
I-TevI	P13299
I-TevH	P07072
I-TevIII	Q38419

Estará claro que, para la expresión de las endonucleasas bajo el control de un fragmento de un promotor específico de microspora, la región codificante se debería de adaptar de forma que se use el lenguaje de codones universal para codificar los polipéptidos mencionados anterior-

- 18 -

mente. La región codificante se puede optimizar además para la expresión en plantas, y la región codificante sintética tiene una secuencia nucleotídica que se ha diseñado para satisfacer los siguientes criterios:

5

- a) la secuencia nucleotídica codifica una endonucleasa inductora de una ruptura bicatenaria que escinde de forma rara funcional,
- b) la secuencia nucleotídica tiene un contenido de GC de alrededor de 50% a alrededor de 60%,
- c) la secuencia nucleotídica no comprende ninguna secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en GATAAT, TATAAA, AATATA, AATATT, GATAAA, AATGAA, AATAAG, AATAAA, AATAAT, AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTAAA, AATTAA, AATACA y CATAAA;
- d) la secuencia nucleotídica no comprende ninguna secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en ATTTA, AAGGT, GCAAT y ATTGC;
- e) la secuencia nucleotídica no comprende ninguna secuencia seleccionada del grupo que consiste en ATTTA, AAGGT, AGGTA, GGTA o GCAGG;
- f) la secuencia nucleotídica no comprende ningún tramo de GC que consiste en 7 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo de G o C;
- g) la secuencia nucleotídica no comprende ningún tramo de GC que consiste en 5 nucleótidos consecutivos seleccionados del grupo de A o T; y
- h) la secuencia nucleotídica no comprende codones que codifican Leu, Ile, Val, Ser, Pro, Thr, Ala que comprende dupletes TA o CG en las posiciones 2 y 3 (es decir, la secuencia nucleotídica no comprende los codones

30

- 19 -

TTA, CTA, ATA, GTA, TCG, CCG, ACG y GCG) .

La enzima inductora de una ruptura bicatenaria puede comprender, pero no necesita comprender, una señal de localización nuclear (NLS) [Raikhel, Plant Physiol. 100: 1627-1632 (1992) y referencias allí], tales como la NLS del antígeno T grande de SV40 [Kalderon et al. Cell 39: 499-509 (1984)]. La señal de localización nuclear puede estar situada en cualquier parte en la proteína, pero está situada convenientemente en el extremo N-terminal de la proteína. La señal de localización nuclear puede sustituir a uno o más de los aminoácidos de la enzima inductora de la ruptura bicatenaria.

También estará claro que los términos usados para describir el método, tales como "introducción de un fragmento de ADN" así como "regeneración de una planta a partir de la célula", no implica que tal fragmento de ADN necesita necesariamente ser introducido mediante técnicas de transformación. De hecho, estará claro inmediatamente para la persona experta en la técnica que la molécula de ADN de interés también se puede introducir mediante técnicas de reproducción o de cruzamiento de una planta a la otra.

Sin embargo, estará claro que la molécula de ADN de interés se puede introducir en las células vegetales mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo transformación mediada por Agrobacterium, pero también mediante métodos de transferencia directa de ADN. La molécula de ADN transformante se puede transferir a las células vegetales usando cualquier método convencional, incluyendo, pero sin limitarse a, un método de transferencia directa de ADN. Como se usa aquí, "transferencia directa de ADN" es cualquier método de introducción de ADN en células vegeta-

- 20 -

les que no implique el uso de *Agrobacterium spp.* natural y que sea capaz de introducir ADN en células vegetales. Esto incluye métodos bien conocidos en la técnica, tales como la introducción de ADN mediante electroporación en protoplas-
5 tos, la introducción de ADN mediante electroporación en cé-
lulas vegetales intactas o tejidos o células vegetales par-
cialmente degradados, la introducción de ADN a través de la
acción de agentes tales como PEG y similares en protoplas-
tos, el uso de triquitas de silicio, y el bombardeo con mi-
10 croproyectiles revestidos de ADN.

El ADN se puede integrar mediante métodos de recombi-
nación homóloga o de unión de extremos no homólogos que im-
plican una inducción de una ruptura bicanaria en un sitio
preseleccionado, como se describe por ejemplo en el docu-
15 mento PCT/EP04/013122.

En una realización de la invención, el método de eli-
minación se usa en combinación con la inserción, supresión
o sustitución de ADN mediante recombinación homóloga selec-
cionada, y en el que la inserción seleccionada de ADN se
20 logra usando un marcador seleccionable o identificable, se-
guido de la verificación en la población de células vegeta-
les o plantas que comprenden el marcador seleccionable o
identificable de aquellas células vegetales o plantas en
las que la inserción seleccionada de ADN se produjo median-
25 te recombinación homóloga. Cuando se escogen apropiadamente
las secuencias de flanqueo y las repeticiones directas, es-
te método da como resultado la sustitución exacta del ADN
diana por el ADN de interés, sin ningún resto ("huella") de
la molécula de ADN de interés usado para lograr la sustitu-
30 ción. El método de eliminación no necesita además ningún
cultivo *in vitro* adicional, evitando de ese modo que se ge-
neren variaciones somacloniales. En las figuras 2 y 3 se

puede encontrar un esquema del método.

De forma interesante, se ha observado que, usando los métodos como se describe en el documento PCT/EP04/013122 para una inserción seleccionada de ADN extraño de interés mediante recombinación homóloga, esos sucesos de transformación en los que el ADN extraño se inserta de hecho mediante recombinación homóloga representan una proporción relativamente elevada (del orden de 1 a 5%) de la población total de sucesos en los que el ADN se incorpora en el cromosoma vegetal por cualquier medio. En consecuencia, no es necesario basarse en la generación o recreación mediante la recombinación homóloga de una secuencia de ADN que da como resultado un fenotipo reconocible (tal como la creación de un gen marcador seleccionable intacto después de la recombinación homóloga) para identificar aquellos sucesos mediante los cuales el ADN se inserta mediante recombinación homóloga. Más bien, se puede incluir un marcador seleccionable o identificable en la región de ADN entre las secuencias de ADN flanqueantes, seguido del análisis de un número relativamente pequeño de células vegetales o plantas transformadas, para la identificación de aquellos sucesos de transformación en los que la inserción seleccionada de ADN se produjo mediante recombinación homóloga.

De este modo, en esta realización de la invención, se proporciona un método para intercambiar una secuencia de ADN diana en células de una planta por una secuencia de ADN de interés (o un ADN extraño), que comprende las siguientes etapas:

30 inducir una primera ruptura de ADN bicatenaria en un sitio preseleccionado en el genoma de la célula, estando situado el sitio preseleccionado en la secuencia de

ADN diana o en la vecindad de dicha secuencia de ADN diana;

introducir una molécula de ADN de interés (de ADN extraño) en la célula vegetal, con lo que la molécula de ADN comprende los siguientes fragmentos de ADN operablemente enlazados:

i. una molécula de ADN de interés situada entre dos regiones de ADN flanqueantes que tienen al menos 80% de homología de secuencia, preferiblemente 100% de homología de secuencia con una región de ADN que flanquea a la secuencia de ADN diana y que flanquea al sitio preseleccionado en el genoma de la célula vegetal;

ii. un gen marcador seleccionable o identificable situado entre las regiones de ADN flanqueantes, con lo que el gen marcador seleccionable o identificable está situado además entre una de las regiones de ADN flanqueantes y otra copia de al menos parte de la mencionada una de las regiones de ADN flanqueantes situada en la repetición directa (también indicada como secuencia de ADN flanqueante parcial);

iii. un sitio de reconocimiento para una enzima DSBI situado entre la una de las regiones de ADN flanqueantes y la región de ADN flanqueante parcial situada en la repetición directa;

seleccionar una población de células vegetales que comprende el marcador seleccionable o identificable;

seleccionar una célula vegetal en la que se ha introducido mediante recombinación homóloga a través de las regiones de ADN flanqueantes el marcador seleccionable

o identifiable, y regenerar una planta a partir de la célula vegetal;

5 cruzar la planta regenerada o una planta derivada de la misma que comprende el gen marcador seleccionable con una planta que comprende un gen químérico que codifica la enzima DSBI, comprendiendo el gen químérico los siguientes segmentos de ADN enlazados operablemente:

- un promotor específico de microspora;
 - una región de ADN que codifica una enzima inductora de una ruptura de ADN biciatenaria que reconoce el sitio de reconocimiento situado en el ADN de interés;
 - una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación;
- 15
- seleccionar una planta descendiente (planta F1) que comprende el gen marcador seleccionable o identifiable y el gen químérico que codifica la enzima DSBI;
 - cruzar la planta descendiente con otra planta, con lo que la planta descendiente se usa como donante de polen;
 - seleccionar una población de plantas descendientes (población F2) que comprende el gen químérico que codifica la enzima DSBI; y
 - seleccionar una planta descendiente dentro de dicha población F2 en la que el gen marcador seleccionable o identifiable se suprime mediante recombinación homóloga entre la una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial que comprende parte de la una de las regiones de ADN flanqueantes.
- 20
- 25
- 30

De este modo, como se usa aquí, "un sitio preseleccionado" indica una secuencia nucleotídica particular en el genoma nuclear de la planta, situada en o próxima a la secuencia de ADN diana en cuya localización se desea insertar el ADN extraño o intercambiar la secuencia de ADN diana. Una persona experta en la técnica sería capaz de elegir una enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria ("DSBI") que reconoce la secuencia nucleotídica diana seleccionada, 10 o manipular mediante ingeniería tal endonucleasa DSBI. Como alternativa, se puede introducir en el genoma vegetal un sitio de reconocimiento de endonucleasa DSBI usando cualquier método de transformación convencional o mediante reproducción convencional usando una línea vegetal que tiene 15 en su genoma un sitio de reconocimiento de endonucleasa DSBI, y después se puede introducir cualquier ADN extraño deseado en el sitio diana preseleccionado previamente introducido.

Las rupturas de ADN bicatenarias en la molécula de 20 ADN transformante se pueden inducir convenientemente mediante interrupción transitoria de un gen químérico expresaible en la planta que comprende una región promotora expresaible en la planta operablemente enlazada a una región de ADN que codifica una enzima inductora de la ruptura bicatenaria. La región de ADN que codifica una enzima inductora de una ruptura bicatenaria puede ser una región de ADN sintética, tal como, pero sin limitarse a, una región de ADN sintética mediante la cual los codones se eligen según 25 el esquema de diseño como se describe en cualquier otra parte en esta solicitud para regiones codificantes de I-SceI. La propia endonucleasa, como proteína, también se podría introducir en las células vegetales, por ejemplo me-

diente electroporación. Sin embargo, la endonucleasa también se puede proporcionar de una manera transitoria introduciendo, en el genoma de una célula vegetal o planta, un gen químérico que comprende la región codificante de la endonucleasa operablemente enlazada a un promotor inducible expresable en la planta, y proporcionando el compuesto inducible apropiado durante un tiempo limitado antes, durante o inmediatamente después de la introducción de la molécula de ADN transformante. La endonucleasa también se podría proporcionar como un precursor de ARN que codifica la endonucleasa.

La enzima inductora de una ruptura bicatenaria puede comprender, pero no necesita comprender, una señal de localización nuclear (NLS) [Raikhel, Plant Physiol. 100: 1627-1632 (1992) y referencias allí], tal como la NLS del antígeno T grande de SV40 [Kalderon et al. Cell 39: 499-509 (1984)]. La señal de localización nuclear puede estar situada en cualquier parte en la proteína, pero está situada convenientemente en el extremo N-terminal de la proteína. La señal de localización nuclear puede sustituir a uno o más de los aminoácidos de la enzima inductora de una ruptura bicatenaria.

Como se usa aquí, la "secuencia de ADN diana" es la secuencia de ADN situada en el genoma de la célula vegetal que se modifica mediante adición, supresión o sustitución.

