



19



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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

73

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

72

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

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 354 109 T3

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

DESCRIPCIÓN

**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
10 marcador seleccionable o identificable usado durante la fase de recombinación homóloga para la selección temporal de los sucesos de sustitución génica se puede eliminar subsiguientemente 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
20 que se han convertido subsiguientemente 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
25 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 Bio-
30 Technology 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 eucariotas. El documento también se refiere a organismos transgénicos (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 identificar 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 células.
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 estructura genética alterada con relación a la estructura genética del transgén en la primera célula vegetal transgénica, debido 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 específico de microsporas del tabaco, que se pueden usar para la expresión de genes en microsporas.

El problema que se ha resuelto por la presente invención se refiere al intercambio seleccionado y exacto a través de recombinación homóloga de una secuencia de ADN diana
30 en una célula de una planta por una secuencia de ADN de

- 3 -

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 enmascarados 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-

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 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 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 restricción quiméricas.

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 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 basan frecuentemente en la reformación o generación, a través de recombinación homóloga, de un gen marcador seleccionable o identificable intacto.

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 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:

15

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 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

20

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;

ii. un gen marcador seleccionable o identificable si-

30

- 5 tuado entre las regiones de ADN flanqueantes, estando
situado además el gen marcador seleccionable o iden-
tificable entre una de las regiones de ADN flanquean-
tes y una región de ADN flanqueante parcial, que com-
prende parte de la una de las regiones de ADN flan-
queantes, situada en la repetición directa;
- 10 iii. un sitio de reconocimiento para una enzima que
escinde de forma rara, inductora de una ruptura de
ADN bicatenaria (DSBI), situado entre la una de las
regiones de ADN flanqueantes y la región de ADN flan-
queante parcial situada en la repetición directa;
- 15 c. seleccionar una población de células vegetales que
comprenden el marcador seleccionable o identificable;
- 20 d. seleccionar una célula vegetal en la que la secuen-
cia 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;
- 25 e. cruzar la planta regenerada o una planta que des-
ciende 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
bicatenaria ("DSBI") que escinde de forma rara, com-
prendiendo el gen quimérico los siguientes segmentos de
ADN enlazados operablemente:
- 30 iv. un promotor específico de microspora;
- v. una región de ADN que codifica una enzima inducto-
ra 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;

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

20 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 flan-
- 30 quea a la secuencia de ADN diana y que flanquea al sitio preseleccionado;
- b. un gen marcador seleccionable o identificable situa-

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 DSBIE 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 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.

15

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 subsiguientemente la subparte seleccionada del ADN de interés. Rasgo: representa cualquier secuencia de ADN de interés; DSB: sitio de reconocimiento para una enzima inductora de una ruptura bicatenaria ("DSBIE"); SMG1: gen marcador seleccionable o gen marcador identificable; drs: secuencia de repetición directa; SMG2: gen marcador seleccionable o identificable asociado con el gen quimérico que codifica la DSBIE; MSP: promotor específico de microspora; 3': señal de terminación de

20

25

30

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. DSB1: 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;

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, dr1 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

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 quimérico 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 quimérico 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 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
20 significativamente la recombinación homóloga intracromosómica 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 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 secuencias intervinientes, 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 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 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 conversión génica que duplica la secuencia codificante y conduce a la inserción de un intrón o una secuencia interviniente al nivel del ADN.

Una endonucleasa de traslado de intrones o inteínas bien caracterizada es I-SceI. I-SceI es una endonucleasa 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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 reconoci-
 25 miento 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,
 30 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 quiméricas 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 bicatenario, estas secuencias de ADN se

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
10 secuencia de ADN situada entre las secuencias de repetición 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 ópti-
15 mamente 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
20 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
25 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 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,

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 pro-
15 motor 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 y hembras viables. El polen, como gametofito macho, se forma en la antera y se inicia a partir de células esporóge-
20 nas, 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, 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

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 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 inteínas que actúan sobre el ADN de la propia célula que las sintetiza, o las endonucleasas quiméricas 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 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 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/

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-

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, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTTAA, 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

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-

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 protoplastos, la introducción de ADN mediante electroporación en células vegetales intactas o tejidos o células vegetales parcialmente degradados, la introducción de ADN a través de la acción de agentes tales como PEG y similares en protoplastos, el uso de triquitas de silicio, y el bombardeo con microproyectiles revestidos de ADN.