Como se usa aquí, "regiones de ADN flanqueantes" son secuencias de ADN que tienen homología con las regiones de ADN respectivamente en dirección 5' o en dirección 3' de la secuencia de ADN diana. Esto permite controlar mejor la inserción del ADN extraño o de la molécula de ADN de interés. De hecho, la integración mediante recombinación homóloga permitirá la unión precisa del fragmento de ADN extraño al

genoma nuclear de la planta hasta el nivel nucleotídico.

Las regiones de ADN flanqueantes pueden variar en longitud, y deberían tener al menos alrededor de 10 nucleótidos de longitud. Sin embargo, la región flanqueante puede 5 ser tan larga como sea prácticamente posible (por ejemplo, hasta alrededor de 100-150 kb, tal como cromosomas artificiales bacterianos completos (BAC)). Preferiblemente, la región flanqueante tendrá alrededor de 50 pb a alrededor de 2000 pb. Además, las regiones que flanquean a la molécula 10 extraña de interés no necesitan ser idénticas a las regiones de ADN que flanquean al sitio preseleccionado, y pueden tener entre alrededor de 80% y alrededor de 100% de identidad de secuencia, preferiblemente alrededor de 95% a alrededor de 100% de identidad de secuencia con las regiones de 15 ADN que flanquean al sitio preseleccionado. Cuanto mayor es la región flanqueante, menos restrictivo es el requisito de la homología. Adicionalmente, se prefiere que la identidad de secuencia sea tan alta como sea prácticamente posible en la vecindad de la localización de la inserción exacta del 20 ADN extraño. Además, para lograr el intercambio de la secuencia de ADN diana sin cambiar la secuencia de ADN de las secuencias de ADN adyacentes, las secuencias de ADN flanqueantes deberían ser preferiblemente idénticas a las regiones de ADN que flanquean al sitio preseleccionado.

25 Además, las regiones que flanquean al ADN extraño de interés no necesitan tener homología con las regiones inmediatamente que flanquean al sitio preseleccionado, sino que pueden tener homología con una región de ADN del genoma nuclear más remota que ese sitio preseleccionado. La inserción 30 del ADN extraño dará entonces como resultado una eliminación del ADN diana entre el sitio de inserción preseleccionado y la región de ADN de homología. En otras pala-

bras, el ADN diana situado entre las regiones de homología se sustituirá por el ADN extraño de interés.

Preferiblemente, el sitio preseleccionado y la secuencia de reconocimiento mencionada además son reconocidos 5 por diferentes endonucleasas inductoras de una ruptura bicatenaria que escinden de forma rara.

La "región de ADN flanqueante parcial" mencionada indica que la región de ADN comprende al menos una porción de la región de ADN flanqueante adyacente a la región de ADN a 10 eliminar y que habitualmente comprenderá el marcador seleccionable o identificable. Está claro que la secuencia de ADN flanqueante parcial también puede tener una longitud igual a la secuencia de ADN flanqueante, o incluso comprender una secuencia de ADN flanqueante más larga.

15 "Marcadores seleccionables o identificables", como se usa aquí, tienen su significado habitual en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, fosfinotricin acetiltransferasa expresable en plantas, neomicina fosfotransferasa, glifosato oxidasa, enzima EPSP tolerante a glifosatos, gen 20 de nitrilasa, gen de acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa mutante, β -glucuronidasa (GUS), genes del locus R, la proteína fluorescente verde, y similares.

La selección de la célula vegetal o planta en la que el marcador seleccionable o identificable y el resto de la 25 molécula de ADN extraño se ha introducido mediante recombinación homóloga a través de las regiones de ADN flanqueantes se puede lograr, por ejemplo, identificando en busca de ausencia de secuencias presentes en el ADN transformante pero situadas fuera de las regiones de ADN flanqueantes. De 30 hecho, la presencia de secuencias del ADN transformante fuera de las regiones de ADN flanqueantes indicaría que las

células vegetales transformadas se originan mediante inserción aleatoria del ADN. Para este fin, se pueden incluir marcadores seleccionables o identificables en la molécula de ADN transformante fuera de las regiones de ADN flanqueantes, que entonces se pueden usar para identificar aquellas células vegetales que no tienen los marcadores seleccionables o identificables situados fuera del ADN transformante y que pueden haber surgido mediante recombinación homóloga a través de las regiones de ADN flanqueantes. Como alternativa, la molécula de ADN transformante puede contener marcadores seleccionables fuera de las regiones de ADN flanqueantes que permiten la selección en busca de la ausencia de tales genes (genes marcadores seleccionables negativos).

Se apreciará que los medios y métodos de la invención se pueden usar en cualquier planta capaz de reproducirse a través de polen, incluyendo plantas de maíz, tabaco, plantas de cereales que incluyen plantas de trigo, avena, cebada, centeno, arroz, césped, sorgo, mijo o caña de azúcar. Los métodos de la invención también se pueden aplicar a cualquier planta (angiospermas o gimnospermas), incluyendo, pero sin limitarse a, algodón, colza con bajo contenido en ácido erúcico, colza, haba de soja, vegetales, patatas, *Lemna spp.*, *Nicotiana spp.*, *Arabidopsis*, alfalfa, cebada, haba, maíz, algodón, lino, guisante, colza, arroz, centeno, alazor, sorgo, haba de soja, girasol, tabaco, trigo, espárrago, remolacha, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, pepino, berenjena, lechuga, cebolla, colza, pimiento, patata, calabaza, rábano, espinaca, calabaza, tomate, calabacín, almendra, manzana, albaricoque, plátano, zarzamora, arándano, cacao, cereza, coco, arándano, dátil, uva, pome-lo, guayaba, kiwi, limón, lima, mango, melón, nectarina,

- 29 -

naranja, papaya, fruta de la pasión, melocotón, cacahuete, pera, piña, pistacho, ciruela, frambuesa, fresa, clementina, nuez y sandía.

Las plantas obtenidas mediante los métodos descritos 5 aquí se pueden cruzar además mediante técnicas de reproducción tradicionales con otras plantas para obtener plantas descendientes que comprenden los sucesos de inserción de ADN seleccionados obtenidos según la presente invención.

Los siguientes Ejemplos no limitantes describen la 10 eliminación de un subfragmento seleccionado a partir de una molécula de ADN introducida usando una enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria, tal como I-SceI, expresada bajo el control de un gen quimérico que codifica un promotor específico de microspora.

En los Ejemplos, excepto que se establezca de otro modo, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, y 15 en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA. Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) de R.D.D. Croy, juntamente publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK. Otras referencias para técnicas de biología molecular estándar incluyen Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Volúmenes I y II de 20 Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Segunda Edición, Academic Press (UK). Los materiales y métodos estándar para las reacciones en cadena de la polimerasa se pueden encon- 25 30

- 30 -

trar en Dieffenbach y Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y en McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania.

5 A lo largo de la descripción y de los Ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

10 SEC ID No 1: secuencia nucleotídica de la región codificante de I-SceI sintética (código IUPAC).

SEC ID No 2: secuencia nucleotídica de la región codificante de I-SceI sintética.

15 SEC ID No 3: secuencia nucleotídica de gen NTM19 selectivo de microspora que incluye la región promotora.

SEC ID No 4: secuencia nucleotídica del ADN T de pTCV63

20 SEC ID No 5: secuencia nucleotídica del ADN T de pTCV64
SEC ID No 6: secuencia nucleotídica del ADN T de pTCV72

EJEMPLOS

25 Eliminación de un gen marcador seleccionable mediante recombinación homóloga intracromosómica (IHR) (sólo como referencia)

30 Se ha desarrollado un ensayo de recombinación para detectar la eliminación de un fragmento de ADN seleccionado basándose en la restauración de un gen de fusión *egfp-bar* tras la eliminación de un gen marcador seleccionable (*hyg*)

(~2000 pb) mediante recombinación homóloga intracromosómica (IHR) entre secuencias directamente repetidas (parte de las secuencias de *egfp*; alrededor de 300 pb o alrededor de 600 pb). Una de las secuencias repetidas está flanqueada por un 5 sitio de reconocimiento de I-SceI (y el dedo de zinc Zif268), dando la posibilidad de crear una DSB entre las repeticiones. A fin de permitir la IHR durante la transición de una generación a la otra, la endonucleasa I-SceI se colocó bajo el control de un promotor específico de micros-
10 para (pNTM19).

Usando técnicas de ADN recombinante estándar, se construyeron las siguientes moléculas de ADN para uso en los siguientes experimentos:

15 1. pTCV63: con secuencias de repetición directa cortas (~300 pb) que contienen los siguientes constructos de ADN enlazados operablemente:

- p35S3: un fragmento promotor de CaMV35S
- egf (corta): una primera parte de la secuencia codificante de eGFP que comprende un solapamiento de 300 pb con la secuencia de GFP nombrada subsiguentemente
- un sitio de reconocimiento para la endonucleasa I-SceI
- un sitio de reconocimiento para la proteína de unión a ADN que contiene el dedo de zinc Zif268
- pCsVMV: un fragmento promotor del virus del mosaico de la avena del casabe
- hyg: una región codificante para resistencia a higromicina

- 32 -

- 3'35S: señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3'
- gfp (corta): la parte de 3' de la secuencia codificante de eGFP, que comprende una repetición directa de secuencias de 300 pb de la porción de egf previa de este plásmido, y en la que la región codificante está enlazada traduccionalmente a una región que codifica un gen bar
- 3'nos: una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3' procedente del gen nopalina sintasa.

Este plásmido se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens*, y la cepa resultante (A4330) se usó para generar plantas de tabaco transgénicas (G7NT001).

2. pTCV64: con secuencias de repetición directa largas (~ 600 pb) que contienen los siguientes constructos de ADN enlazados operablemente:

- p35S3: un promotor de CaMV35S
- egf (larga): una primera parte de la secuencia codificante de eGFP que comprende un solapamiento de 600 pb con la secuencia de GFP nombrada subsiguentemente
- un sitio de reconocimiento para la endonucleasa I-SceI
- un sitio de reconocimiento para la proteína de unión a ADN que contiene el dedo de Zn Zif268
- pCsVMV: un fragmento promotor del virus del mosaico de la avena del casabe
- hyg: una región codificante para resistencia a

higromicina

- 3'35S: señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3'
- gfp (larga): la parte de 3' de la secuencia codificante de egfp, que comprende una repetición directa de secuencias de 600 pb del constructo de egf previo, y en la que la región codificante está enlazada tradicionalmente a una región que codifica un gen bar
- 5 - 3'nos: una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3' procedente del gen nopalina sintasa.
- 10

Este plásmido se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens*, y la cepa resultante (A4364) se usó para generar plantas de tabaco transgénicas (G7NT004).

3. pTCV72:

- pnos: un promotor de nopalina sintasa
- neo: región codificante de neomicina fosfotransferasa II
- 20 3'ocs: una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3' procedente del gen de octopina sintasa;
- pNTM19: un fragmento de promotor específico de microspora
- I-SceI: región codificante para la endonucleasa I-SceI
- 3'nos: una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3' procedente del transcripto de CaMV 35S.
- 25
- 30

- 34 -

Este plásmido se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens*, y la cepa resultante (A4331) se usó para generar plantas de tabaco transgénicas (G7NT005).

A partir de tres líneas de tabaco transformadas de 5 una sola copia independientes de cada G7NT001 y G7NT004, se han realizado cruzamientos con dos líneas transformadas de una sola copia independientes que comprenden el gen quimérico que codifica I-SceI bajo el control de un promotor específico de microspora (G7NT005) usando G7NT005 como la 10 planta macho, con lo que las líneas descendientes se indican según lo siguiente:

G7NT001-0001 x G7NT005-0001 > **04TDNT000001**
G7NT001-0002 x G7NT005-0001 > **04TDNT000002**
15 G7NT001-0003 x G7NT005-0001 > **04TDNT000003**
G7NT001-0001 x G7NT005-0002 > **04TDNT000004**
G7NT001-0002 x G7NT005-0002 > **04TDNT000005**
G7NT001-0003 x G7NT005-0002 > **04TDNT000006**
G7NT004-0001 x G7NT005-0001 > **04TDNT000007**
20 G7NT004-0002 x G7NT405-0001 > (**sin descendencia**)
G7NT004-0003 x G7NT005-0001 > **04TDNT000012**
G7NT004-0001 x G7NT005-0002 > **04TDNT000008**
G7NT004-0002 x G7NT005-0002 > **04TDNT000010**
G7NT004-0003 x G7NT005-0002 > **04TDNT000011**
25

A partir de cada cruzamiento, se han sembrado 200 semillas en Km (200 mg/l), 200 semillas en Hyg (50 mg/l) y 200 semillas en Km (200 mg/l) + Hyg (50 mg/l), para comprobar la transmisión normal de transgenes. Hubo una transmisión bastante normal de los diferentes transgenes para la mayoría de los cruzamientos (obsérvese que, para algunos cruzamientos, se encontraron problemas de contaminación y

- 35 -

problemas de calidad de las semillas (véase la siguiente tabla)):

Número de plantones resistentes al agente selectivo respectivo

5

Línea	nº de plantones/50 semillas	nº de plantones de Km ^R /200 semi-llas	nº de plantones de Hyg ^R /200 semillas	nº de plantones de Km ^R + Hyg ^R /200 semi-llas
G7NT001-0001x G7NT005-0001	32	47/150	55	28/150
G7NT001-0001x G7NT005-0002	32	29	51	15
G7NT001-0002x G7NT005-0001	32	89	64	59
G7NT001-0002x G7NT005-0002	46	69	94	42
G7NT001-0003x G7NT005-0001	47	92	93	53
G7NT001-0003x G7NT005-0002	48	88	85	47
G7NT004-0001x G7NT005-0001	49	92	65/150	44
G7NT004-0002x G7NT005-0001	47	73/150	89	34/150
G7NT004-0002x G7NT005-0002	49	58/150	98	60
G7NT004-0003x G7NT005-0001	39	63	69	50
G7NT004-0003x G7NT005-0002	45	60	91	22

A partir de estos 12 cruzamientos, se transfirieron unas pocas plantas descendientes de Km^R + Hyg^R al invernadero para ser usadas como polinizadoras de plantas SR1 WT.

10 A partir de estos 12 cruzamientos, se han usado cada vez

- 36 -

tres plantas de Km^R + Hyg^R como polinizadoras de plantas SR1 WT según el siguiente esquema:

SR1 x 04TDNT000001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000002-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000003-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000004-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000005-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000006-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000007-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000012-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000008-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000010-001	
-002	
-003	
SR1 x 04TDNT000011-001	
-002	
-003	

A partir de cada descendencia de estos cruzamientos (véanse las siguientes tablas), se han sembrado 50 semillas en un sustrato no selectivo para determinar la frecuencia 10 de la germinación, 50 semillas en canamicina para determinar la tasa de transmisión del gen NTM19-I-SceI, y alrede-

dor de 4000 semillas en PPT para determinar la frecuencia de IHR durante la transición de una generación a la otra. El número de plantones de PPT^R que también son Km^R determina si hay o no un efecto de inducción de DSB por la endonucleasa NTM19-I-SceI sobre la frecuencia de IHR durante la transición de una generación a la otra.

Los resultados del análisis de la descendencia de 22 descendientes se resumen en las tablas A, B y C.

Hay un efecto muy fuerte de NTM19-I-SceI sobre la frecuencia de IHR durante la transición de una generación a la otra puesto que todos los plantones de PPT^R son también Km^R.

Se ha de señalar que una gran parte de los plantones de PPT^R y GFP^F no se desarrollaron posteriormente en plantas y murieron debido al efecto tóxico de GFP.

Tabla A:

Cruzamiento	Frecuencia de germinación (nº de plantones/50 semillas)	Nº de plantones de Km ^R /50 semillas	Plantones de PPT ^R y GFP ^F /nº de semillas	Nº de plantones de Km ^R /nº de plantones de PPT ^R y GFP ^F identificados para Km ^R
SR1x04TDNT000001-001 repetición corta	43	24	77/4348 (1,77%)	5/5
SR1x04TDNT000001-002 repetición corta	49	20	79/4835 (1,63%)	23/23
SR1x04TDNT000001-003 repetición corta	47	22	98/4827 (2,03%)	27/27
SR1x04TDNT000002-001 repetición corta	47	23	33/4762 (0,69%)	4/4
SR1x04TDNT000004-001 repetición corta	49	30	123/4798 (2,6%)	36/36
SR1x04TDNT000004-002	48	23	100/4745	32/32

repetición corta			(2,1%)	
SR1x04TDNT000004-003	48	15	118/4665 (2,5%)	6/6
repetición corta				
SR1 x04TDNT000005-001	49	25	94/4665 (2,01%)	16/16
repetición corta				
SR1x04TDNT000005-002	48	20	47/4690 (1%)	7/7
repetición corta				
SR1x04TDNT000005-003	48	22	120/4658 (2,6%)	16/18 (2 S ó R?)
repetición corta				
SR1x04TDNT000006-001	47	28	136/4665 (2,9%)	24/24
repetición corta				
SR1x04TDNT000006-003	49	20	77/4650 (1,66%)	12/12
repetición corta				

Tabla B:

Cruzamiento	Frecuencia de germinación (nº de plantones/50 semillas)*	Nº de plantones de Km ^R /50 semillas	Plantones de Hyg ^R /50 semillas	Nº de plantones de Km ^R +Hyg ^R /100 semillas	Nº de plantones de PPT ^R y GFP ^F /nº de semillas **	Nº de plantones de Km ^R /nº de plantones de PPT ^R y GFP ^F identificados para Km ^R
SR1x04TDNT00003-001 repetición corta	23	14	12	13	44/4973 (0,89%)**	33/33
SR1x04TDNT00003-003 repetición corta	20	16	11	16	46/4857 (0,95%)**	46/46
SR1x04TDNT00007-001 repetición larga	19	7	7	7	16/4915 (0,33%)**	16/16
SR1x04TDNT00008-001 repetición larga	28	17	12	12	33/4890 (0,7%)**	33/33
SR1x04TDNT00008-003 repetición larga	20	7	8	8	33/4840 (0,69%)**	33/33
SR1x04TDNT00012-003 repetición larga	16	10	9	9	14/4312 (0,32%)**	14/14

* Las descendencias mencionadas en esta tabla se sembraron en el mismo momento. Debido a una esterilización demasiado drástica con lejía, hubo una germinación mala e irregular

(para la mayoría de las líneas <50%). ** Esto significa que el N° de plantones de PPT^R y GFP^F /N° de semillas es una subestimación con al menos un factor de 2 ya que la frecuencia de germinación es para la mayoría de las líneas menor que 50%

Tabla C:

Cruzamiento	Frecuencia de germinación (n° de plantones/50 semillas)*	N° de plantones de Km ^R /50 semillas	Plantones de Hyg ^R /50 semillas	N° de plantones de Km ^R +Hyg ^R /100 semillas	N° de plantones de PPT ^R y GFP ^F /n° de semillas **	N° de plantones de Km ^R /n° de plantones de PPT ^R y GFP ^F identificados para Km ^R
SR1x04TDNT00002-002 repetición corta	50	20	26	9	7/1330 (0,5%)	NT*
SR1x04TDNT00002-003 repetición corta	50	30	18	25	9/1355 (0,66%)	NT*
SR1x04TDNT00003-002 repetición corta	50	20	21	25	24/1389 (1,7%)	NT*
SR1x04TDNT00007-003 repetición larga	50	25	25	17	3/1346 (0,2%)	NT*

*NT: no ensayado todavía

Además, todos los plantones de PPT^R y GFP^F son de hecho sensibles a higromicina, demostrando que el gen *hyg* se ha eliminado de hecho mediante recombinación intracromosómica en el locus de IHR.

Cruzamiento	N° de plantones de Hyg ^R /N° de plantones de PPT ^R y GFP ^F identificados para Hyg ^R
SR1x04TDNTT000012-003	0/11
SR1x04TDNT00008-001	0/12
SR1x04TDNT00008-003	0/11
SR1x04TDNT00001-002	0/8

- 40 -

SR1x04TDNT000005-003	0/7
SR1x04TDNT000006-003	0/7

Para el análisis de segregación de 18 poblaciones descendientes, se puede concluir que hay un efecto muy fuerte de NTM19-I-SceI sobre la frecuencia de IHR durante 5 la transición de una generación a la otra puesto que todos los plantones de PPT^R son también Km^R.

La descendencia de un cruzamiento entre SR1 (hembra) y 04TDNT00000X-00Y se segregará normalmente en:

- 10 25% con sólo endonucleasa NTM19-ISceI
 - 25% con sólo el constructo de IHR
 - 25% tanto con endonucleasa NTM19-I-SceI + constructo de IHR
 - 25% sin endonucleasa NTM19-I-SceI ni constructo de IHR
- 15

El hecho de que todos los plantones de PPT^R sean también Km^R muestra que todos los recombinantes de IHR se producen sólo en la fracción que contiene tanto la endonucleasa I-SceI bajo el control de un promotor específico de microspora NTM19 así como también el constructo de IHR. Los resultados muestran que, en el mejor de los casos, hasta 20 11% de las microsporas que contienen tanto la endonucleasa NTM19-ISceI como el constructo de IHR han sufrido una recombinación homóloga intracromosómica, dando como resultado 25 la restauración de un gen de fusión *egfp-bar* defectuoso (SR1x04TDNT000006-001). Puesto que no se obtuvieron recombinantes de IHR que dan como resultado un gen *egfp-bar* funcional en la fracción que contiene sólo el constructo de IHR, se puede concluir que no se produce la IHR espontánea

- 41 -

(en ausencia de inducción de DSB seleccionada en las microsporas), o, si se produce la IHR espontánea, no da como resultado la restauración de un gen de fusión *egfp-bar* defectuoso. Por el contrario, la IHR inducida por DSB en las 5 microsporas permite una recombinación homóloga intracromosómica más precisa, dando como resultado la restauración de un gen de fusión *egfp-bar* defectuoso.

El análisis de secuencias mostró que no se dejan huellas tras la eliminación del marcador seleccionable mediada 10 por IHR inducida por DSB en las microsporas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer BioScience N.V.
15 D'Halluin, Kathleen
 Ruiter, Rene
- <120> Métodos y medios para eliminar una secuencia de
ADN seleccionada
20
- <130> BCS 05-2007
- <150> EP05075781.4
<151> 04/04/2005
25
- <150> US60/669.243
<151> 04/07/2005
- <160> 6
30
- <170> PatentIn version 3.3

- 42 -

<210> 1
<211> 732
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> región codificante de I-SceI sintética (UIPAC)