El ADN se puede integrar mediante métodos de recombinación homóloga o de unión de extremos no homólogos que implican una inducción de una ruptura bicatenaria en un sitio preseleccionado, como se describe por ejemplo en el documento PCT/EP04/013122.

En una realización de la invención, el método de eliminación se usa en combinación con la inserción, supresión o sustitución de ADN mediante recombinación homóloga seleccionada, y en el que la inserción seleccionada de ADN se logra usando un marcador seleccionable o identificable, seguido de la verificación en la población de células vegetales 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 mediante recombinación homóloga. Cuando se escogen apropiadamente las secuencias de flanqueo y las repeticiones directas, este 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 sustitución. El método de eliminación no necesita además ningún cultivo *in vitro* adicional, evitando de ese modo que se generen variaciones somaclonales. 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
5 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
15 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
25 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 identificable, y regenerar una planta a partir de la célula vegetal;

cruzar la planta regenerada o una planta derivada de la misma que comprende el gen marcador seleccionable con una planta que comprende un gen quimérico que codifica la enzima DSBI, comprendiendo el gen quimérico 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 bicatenaria que reconoce el sitio de reconocimiento situado en el ADN de interés;
 - una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación;
- seleccionar una planta descendiente (planta F1) que comprende el gen marcador seleccionable o identificable y el gen quimérico 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 quimérico que codifica la enzima DSBI; y
- seleccionar una planta descendiente dentro de dicha población F2 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.

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, 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 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 ADN transformante se pueden inducir convenientemente mediante interrupción transitoria de un gen quimérico expresable en la planta que comprende una región promotora expresable 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 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-

dante 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 quimérico 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 del ADN extraño dará entonces como resultado una eli-
30 minación 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 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 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.

"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 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 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 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, pomelo, guayaba, kiwi, limón, lima, mango, melón, nectarina,

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.

15 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
20 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
25 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-
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:

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

10

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

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

15

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

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

20

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 cinc 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 pora (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
 - 20 - egf (corta): una primera parte de la secuencia codificante de eGFP que comprende un solapamiento de 300 pb con la secuencia de GFP nombrada subsiguientemente
 - un sitio de reconocimiento para la endonucleasa I-SceI
 - 25 - 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
 - 30 - 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 subsiguientemente
- 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 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 (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
- 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 transcrito de CaMV 35S.

- 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 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 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

30

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

5 Número de plántones resistentes al agente selectivo respectivo

Línea	n° de plántones/50 semillas	n° de plántones de Km ^R /200 semillas	n° de plántones de Hyg ^R /200 semillas	n° de plántones de Km ^R + Hyg ^R /200 semillas
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

5

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 de la germinación, 50 semillas en canamicina para determinar la tasa de transmisión del gen NTM19-I-SceI, y alrede-

10

dor de 4000 semillas en PPT para determinar la frecuencia de IHR durante la transición de una generación a la otra. El número de plántones 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

5 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

10 frecuencia de IHR durante la transición de una generación a la otra puesto que todos los plántones de PPT^R son también Km^R.

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

15

Tabla A:

Cruzamiento	Frecuencia de germinación (n° de plántones/50 semillas)	N° de plántones de Km ^R /50 semillas	Plántones de PPT ^R y GFP ^F /n° de semillas	N° de plántones de Km ^R /n° de plántones 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%)	
SR1x04TDNT0000004-003	48	15	118/4665	6/6
repetición corta			(2,5%)	
SR1 x04TDNT0000005-001	49	25	94/4665	16/16
repetición corta			(2,01%)	
SR1x04TDNT0000005-002	48	20	47/4690	7/7
repetición corta			(1%)	
SR1x04TDNT0000005-003	48	22	120/4658	16/18 (¿2 S ó
repetición corta			(2,6%)	R?)
SR1x04TDNT0000006-001	47	28	136/4665	24/24
repetición corta			(2,9%)	
SR1x04TDNT0000006-003	49	20	77/4650	12/12
repetición corta			(1,66%)	