<220>
10 <221> variación
<222> (25)..(27)
<223> AGA

<220>
15 <221> variación
<222> (73)..(75)
<223> AGC

<220>
20 <221> variación
<222> (97)..(99)
<223> AGC

<220>
25 <221> variación
<222> (169)..(171)
<223> AGA

<220>
30 <221> variación
<222> (172)..(174)
<223> AGC

- 43 -

<220>
<221> variación
<222> (175) .. (177)
5 <223> AGA

<220>
<221> variación
<222> (268) .. (270)
10 <223> AGC

<220>
<221> variación
<222> (289) .. (291)
15 <223> AGA

<220>
<221> variación
<222> (436) .. (438)
20 <223> AGC

<220>
<221> variación
<222> (490) .. (492)
25 <223> AGC

<220>
<221> variación
<222> (502) .. (504)
30 <223> AGC

<220>

- 44 -

<221> variación
<222> (523) .. (525)
<223> AGC

5 <220>
<221> variación
<222> (565) .. (567)
<223> AGA

10 <220>
<221> variación
<222> (631) .. (633)
<223> AGC

15 <220>
<221> variación
<222> (637) .. (639)
<223> AGC

20 <220>
<221> variación
<222> (712) .. (714)
<223> AGC

25 <220>
<221> variación
<222> (715) .. (717)
<223> AGC

30 <400> 1

- 45 -

atggcyaarc chcchaaraa raarcgsaaa gtsaacatya araaraacca ggtsatgaac	60
ctsggmccha actcmhaarct sctsaaargag tacaartcmc arctsatyga rctsaaacaty	120
garcarttcg argcyggmat cggmctsaty ctsggmgayg cytacatycg stcmcgsgay	180
garggmaara cytactgyat gcagttcgar tggaaraaca argcytacat ggaycaygts	240
tgyctsctst acgaycartg ggtscstcm cchccchcaya araargarcg sgtsaaccay	300
ctsggmaacc tsgtsatyac ytggggmgcy caracyttca arcaycargc yttcaacaar	360
ctsgcsaacc tttcatyct saacaacaar aaracyatyc chaacaacct sgtsgaraac	420
tacctsacyc cyatgtomct sgcytactgg ttcatggayg ayggmggmaa rtggaytac	480
aacaaraact cmacyaacaa rtcmatygts ctsaacacac artcmttcac yttcgargar	540
gtsgartacc tsgtsaargg mctscgsaac aarttccarc tsaactgyta cgtsaagaty	600
aacaaraaca arccyatyat ctacatygay tcmatgtcmt acctsatytt ctacaaccts	660
atyaarccht acctsatycc hcaratgatg tacaarctsc chaacacyat ytcmtcmgar	720
acyttcccta ar	732

<210> 2

<211> 732

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> región codificante de I-SceI sintética

10

<400> 2

- 46 -

atggccaagc ctcccaagaa gaagcgcaaa gtgaacatca agaagaacca ggtgatgaac	60
ctgggaccta acagcaagct cctgaaggag tacaagagcc agctgatcga actgaacatc	120
gagcagttcg aagctggcat cggcctgate ctgggcgatg cctacatcag atcccggac	180
gaaggcaaga cctactgcat gcagttcgag tggaagaaca aggccatcac ggaccacgtg	240
tgtctgctgt acgaccagtg ggtcctgagc ctcctcaca agaaggagcg cgtgaaccat	300
ctggcaacc tcgtgatcac ctggggagcc cagacccatca agcaccaggc cttcaacaag	360
ctggcaacc tggcatcgt gaacaacaag aagaccatcc ccaacaacct cgtggagaac	420
tacctcactc ccatgagcct ggcctactgg ttcatggacg acggaggcaa gtggactac	480
aacaagaaca gcaccaacaa gtcaatttg ctgaacaccc aaagcttac cttcgaagaa	540
gtggagtacc tcgtcaaggg cctgcgcaac aagttccagc tgaactgcta cgtgaagatc	600
aacaagaaca agcctatcat ctacatcgac agcatgagct acctgatctt ctacaacctg	660
atcaagccat acctgatccc tcagatgatg tacaagctgc ccaacaccat cagcagcggag	720
accttcctga ag	732

<210> 3

<211> 1618

5 <212> ADN

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> señal TATA

10 <222> (919) .. (922)

<220>

<221> ARNm

<222> (954) .. (1573)

15

<220>

<221> gen

<222> (993) .. (1271)

<223> NTM19

- 47 -

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (993)..(1271)
 5 <223> región codificante

 <400> 3
 gatccagatt tatagggtcc taatgcgggt actgaacacc aggtgggaaa caaaaaatat 60
 acagaacaac tcctttagaa ttacaattt ttgagcgtgt tggcttggta cgattctact 120
 tttcatatct ctcgtcatct cctaactcct atggttcacc agccaccgat taattatgac 180
 accgctaaca aaaatcttgc gacgacattg agagaaattt ctttcataa attggtaatt 240
 :gtacatcat ttataggcgt tagctataac cttttagtta gtgaatacaa tacttttgc 300
 :attattatg taacttttag atatgaattt actttcaaaa aaaaaaaaaag gatcgatgtt 360
 :gttatcaac taaggaccaa ccactttgga cgtctcacca ctaagttaaa taaatcactt 420
 :gttctcgaa aaaaacccca aaagtgttaa aatgctttc atatcataat caaacaacgt 480
 jattaataaa atctattaag ttaatagaag tagggataa atcgggcaaa agaatttgat 540
 :caaaacccaa ccggtcaaaa aagctgttat tcatataaat ggactataca agttaatacc 600
 :gcttagcaga aattaaatag tttattaagt tgattacaaa acaattccctc atttaaaaaaa 660
 :gttaatgta atcaagagat ctttgcttc taattgatca gacgaggacc cctttatctt 720
 :ttttcttt tcatataaga ttttgaatag atataggaa atcttgttca ctctttatct 780
 :cttcaaatt gcatgcattt taagaattct ctgttatgc aaacttcagt atttatgatt 840
 :acataaaatc aatattcata tttcgataa agttaataac totcctaata cttatgaata 900
 .ctttccctt tacaacccta taaaacccca cactatagct accttcataa ttcatcttag 960
 gtaccaacc ctaaatttct tagtgattaa ccatggctaa gaaaagtctc actttctca 1020

- 48 -

tttgcattt cctacttctc aatttatgtt ttgcaattga gaacgtagaa actatgcaaa	1080
aatcggttc atcgtcacaa gataaaagaat tagattggtt tcatccgtgg ttccatccac	1140
atccatggtg gctacatcca catccatggc cattcggtca tccgccaatg ccagctggcg	1200
gttttcatca tgcattggcca ttccccatc caccgatgcc tgctgggtgg tttaaaggttc	1260
ctcatcaata atttcatcgat catccatggc cattcatgca tccaccagtt ccatctccac	1320
ctaaaggaga caagaattaa ttgaaaatat gaagagaagt gtggatcaa catcttattg	1380
atcacatatt ttcttttagg ttaatatctt taggatttat gtcttaggtt atttttgcata	1440
aaaattaaaa taaatgatcg ttctaggta gttattataa ttcttagat ttttccaagt	1500
agctttcgat ggttagaaatg ttattaattt gattcggctt atcatgaaat aaaatccgta	1560
gttattattgc tttagctttt atgatttgta gttattttat gtgattgtt ctccattt	1618

<210> 4

<211> 4683

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN T de pTCV63

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (191)..(222)

<223> frontera derecha de ADN T

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (270)..(818)

<223> región promotora de CaMV35S

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (819)..(875)

- 49 -

<223> secuencia líder de Cab22

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (885) .. (1391)
 <223> parte 5' de la región codificante de eGFP

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1392) .. (1409)
 <223> sitio de reconocimiento de I-SceI

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1411) .. (1419)
 <223> sitio de reconocimiento de Zif268

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1433) .. (1671)
 <223> región de poliadenilación de 35S de 3' (complemento)

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1683) .. (2708)
 <223> región codificante de resistencia a higromicina (complemento)

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2715) .. (2787)

- 50 -

<223> región líder de CsVMV (complemento)

5 <220>

 <221> misc_feature

 <222> (2788) .. (3227)

 <223> fragmento promotor de CsVMV (complemento)

10 <220>

 <221> misc_feature

 <222> (3269) .. (3787)

 <223> parte de 3' de eGFP

15 <220>

 <221> misc_feature

 <222> (3788) .. (4339)

 <223> región codificante de fosfinotricina acetiltransferasa

20 <220>

 <221> misc_feature

 <222> (4341) .. (4549)

 <223> 3' nos: región de terminación de la transcripción
 y de poliadenilación

25 <220>

 <221> misc_feature

 <222> (4659) .. (4683)

 <223> frontera derecha de ADN T

30 <400> 4

- 51 -

```

agattcgaag ctcggtcccg tgggtgttct gtcgtctcggttgtacaacgaaatccattcc 60
satccgcgc tcaagatggc ttccccctcggtggctaaatcaatctagccg 120
acttgtccgg tgaaaatggc tgca&gt;tccaa cagaaaacaat caaacaaaaca tacacagcga 180
tttattcaca cgcgacaaaat tacaacggta tatatcctgc cagtaactcggtcgacct 240
gtcaggcaatt ggtacctacg tatgcatggc gcgcctatgc caccatacat ggagtcaaaa 300
tttcagatcg aggatctaac agaactcgcc gtgaagactg gcgaacagtt catacagagt 360
tttttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttctgtcaaca tggtgagca cgacactctc 420
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggttat tgagacttt 480

```

- 52 -

caacaaaggg	taatatcggg	aaaccccttc	ggattccatt	gcccgatcat	ctgtcacttc	540
atcaaaaagga	cagtagaaaa	ggaagggtggc	acctacaat	gccatcatttgc	cgataaagga	600
aaggctatcg	ttcaagatgc	ctctgcccac	agtggtccc	aagatggacc	cccacccacg	660
aggagcatcg	tggaaaaaga	agacgttcca	accacgtctt	caaagcaagt	ggattgatgt	720
gatatctcca	ctgacgtta	ggatgacgca	caatcccact	atccttcgca	agacccttcc	780
tctatataag	gaagttcatt	tcatttggag	aggactcgag	ctcatttctc	tattacttca	840
gccataacaa	aagaactctt	ttctcttctt	attaaaccaa	aaccatggtg	agcaagggcg	900
aggagctgtt	caccggggtg	gtgcccattcc	tggtcgagct	ggacggcgac	gtaaacggcc	960
acaagttcag	cgtgtccggc	gagggcgagg	gcgatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	1020
agttcatctg	caccaccggc	aagctgccc	tgccttggcc	caccctcg	accaccctga	1080
cctacggcgt	gcagtgc	tttacc	ccgaccacat	gaagcagcac	gacttcttca	1140
agtccgc	cat	ggttccagg	agcgcaccat	cttcttcaag	gacgacggca	1200
actacaagac	ccgcgcgc	gatgttgc	agggcgacac	cctggtaac	cgcacgc	1260
tgaagggcat	cgacttcaag	gaggacggca	acatcctggg	gcacaagctg	gagtacaact	1320
acaacagcca	caacgtctat	atcatggccg	acaagcagaa	gaacggcatc	aaggtgaact	1380
tcaagatccg	ctagggataa	caggtaatg	gcgtggcg	ccggccccgg	ccgctgtacc	1440
atgcatgatc	tggat	ttttag	tactggattt	tggat	ttttagg	1500
gaagtat	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt
atacataacta	acaaatacaa	atacataacta	agggttctt	atatgtcaa	cacatgagcg	1560
aaaccctata	ggaaccctaa	ttcccttatac	tgggaactac	tcacacatta	ttatggagaa	1620
aatagagaga	gatagat	tttgc	tagagagaga	ctggtgattt	cagcgtgtcc	1680
tcctattcct	ttggccctcg	acgagtgc	ggcgctcg	ttccactatc	ggcgagtact	1740
tctacacagc	catcggtcca	gacggccg	cttctgc	cgat	ttgtgt	1800
gtcccggtc	cggatcg	gat	tcg	catcgacc	gcgc	ccaa
aaattggcg	caaccaagct	ctgatagagt	tgg	caagac	caatgcgg	1920
cggagccg	cgatcctgc	aagctccg	ga	tgcgtcg	cgaa	gtcg
tccat	acaag	ccaa	accac	gg	c	ttgg
ccgaacatcg	cctcg	cttca	gtcaatgacc	gctgttatgc	ggccattgtc	2040
ttgttgg	gac	aaatccgc	gtgcacg	agg	ggcagtc	cteg
agcatcagct	catcg	gagagc	ctgcgc	gac	gcactga	cggtgtcg
tgccagtgat	aca	catgggg	atc	agcaatc	gcgc	atatga
						2220
						2280

- 53 -

tgaccgattc cttgcggtcc gaatgggccg aacccgctcg tctggctaag atcggccga	2340
gcatcgcat ccatggccctc cgccgaccggc tgcagaacag cgggcagttc gggttcaggc	2400
aggctttgca acgtgacacc ctgtgcacgg cgggagatgc aataggtcag gctctcgctg	2460
aattccccaa tgtcaagcac ttccggaatc gggagcgcgg ccgatgc当地 gtgccgataa	2520
acataacgat cttttagaa accatcgccg cagctattta cccgcaggac atatccacgc	2580
cctcctacat cgaagctgaa agcacgagat tcttcgcctt ccgagagctg catcaggtcg	2640
gagacgctgt cgaactttt gatcagaaac ttctcgacag acgtgc当地 gagttcaggc	2700
tttttcatct cgagacaaac ttacaattt ctctgaagtt gtatcctc当地 tacttcaaag	2760
aaaatagctt acaccaaatt ttttcttgtt ttcacaaaatg ccgaacttgg ttcccttat	2820
aggaaaactc aaggggcaaaa atgacacgga 三aaataaaa aggataagta gtgggggata	2880
agattcccccgtt gtgataaggt tactttccgc ctttacattt tccaccc tacatgtcctc	2940
tatgtctt tcacaatcac cgacccattt ttcttctttt cattgttgc gtcagtgc当地	3000
acgtcttcaa gatttttttccgccttgc ttcttctttt caatttctac gtattcttct	3060
tcgtattctg gcagttatagg atcttgc当地 tgc当地 atttgc当地 acataggttgc	3120
catatgtgcc gcataatttgc当地 ctgttcttgc ttcttcttgc当地 atttgc当地 catatgttgc当地	3180
cccgtaaaca ttggatttgc当地 gatgttgc当地 cttggataat tacccgc当地 gccc当地 atgc当地	3240
tacgttagtgc当地 ccaatttgc当地 ggaccggta cggcgtgc当地 tgcttgc当地 gctaccgc当地	3300
ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cggccatgc当地 gaaggctacg tccaggagcg	3360
caccatctt ttc当地 aggacg acggcaacta caagacccgc gccc当地 gaggtgaa agttc当地 gaggg	3420
cgacaccctg gtgaaccgc当地 tc当地 gagctgaa gggcatgc当地 ttcaaggagg acggcaacat	3480
cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa	3540
gcagaagaac ggc当地 atcaagg tgaacttcaa gatccgc当地 aacatgc当地 acggcagcgt	3600
gcagctgc当地 gaccactacc agcagaacac ccccatggc gacggccccc当地 tgctgc当地	3660
cgacaaccac tacctgagca cccagtc当地 cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgc当地	3720
tcacatggc当地 ctgtggagg tgc当地 gaccgc当地 cggccggatc actctcgca tggacgagct	3780
gtacaagatg gacccagaac gacgccc当地 cgc当地 acatccgc当地 cgtgccaccg aggc当地 ggacat	3840
gccggccggc当地 tgc当地 accatcg tcaaccacta catcgagaca agcacggtca acttccgtac	3900
cgagccgc当地 agacccgc当地 agtggacgga cggccatcg local cgtctgc当地 gggccatcc	3960
ctggctcglocal gccc当地 gaggtgg acggc当地 gaggt ggccgc当地 atccacgc当地 gccc当地 ctggaa	4020

- 54 -

ggcacgcaac gcctacgact ggacggccga gtcgaccgtg tacgtctccc cccgccacca	4080
gcggacggga ctgggctcca cgctctacac ccacctgctg aagtccctgg aggcacaggg	4140
cttcaagagc gtggtcgctg tcatacggt gccaaacgac ccgagcgtgc gcatgcacga	4200
ggcgctcga tatcccccc gcgcatgt gcggccggcc ggctcaagc acggaaactg	4260
gcatgacgtg ggtttctggc agctggactt cagcctgccc gtaccgcccc gtccggtcct	4320
gcccgtcacc gagatcttag ctagcacgct tctaggatcc gaagcagatc gttcaaacat	4380
ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tggtgccgt ctgcgtatga ttatcatata	4440
atttctgttg aattacgtta agcatgtat aattaacatg taatgcatga cgtttatttat	4500
gagatgggtt ttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgca tagaaaacaa	4560
aatatacgca gcaaactagg ataaattatc gcgccggtg tcatactatgt tactagatcg	4620
ggaagatcct ctagatacgt agcgatcgcc atggagccat ttacaattga atatatcctg	4680
ccg	4683

<210> 5

<211> 4992

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN T de pTCV64

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (191)..(222)

<223> frontera derecha de ADN T

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (270)..(818)

<223> fragmento promoter de CaMV35S

20

<220>

- 55 -

<221> misc_feature
<222> (819) .. (875)
<223> fragmento líder de cab22

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (885) .. (1553)
<223> parte de 5' de región codificante de eGFP

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1554) .. (1571)
<223> sitio de reconocimiento de I-SceI

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1573) .. (1581)
<223> sitio de reconocimiento de Zif268

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1595) .. (1833)
<223> región de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 35S de 3' (complemento)

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1845) .. (2870)
<223> región codificante de higromicina fosfotransferasa

30 <220>

- 56 -

<221> misc_feature
<222> (2877) .. (2949)
<223> líder de CsVMV (complemento)

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (2950) .. (3389)
<223> fragmento promotor de CsVMV (complemento)

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (3431) .. (4096)
<223> parte de 3' de región codificante de eGFP

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (4097) .. (4648)
<223> región codificante de fosfinotricina acetiltransferasa

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (4650) .. (4858)
<223> 3' nos: región de terminación de la transcripción

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (4968) .. (4992)
<223> secuencia de frontera izquierda de ADN T

30 <400> 5

- 57 -

agattcgaag ctcggtcccg tgggtttct gtcgtcttgt tgtacaacga aatccattcc	60
satccgcgc tcaagatggc ttcccctcgg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg	120
acttgtccgg tgaaatggc tgcactccaa cagaacaaat caaacaaaca tacacagcga	180
tttattcaca cgcgacaaat tacaacggta tatattctgc cagtactcgg ccgtcgacc	240
gcaggcaatt ggtacctacg tatgcattgc ggcctatag caccatacat ggagtcaaaa	300
tttagatcg aggtacatac agaactcgcc gtgaagactg gccaacagtt catacagagt	360
cttttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttctgtcaaca tggtgagca cgacactctc	420
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaaggctat tgagacttt	480
caacaaaggtaaatatcggg aaacctcctc ggattccatt gccctat ctgtcacttc	540
atcaaaagga cagtagaaaaa ggaagggtggc acctacaaat gccatcattt cgataaagga	600
aaggctatcg ttcaagatgc ctctggcag agtggccca aagatggacc cccacccacg	660
aggagcateg tgaaaaaaga agacgttcca accacgttcaa aagcaagt ggattgtatgt	720
gatatacttca ctgacgttaag ggatgtacca caatccccact atccctgtca agacccttc	780
tctatataag gaagttcatt tcattttggag aggactcgag ctcatcttc tattacttca	840
gccataacaa aagaactctt ttctcttattaaaccaa aaccatggtg agcaaggccg	900
aggagctgtt caccggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgcac gtaaacggcc	960
acaagttcag cgtgtccggc gagggcggagg gcgtgccac ctacggcaag ctgaccctga	1020
agttcatctg caccacccggc aagctgcccc tgccctggcc caccctctgt accacccctga	1080
cctacggcgt gcaatgtttc agccgttacc ccgaccacat gaagcagcac gacttctca	1140
agtccggcat gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacccat ctcttcaag gacgacggca	1200
actacaagac ccgcgcggag gtgaagttcg agggcgacac cctggtaac cgcatcgagc	1260
tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatccctgg gcacaagctg gactacaact	1320
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatac aaggtgaact	1380
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga	1440
acaccccccattt cggcgacggc cccgtgttc tgcccgacaa ccactacctg agcaccctgt	1500
ccgccttgag caaagacccc aacgagaagc gcgtcacat ggtctgtcg gagtagggat	1560
aacaggtaa tggcgtggc gaccggcccc ggccgtgtt ccatgtcatga tctggatttt	1620
agtactggat ttgggtttta ggaatttagaa attttattgtat tagaagtatt ttacaaatac	1680
aaatatacatac taagggttttcc ttatatgttc aacacatgag cgaaacccta taggaaccct	1740
aattccctta tctggaaact actcacacat tattatggag aaaatagaga gagatagatt	1800
tgttagagaga gactgggtat ttctacgtgtt ccaagttga tatccatttc ctgtcccttc	1860
ggacgagtgc tggggcggtcg gtttccacta tcggcgagta ctgtacacaca gccatcggtc	1920
cagacggcccg cgatctgtcg ggcgattttgt gtacggccga cagtcggccgc tccggatcg	1980
acgattgcgt cgcatcgacc ctgcgcacaa gctgcacatcat cgaaattgcc gtcaaccaag	2040
ctctgataga gttggtcaag accaatgcgg agcatatacg cccggagccg cggcgatcct	2100

gcaagctccg gatgcctccg ctcgaagtag cgcgctgtcgt gctccataca agccaaccac	2160
ggcctccaga agaagatgtt ggccaccccg tattggaaat ccccgaacat cgccctcgctc	2220
cagtcaatga ccgtgttat gcccattg tccgtcaggc cattgttggc gccgaaatcc	2280
gcgtgcacga ggtgcggac ttccggggcag tcctcgcccc aaagcatcag ctcatcgaga	2340
gcctgcgcga cggacgcact gacgggtgtcg tccatcacag tttgccagtg atacacatgg	2400
ggatcagcaa tcgcgcataat gaaatcacgc catgtagtgt attgaccgtat tccttgccgt	2460
ccgaatgggc cgaacccgct cgtctggcta agatcgccg cagcgatcgc atccatggcc	2520
tccgcgaccg gctgcagaac agcgggcaat tcggttcag gcaggcttgc caacgtgaca	2580
ccctgtgcac ggccggagat gcaataggc aggctctcg tgaattcccc aatgtcaagc	2640
acttccggaa tcgggagcgc ggccgatgca aagtgccat aaacataacg atctttgttag	2700
aaaccatcg ggcagctatt tacccgcagg acatatccac gccctctac atcgaagctg	2760
aaagcacgag attcttcgac ctcgcagagc tgcatcaggc cggagacgct gtcgaacttt	2820
tcgatcagaa acttctcgac agacgtcggt gtgagttcag gctttttcat ctcgagacaa	2880
acttacaat ttctctgaag ttgtatccctc agtacttcaa agaaaatagc ttacacccaa	2940
tttttttttg ttttcacaaa tgccgaacctt ggttccttat ataggaaaac tcaaggccaa	3000
aatgacacg gaaaaatata aaaggataag tagtggggga taagattcct ttgtgataag	3060
gttactttcc gccttacat ttccacctt acatgtgtcc tctatgtctc tttcacaatc	3120
accgaccta tcttcttctt ttcatgttg tcgtcagtgc ttacgtctt aagattctt	3180
tcttcgcctg gttttttttt ttcaattttt acgtattttt cttcgttattc tggcagtata	3240
ggatcttgta tctgtacatt ttcatttt gaacataggt tgcatatgtg cccatattt	3300
atctgcttct tgcgtgaccc acataataact tccatagttt ttccctgtaaa cattggattc	3360
ttgatgtac atcttggata attaccttcg ggcgcacatg catacgttggg taccatgtc	3420
ggggaccgggt gagctggacg ggcacgtaaa cggccacaag ttcaaggctgtt cccggcggg	3480
ccggccat gccacccatg gcaagctgac cctgaagttt atctgcacca cccggcaatgt	3540
cccggtgccc tggcccccaccc tcgtgaccac cctgacccatc ggccgtgcagt gttcagccg	3600
ttaccccgac cacatgaagc agcacgttcc ttcaaggatcc gccatgcccc aaggctacgt	3660
ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccccgcc cccgggtgaa	3720
ttcgaggcc gacaccctgg tgaaccgtt cggactgttgg ggcacgttggact tcaaggagga	3780
ggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat	3840
ccggacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgcacca acatcgagga	3900