Tabla B:

[illegible]

(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
SR1x04TDNT000002-002 repetición corta	50	20	26	9	7/1330 (0,5%)	NT*
SR1x04TDNT000002-003 repetición corta	50	30	18	25	9/1355 (0,66%)	NT*
SR1x04TDNT000003-002 repetición corta	50	20	21	25	24/1389 (1,7%)	NT*
SR1x04TDNT000007-003 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
5 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
SR1x04TDNT000008-001	0/12
SR1x04TDNT000008-003	0/11
SR1x04TDNT000001-002	0/8

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 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:

- 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 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 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

	<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

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

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

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

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

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

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

<220>

	<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
ctsggmeccha actcmaarct sctsaargag tacaartcmc arctsatyga rctsaacaty	120
garcarttcg argcyggmat cggmctsaty ctsggmgayg cytacatycg stcmcgsgay	180
garggmaara cytactgyat gcagttcgar tggaaraaca argcytacat ggaycaygts	240
tgycstctst acgaycartg ggtstctstcm cchcchcaya araargarcg sgtsaaccay	300
ctsggmaacc tsgtsatyac ytggggmgy caracyttca arcaycargc yttcaacaar	360
ctsgcsaacc tsttcatyct saacaacaar aaracyatyc chaacaacct sgtsgaraac	420
tacctsacyc cyatgtcmct sgcytactgg ttcattggayg ayggmggmaa rtgggaytac	480
aacaaraact cmacyaacia rtcmatygts ctsaacacyc artcmttcac yttcgargar	540
gtsgartacc tsgtsaargg mctscgsaac aartccarc tsaactgyta cgtsaagaty	600
aacaaraaca arccyatyat ctacatygay tcmatgtcmt acctsatytt ctacaaccts	660
atyaarccht acctsatycc hcaratgatg tacaartcsc chaacacyat ytcmtcmgar	720
acyttcctsa ar	732

<210> 2

<211> 732

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> región codificante de I-SceI sintética

10

<400> 2

- 46 -

```

atggccaagc ctccaagaa gaagcgcaaa gtgaacatca agaagaacca ggtgatgaac      60
ctggggaccta acagcaagct cctgaaggag tacaagagcc agctgatcga actgaacatc      120
gagcagttcg aagctggcat cggcctgata ctgggcgatg cctacatcag atcccgggac      180
gaaggcaaga cctactgcat gcagttcgag tggaagaaca aggcctacat ggaccacgtg      240
tgtctgctgt acgaccagtg ggtcctgagc cctcctcaca agaaggagcg cgtgaaccat      300
ctgggcaacc tcgtgatcac ctggggagcc cagaccttca agcaccaggc cttcaacaag      360
ctggccaacc tgttcatcgt gaacaacaag aagaccatcc ccaacaacct cgtggagaac      420
tacctcactc ccatgagcct ggcctactgg ttcattggacg acggaggcaa gtgggactac      480
aacaagaaca gcaccaacaa gtcaattgtg ctgaacaccc aaagcttcac cttcgaagaa      540
gtggagtacc tcgtcaaggg cctgcgcaac aagttccagc tgaactgcta cgtgaagatc      600
aacaagaaca agcctatcat ctacatcgac agcatgagct acctgatctt ctacaacctg      660
atcaagccat acctgatccc tcagatgatg tacaagctgc ccaacaccat cagcagcgag      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

<220>

<221> misc_feature

<222> (993)..(1271)

5 <223> región codificante

<400> 3

gatccagatt tataggggtcc taatgcgggt actgaacacc aggtgggaaa caaaaaatat	60
acagaacaac tcctttagaa tttacaattt ttgagcgtgt tggcttggtg cgattctact	120
tttcatatct ctcgcatct cctaactcct atgggtcacc agccaccgat taattatgac	180
accgctaaca aaaatcttgc gacgacattg agagaaattt cttttcataa attggttaatt	240
cgtagatcat ttataggcgt tagctataac ctttttagtta gtgaatacaa tactttttgc	300
ctattattatg taacttttag atatgaattt actttcaaaa aaaaaaaaaag gatcgatggt	360
tggtatcaac taaggaccaa ccactttgga cgtctcacca ctaagttaaa taaatcactt	420
ctgtctcgaa aaaaacccca aaagtgttaa aatgcttttc atatcataat caaacaacgt	480
gattaataaa atctattaag ttaatagaag tagggaataa atcgggcaaa agaatttgat	540
ctcaaaccaaa ccgggtcaaaa aagctagtat tcatataaat ggactataca agttaatacc	600
tgctagcaga aattaaatag tttattaagt tgattacaaa acaattcctc atttaaaaaa	660
tgtaaatgta atcaagagat cttttgcttc taattgatca gacgaggacc cctcttattt	720
cttttctttt tcatataaga ttttgaatag atatagggaa atcttggtca ctctttatct	780
cttcaaaatt gcatgcattt taagaattct ctttgatgac aaacttcagt atttatgatt	840
ctacataaatc aatattcata tcttcgataa agttaataac tctcctaata cttatgaata	900
ctcttcctt tacaacccta taaaaccccc cactatagct accttcataa ttcattcttag	960
gtaccaacc ctaaatttct tagtgattaa ccatggctaa gaaaagtctc acttttctca	1020

- 48 -