- 59 -

cggcagcggtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcgccg acggccccgt	3960
gttgtgtgcgg gacaaccact acctgagcac ccagtccggcc ctgagcaaag accccaaacga	4020
gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgacccgc gcccggatca ctctcgcat	4080
ggacgagctg tacaagatgg acccagaacg acgccccggcc gacatccgccc gtgccaccga	4140
ggcggacatg ccggcggtct gcaccatcgt caaccactac atcgagacaa gcacggtaa	4200
cttccgtacc gagccgcagg aaccgcagga gtggacggac gacccgtcc gtctgcggga	4260
gcgcataccc tggctcgctg ccgaggtgga cggcgaggtc gccggcatcg cctacgcggg	4320
ccccctggaaag gcacgcaacg cctacgactg gacggccgag tcgaccgtgt acgtctcccc	4380
ccgcccaccag cggacgggac tgggctccac gctctacacc cacctgctga agtccctgga	4440
ggcacagggc ttcaagagcg tggtcgctgt catcggtgt cccaaacgacc cgagcgtcgt	4500
catgcacgag gcgcgtcgat atgcccccccg cggcatgctg cggcgccggc gcttcaagca	4560
cgggaactgg catgacgtgg gtttctggca gctggacttc agccctgcgg taccgcggc	4620
tccggtoctg cccgtcaccg agatctgagc tagcacgcgt ctaggatccg aagcagatcg	4680
ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggc ttgcgtatgt	4740
tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtata attaacatgt aatgcgtac	4800
gttatattatg agatgggttt ttatgattag agtcccccaa ttatacattt aatacgcgt	4860
agaaaacaaa atatacgcg caaactagga taaattatcg cgcgcgggtgt catctatgtt	4920
actagatcgg gaagatccctc tagatacgtt gcatcgcca tggagccatt tacaattgaa	4980
tatatacgtc cg	4992

<210> 6

<211> 3987

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN T de pTCV72

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (191)..(222)

<223> frontera derecha de ADN T

- 60 -

<220>
<221> misc_feature
<222> (251)..(539)
5 <223> 3'ocs: región de terminación de la transcripción
y de poliadenilación procedente de un gen de octopina
sintasa (complemento)

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (713)..(1510)
<223> región codificante de neomicina fosfotransferansa
(complemento)

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1511)..(1529)
<223> secuencia enlazadora

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1530)..(1816)
<223> fragmento promoter de nopalina sintasa (comple-
mento)

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1817)..(1929)
<223> secuencia enlazadora

30 <220>
<221> misc_feature

- 61 -

<222> (1941) .. (2926)

<223> fragmento promotor procedente de gen NTM19 del tabaco

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (2928) .. (2961)

<223> señal de localización nuclear

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (2962) .. (3661)

<223> región codificante de I-SceI

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (3665) .. (3913)

<223> fragmento de terminación de la transcripción y de poliadenilación de 3' de 35S

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (3963) .. (3987)

<223> región de frontera izquierda de ADN T

25

<400> 6

- 62 -

agattcgaag ctcggtcccc tgggtgttct gtctgtctcg tgtacaacga aatccattcc	60
cattccgcgc tcaagatggc ttccccctcg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg	120
acttgtccgg tgaaaatgggc tgcactccaa cagaaacaat caaacaaaca tacacagcga	180
cttattcaca cgccgacaaat tacaacggta tatatcctgc cagtactcg ccgtcgacct	240
gcaggcaatt gtttgttatt gtggcgctct atcatagatg tcgctataaaa cctattcagc	300
acaatatatt gttttcattt taatattgta catataagta gtagggtaca atcagtaat	360

tgaacggaga atattattca taaaaatacg atagtaacgg gtgatatatt cattagaatg	420
aaccgaaacc ggccgttaagg atctgagcta cacatgctca ggtttttac aacgtgcaca	480
acagaattga aagcaaatat catgcgatca taggcgttc gcataatctca ttAAAGCAGG	540
gggtggcga agaactccag catgagatcc ccgcgttggaa ggatcatcca gcccggcgtcc	600
cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cggtggaaatc gaaatcttgt	660
gatggcaggt tggcgctc ttggcggttc atttgcgatcc ccagagtccc gctcagaaga	720
actcgtaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgagaatc gggagcggcg ataccgtaaa	780
gcacgaggaa ggggtcagcc cattcgccgc caagcttttc agcaatatca cgggttagcca	840
acgctatgtc ctgatagcgg tccgcacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa	900
agcggccatt ttccaccatg atattcggtca agcaggcattc gccatgggtc acgacgagat	960
cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaaacag ttccggctgc gcgagccccct	1020
gatgcttttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgtc	1080
gctcgatgcg atgttcgtc tggtggtcga atggcaggt agccggatca agcgtatgca	1140
gccgcccgt tgcatcagcc atgatggata ctttcgtggc aggagcaagg tgagatgaca	1200
ggagatcctg ccccgccact tcgccccata gcagccatgc cttcccgct tcagtgcacaa	1260
cgtcgagcac agctgcgc aa ggaacgcggc tgcgtggccag ccacgatgc cgcgtgcct	1320
cgtcctgcag ttcatcagg gcacccgaca ggtcggtctt gacaaaaaga accggcgcc	1380
cctgcgtga cagccggAAC acggcgccat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt	1440
catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccattttgtt	1500
caatccacat gatcatggc cggatcttg attgagatgt aatatgagac tctaattgga	1560
taccgagggg aatttatgga acgtcagtgg agcattttt acaagaata tttgttagct	1620
gatagtgacc ttaggcgact tttgaacgcg caataatggt ttctgacgta tgtgttagc	1680
tcattaaact ccagaaaccc gcggctgagt ggctccctca atcggtgcgg ttctgtcagt	1740
tccaaacgta aaacggcttg tcccggtca tcggcggggg tcataacgtg actccctaa	1800
ttctccgttc atgatctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacat	1860
tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gaattgacgg	1920
gatctatggc gcgcataatg agatttatacg ggtcctaattc cgggtactga acaccaggtg	1980
ggaaacaaaa aatatacaga acaactccctt tagaattttac aattttttag ggtgtttggct	2040
tggtaacgatt ctactttca tatctctgtt catctcctaa ctcctatggt tcaccagcca	2100
ccgattaatt atgacaccgc taacaaaaat cttgcgacga cattgagaga aattttttt	2160

- 64 -

cataaaattgg taattcgtac atcatttata ggcgttagct ataacccttt agttagtgaa	2220
tacaatactt tttgcttatta ttatgttaact tttagatatg aatttacttt caaaaaaaaaa	2280
aaaaggatcg atgttggtta tcaactaagg accaaccact ttggacgtct caccactaag	2340
ttaaataaaat cactttgttc tcgaaaaaaaa ccccaaaagt gtaaaaatgc ttttcatatc	2400
ataatcaaac aacgtgatta ataaaaatcta ttaagttaat agaagtaggg aataaatcg	2460
gcaaaagaat ttgatacща ccaaaccgtt caaaaagct agtattcata taaatggact	2520
atacaagtta ataccagcta gcagaaattta aatagtttat taagttgatt acaaaacaat	2580
tcctcattta aaaaaagttt atgtaatcaa gagatctttt gcttctaatt gatcagacga	2640
ggaccctct tattttatccc cttttccata taagatttt aatagatata gggaaatctt	2700
gttcactctt tatctacttc aaattgcattt cattttaaaga attctctttt tatgcaaact	2760
tcagtattta tgattgacat aaatcaatat tcataatcttcc gataaagttt ataaactctcc	2820
taatacttat gaatatctct tcctttacaa ccctataaaa cccccccacta tagctacctt	2880
cataattcat ctttagagtac caaccctaaa tttcttagtg attaaccatg gctaaacccc	2940
ccaagaagaa ggcgaagggtt aacatcaaaa aaaaccaggta aatgaacctg ggtccgaact	3000
ctaaactgct gaaaagaatac aaatcccagc tgatcgaact gaacatcgaa cagttcgaag	3060
caggtatcgg tctgatcctg ggtgatgctt acatccgttc tctgtatgaa ggtaaaaacct	3120
actgtatgca gttcgagtgg aaaaacaaag catacatgga ccacgtatgt ctgctgtacg	3180
atcagtgggt actgtcccccg ccgcacaaaaa aagaacgtgt taaccacctg ggttaacctgg	3240
taatcacctg gggcgccccag actttcaaac accaagctt caacaaactg gctaaacctgt	3300
tcatcgtaa caacaaaaaa accatcccga acaacctggt tgaaaactac ctgaccccgaa	3360
tgtctctggc atactggttc atggatgatg gtggtaaatg ggattacaac aaaaactctta	3420
ccaacaaatc gatcgtaactg aacacccagt ctttcacttt cgaagaagta gaataccctgg	3480
ttaagggtct gcgtacacaaa ttccaaactga actgttacgt aaaaatcaac aaaaacaaac	3540
cgatcatctt catcgattct atgttacc tgcattttctt caacctgatc aaaccgtacc	3600
tgcattttctt gatgtatgtac aaactgcccga acactatctc ctccgaaact ttctgaaat	3660
agggtctatgc agcttggaca cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctct	3720
ctatcttctt cataataatg tgtgagtagt tccagataa gggatttagg gtccctatag	3780
ggtttgcgtc atgtgtttagt catataagaa acccttagta tgtatgttta tttgtaaaat	3840
acttctatca ataaaatttc taattcctaa aacccaaatc cagttactaaa atccagatca	3900
tgcatggtac agcggcccgcg ttaacgcgtt tactcttagat acgttagcgat cgccatggag	3960
ccatttacaa ttgaatataat cctgccc	3987

REIVINDICACIONES

1.- Un método para intercambiar una secuencia de ADN diana en el genoma de una planta por una secuencia de 5 ADN de interés, que comprende las siguientes etapas:

- a. inducir una primera ruptura de ADN bicatenaria en un sitio preseleccionado en el genoma de una célula de una planta, estando localizado dicho sitio preseleccionado 10 en dicha secuencia de ADN diana o en la vecindad de dicha secuencia de ADN diana;
- b. introducir una molécula de ADN de interés en dicha célula vegetal, comprendiendo dicha molécula de ADN
- 15 i. dicha secuencia de ADN de interés situada entre dos regiones de ADN flanqueantes que tiene al menos un 80% de homología de secuencia con una región de ADN que flanquea dicha secuencia de ADN diana, y preferiblemente que flanquea dicho sitio preseleccionado 20 en el genoma de dicha célula vegetal;
- ii. un gen marcador seleccionable o identificable situado entre dichas regiones de ADN flanqueantes, estando situado además dicho gen marcador seleccionable o identificable entre una de las regiones de ADN flanqueantes y otra copia de al menos parte de dicha 25 una de las regiones de ADN flanqueantes situada en la repetición directa indicada como secuencia de ADN flanqueante parcial;
- iii. un sitio de reconocimiento para una enzima DSBI situado entre dicha una de las regiones de ADN flanqueantes y dicha región de ADN flanqueante parcial 30 situada en la repetición directa;

- c. seleccionar una población de células vegetales que comprenden dicho marcador seleccionable o identificable;
- 5 d. seleccionar una célula vegetal en la que dicho marcador seleccionable o identificable se ha introducido mediante recombinación homóloga a través de dichas regiones de ADN flanqueantes, y regenerar una planta a partir de dicha célula vegetal;
- 10 e. cruzar dicha planta regenerada o una planta descendiente de esta última, que comprende dicho gen marcador seleccionable, con una planta que comprende un gen químérico que codifica la enzima DSBI, comprendiendo dicho gen químérico los siguientes segmentos de ADN enlazados operablemente:
- 15 iv. un promotor específico de microspora;
- v. una región de ADN que codifica una enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria que reconoce dicho sitio de reconocimiento situado en dicho ADN de interés;
- 20 vi. una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación;
- 25 f. seleccionar una planta descendiente (planta F1) que comprende dicho gen marcador seleccionable o identificable y dicho gen químérico que codifica la enzima DSBI;
- 30 g. cruzar dicha planta descendiente con otra planta, con lo que dicha planta descendiente se usa como donante de polen;
- h. seleccionar una población de plantas descendientes

(población F2) que comprenden dicho gen quimérico que codifica la enzima DSBI; y

5 i. seleccionar una planta descendiente en la que dicho gen marcador seleccionable o identificable se suprime mediante recombinación homóloga entre dicha una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial que comprende parte de dicha una de las regiones de ADN flanqueantes.

10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicha primera ruptura bicatenaria en dicho sitio preseleccionado es inducida por introducción de una primera enzima inductora de DSBI, no reconociendo dicha primera enzima inductora de DSBI dicho sitio de reconocimiento para una enzima inductora de DSBI situada en dicho ADN de interés.

15 3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicha primera enzima DSBI y dicha enzima DSBI que reconoce dicho sitio de reconocimiento situado en dicho ADN de interés son dos enzimas DSBI diferentes seleccionadas del grupo
20 de I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I,
25 PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I o PI-Tsp I, o una endonucleasa químérica que comprende un dominio de unión a ADN de dedo de Zn y un dominio de escisión de ADN.

30 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enzima inductora de DSB que reconoce dicho sitio de reconocimiento para una enzima in-

ductora de DSBI situado en dicho ADN de interés es I-SceI.

5.- El método de la reivindicación 4, en el que dicha región de ADN que codifica dicha enzima inductora de una ruptura de ADN bicatenaria comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID No 1 o SEC ID No 2.

6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho promotor específico de microspora comprende un promotor seleccionado de la secuencia nucleotídica de SEC ID No 3 o un fragmento funcional de la misma.

7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho gen quimérico que codifica DSBI comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID No 6 del nucleótido 1941 a 3913.

15 8.- Un vector de ADN para intercambiar una secuencia de ADN diana en el genoma de una célula vegetal por una secuencia de ADN de interés a través de la inducción de una ruptura bicatenaria en un sitio preseleccionado dentro de dicha secuencia diana o en su vecindad, comprendiendo dicho vector de ADN

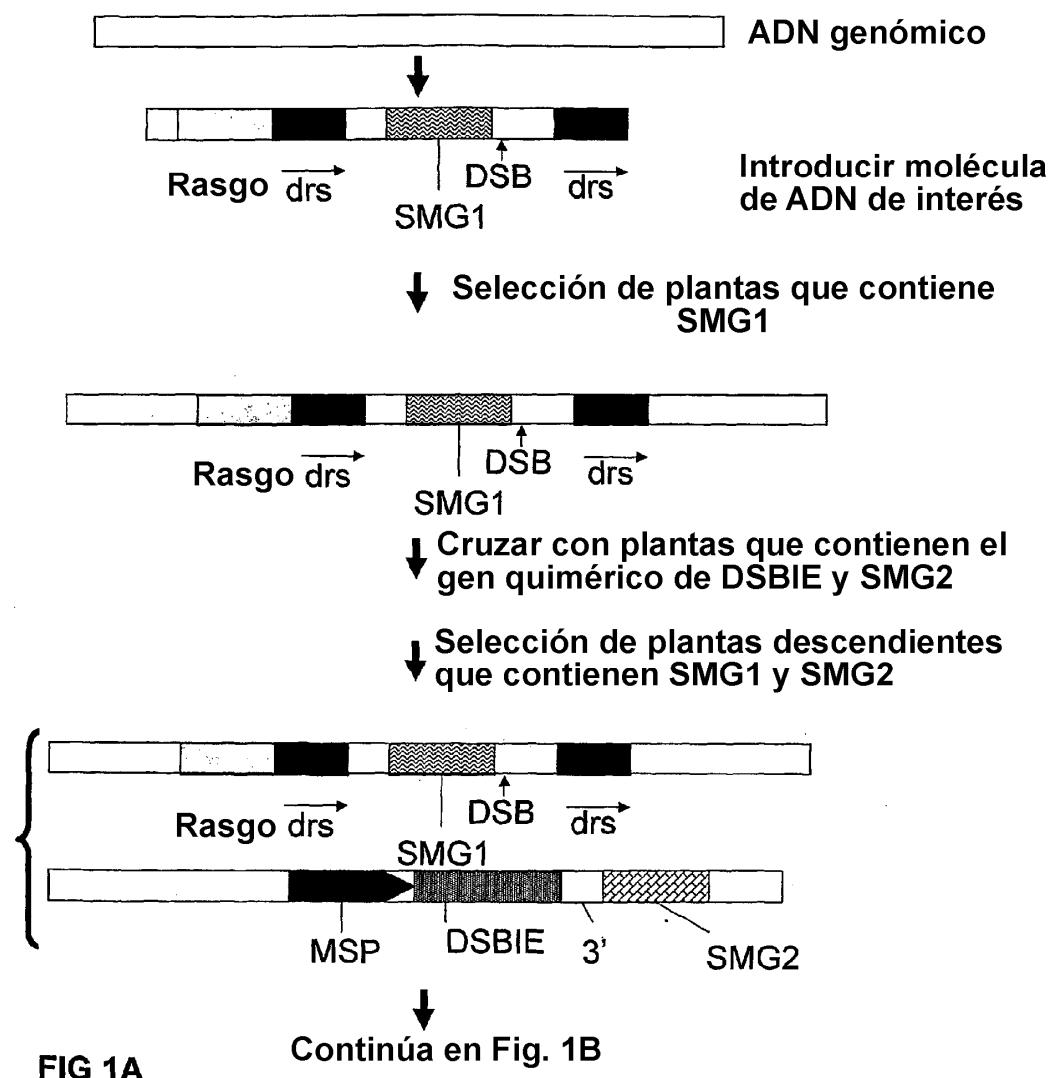
25 a. dicha secuencia de ADN de interés situada entre dos regiones de ADN flanqueantes que tiene al menos un 80% de homología de secuencia con una región de ADN que flanquea a dicha secuencia de ADN diana y que flanquea a dicho sitio preseleccionado;

30 b. un gen marcador seleccionable o identificable situado entre dichas regiones de ADN flanqueantes, estando situado además dicho gen marcador seleccionable o identificable entre una de las regiones de ADN flanqueantes y una región de ADN flanqueante parcial que comprende parte de dicha una de las regiones de ADN flanqueantes

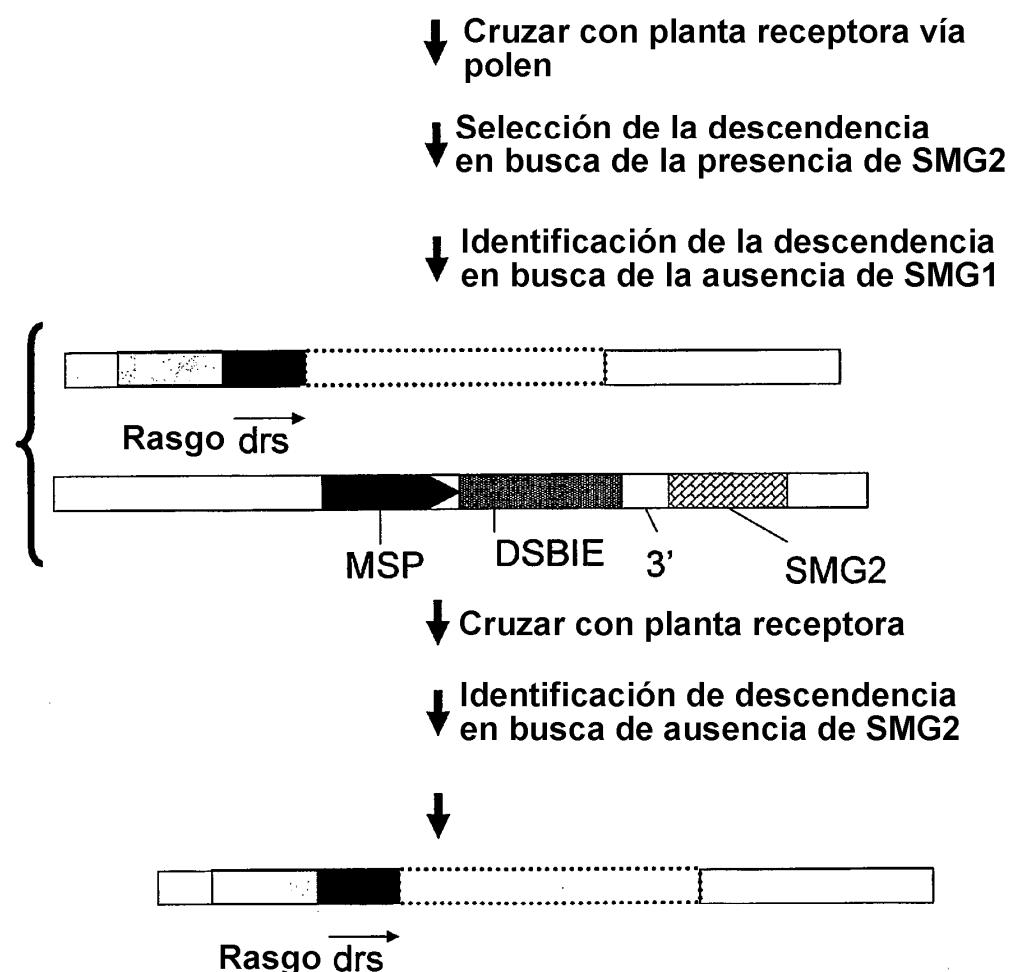
- 69 -

situada en la repetición directa; y
c. un sitio de reconocimiento para una enzima DSBI si-
tuado entre dicha una de las regiones de ADN flanquean-
tes y dicha región de ADN flanqueante parcial situada
5 en la repetición directa.