```

tttgcatTTT cctacttctc aatttatgtt ttgcaattga gaacgtagaa actatgcaaa 1080
aatcggattc atcgtcacaa gataaagaat tagattgggt tcatccgtgg ttccatccac 1140
atccatgggt gctacatcca catccatggc cattcggtca tccgccaatg ccagctggcg 1200
gttttcatca tgcattggcca ttcccccatc caccgatgcc tgetgggtgt ttttaagtttc 1260
ctcatcaata atttcatcgt catccatggc cattcatgca tccaccagtt ccattctccac 1320
ctaaaggaga caagaattaa ttgaaaatat gaagagaagt gttggatcaa catcttattg 1380
atcacatatt tttctttagg ttaatatctt taggatttat gtcttaggtt atttttgata 1440
aaaattaaaa taaatgatcg ttctagggtt gttattataa tttcttagat ttttccaagt 1500
agctttcgat ggtagaaatg ttattaattt gattcggctt atcatgaaat aaaatccgta 1560
gtattattgc tttagctttt atgatttgta gttattttat gttgattgtt 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)

<223> secuencia líder de Cab22

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (885)..(1391)

<223> parte 5' de la región codificante de eGFP

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1392)..(1409)

<223> sitio de reconocimiento de I-SceI

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1411)..(1419)

<223> sitio de reconocimiento de Zif268

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (1433)..(1671)

<223> región de poliadenilación de 35S de 3' (complemento)

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (1683)..(2708)

<223> región codificante de resistencia a higromicina (complemento)

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (2715)..(2787)

<223> región líder de CsVMV (complemento)

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (2788)..(3227)

<223> fragmento promotor de CsVMV (complemento)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (3269)..(3787)

<223> parte de 3' de eGFP

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (3788)..(4339)

<223> región codificante de fosfinotricina acetiltransferasa

<220>

20 <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

agattcgaag ctcggtcccg tgggtgttct gtcgtctcgt tgtacaacga aatccattcc	60
attccgcgc tcaagatggc tccccctcgg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg	120
acttgtccgg tgaaatgggc tgcaâcctcaa cagaaacaat caaacaacaa tacacagcga	180
ttattcaca cgcgacaaat tacaacggta tatatcctgc cagtactcgg ccgtcgacct	240
gcaggcaatt ggtacctacg tatgcatggc gcgccatatg caccatacat ggagtcaaaa	300
attcagatcg aggatctaac agaactcgcc gtgaagactg gcgaacagtt catacagagt	360
ttttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tggaggagca cgacactctc	420
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggtat tgagactttt	480