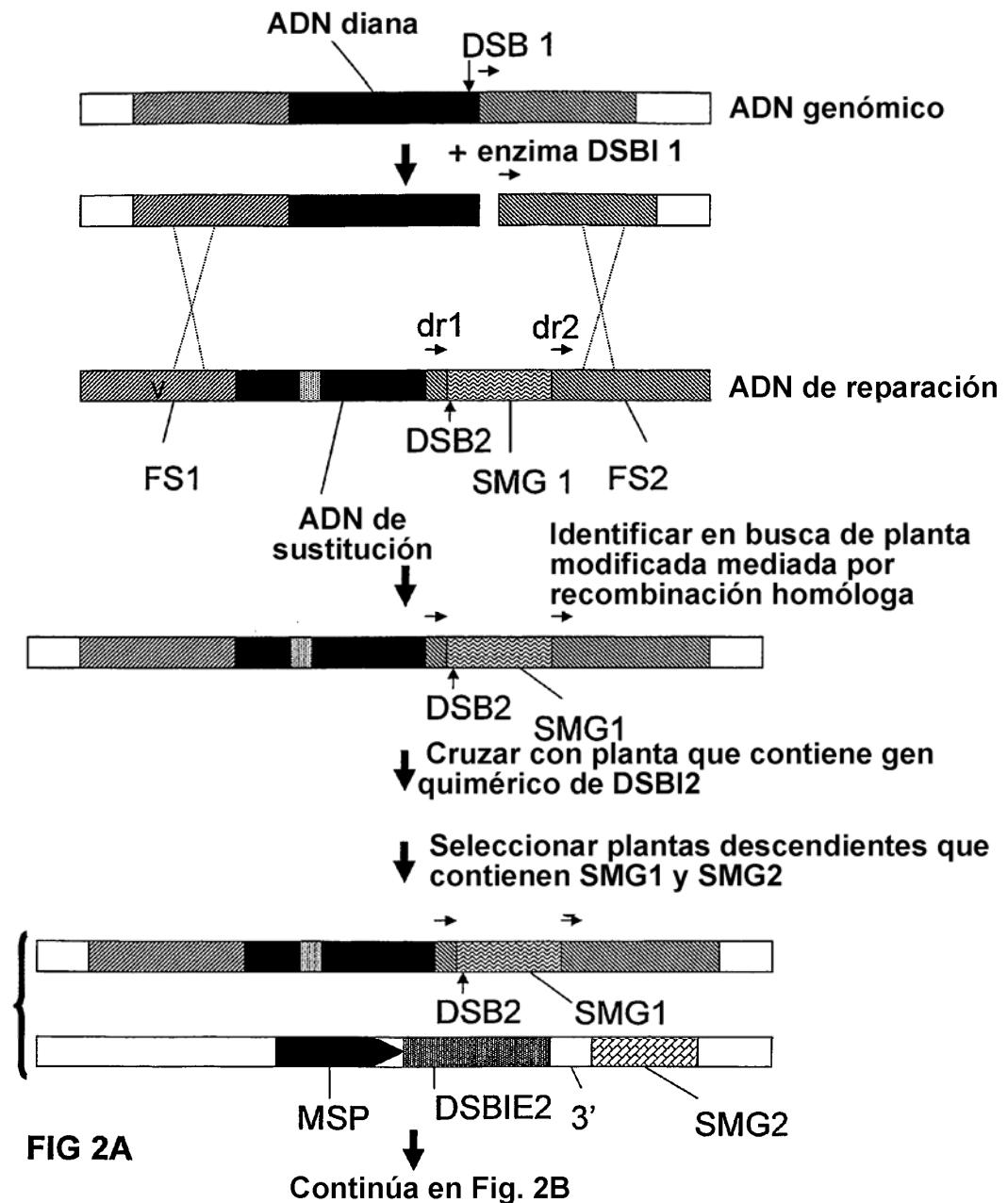
- 70 -

**FIG 1A****Continúa en Fig. 1B**

Continuación de la Fig. 1A

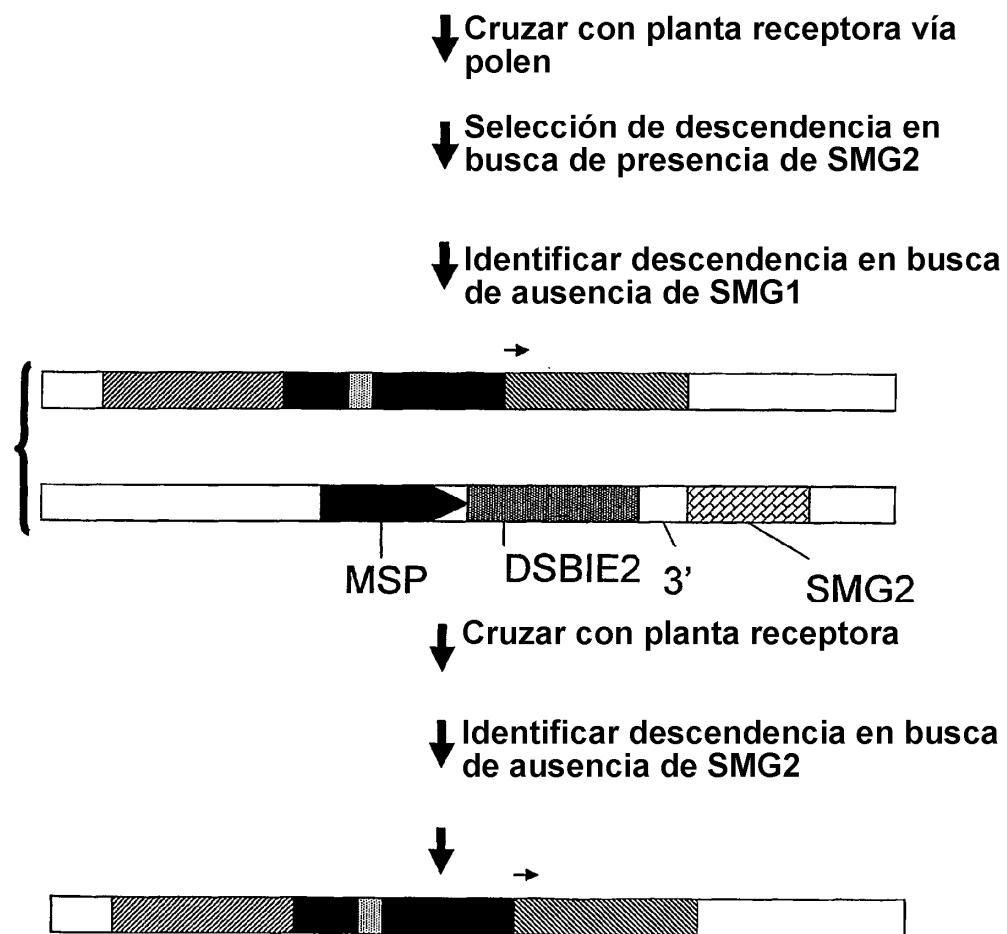
**FIG 1B**

- 72 -

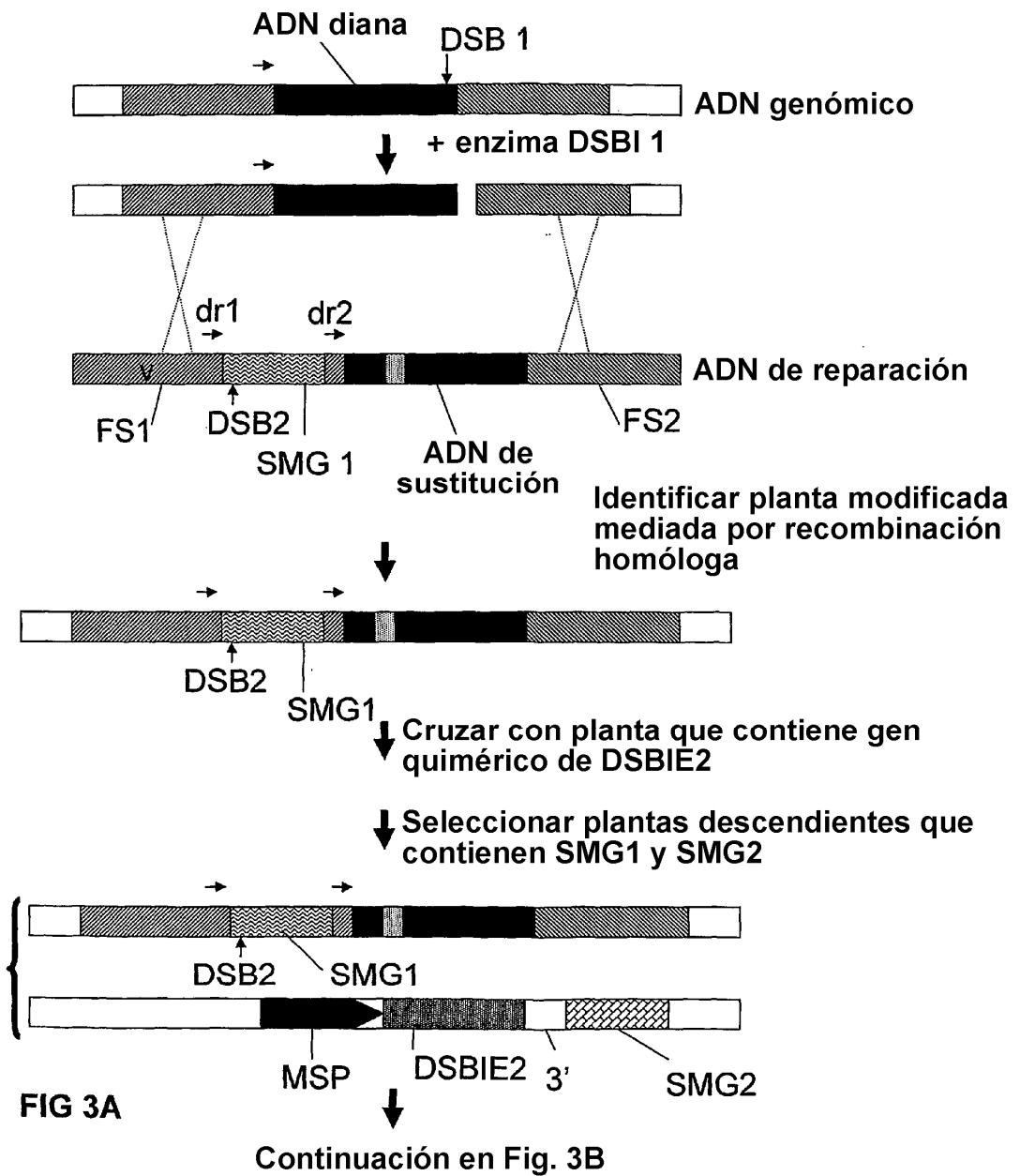


- 73 -

Continuación de Fig. 2A

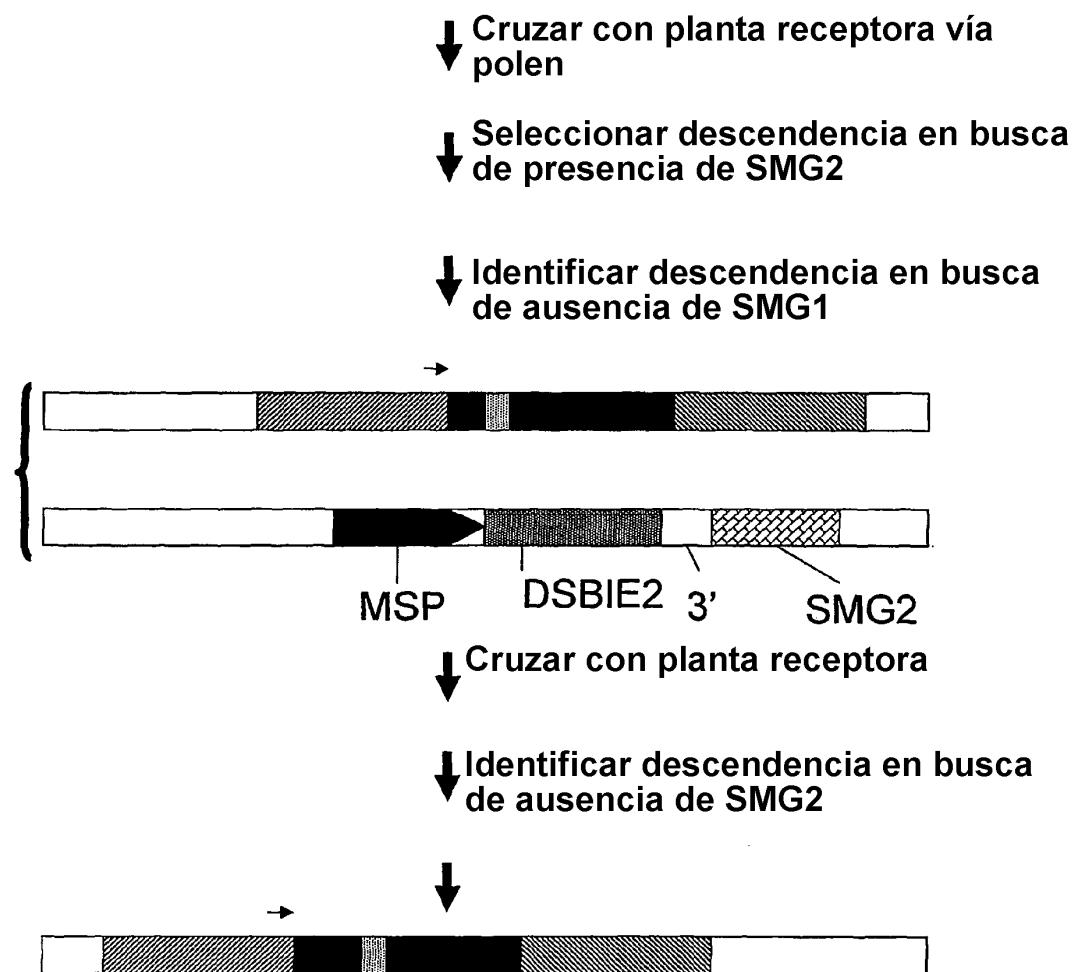
**FIG 2B**

- 74 -



- 75 -

Continuación de Fig. 3A

**FIG 3B**