caacaaaggg taatatcggg aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttc	540
atcaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat gccatcattg cgataaagga	600
aaggctatcg ttcaagatgc ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccacccaag	660
aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt	720
gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc	780
tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggactcgag ctcatctctc tattacttca	840
gccataacaa aagaactctt ttctcttctt attaaaccaa aaccatggtg agcaagggcg	900
aggagctgtt caccgggggtg gtgcccctcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggc	960
acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga	1020
agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgag accaccctga	1080
cctacggcgt gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca	1140
agtccgccat gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca	1200
actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc	1260
tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gactacaact	1320
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact	1380
tcaagatccg ctagggataa cagggtaatg gcgtggcgca ccgggtcccg ccgctgtacc	1440
atgcatgac tggatttttag tactggattt tggtttttag aattagaaat ttatttgata	1500
gaagtatttt acaaatacaa atacatacta agggtttctt atatgtcaa cacatgagcg	1560
aaacctata ggaacctaa ttcccttacc tgggaactac tcacacatta ttatggagaa	1620
aatagagaga gatagatttg tagagagaga ctggtgattt cagcgtgtcc aagcttgata	1680
tcctattcct ttgccctcgg acgagtgtcg gggcgtcggt ttccactatc ggcgagtact	1740
tctacacagc catcgggtcca gacggccgag cttctgctgg cgatttgtgt acgcccagca	1800
gtcccggtc cggatcggac gattgcgtcg catcgacct gcgccaagc tgcacatcg	1860
aaattgccgt caaccaagct ctgatagagt tggtaagac caatgcggag catatacgcc	1920
cggagccgag gcgatcctgc aagctccgga tgcctccgct cgaagtagcg cgtctgtgc	1980
tcatacaag ccaaccacgg cctccagaag aagatgttg cgacctcgta ttgggaatcc	2040
ccgaacatcg cctcgtcca gtcaatgacc gctgttatgc ggccattgtc cgtcaggaca	2100
ttgttgagc cgaaatccgc gtgcacgagg tgcggactt cggggcagtc ctgggcca	2160
agcatcagct catcgagagc ctgcgcgagc gacgcactga cgggtgtcgt catcacagtt	2220
tgccagtgat acacatgggg atcagcaatc gcgcatatga aatcacgcca tgtagtgtat	2280

tgaccgattc cttgcggtcc gaatgggccc aaccgcgtcg tctggctaag atcgcccgca	2340
gcatcgcat ccatggcctc cgcgaccggc tgcagaacag cgggcagttc ggtttcaggc	2400
aggtcttgca acgtgacacc ctgtgcacgg cgggagatgc aataggtcag gctctcgctg	2460
aattcccca tgtcaagcac ttccggaatc gggagcgcgg ccgatgcaaa gtgccgataa	2520
acataacgat ctttgtagaa accatcggcg cagctattta cccgcaggac atatccacgc	2580
cctcctacat cgaagctgaa agcacgagat tcttcgccct ccgagagctg catcaggctg	2640
gagacgctgt cgaacttttc gatcagaaac ttctcgacag acgtcgcggt gaggtcaggc	2700
tttttcatct cgagacaaac ttacaaattt ctctgaagtt gtatcctcag tacttcaaag	2760
aaaatagctt acaccaaatt ttttcttggt ttacaaaatg ccgaacttgg ttctttatat	2820
aggaaaactc aagggcacaa atgacacgga aaaatataaa aggataagta gtgggggata	2880
agattccttt gtgataaggt tactttccgc ccttacattt tccaccttac atgtgtcctc	2940
tatgtctctt tcacaatcac cgaccttato ttcttctttt cattgttgtc gtcagtgcct	3000
acgtcttcaa gattcttttc ttgcctgggt tcttcttttt caatttctac gtattcttct	3060
tcgtattctg gcagtatagg atcttgtatc tgtacattct tcatttttga acatagggtg	3120
catatgtgcc gcatattgat ctgcttcttg ctgagctcac ataatacttc catagttttt	3180
cccgtaacaa ttggattctt gatgctacat cttggataat taccttcggc gcccatgca	3240
tacgtaggta ccaattgccg ggaccgggta cggcgtgcag tgcttcagcc gctacccgca	3300
ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg	3360
caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg	3420
cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat	3480
cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa	3540
gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt	3600
gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc	3660
cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgca	3720
tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgcgggatac actctcggca tggacgagct	3780
gtacaagatg gaccagaac gacgccggc cgacatccgc cgtgccaccg aggcggacat	3840
gccggcggtc tgcaccatcg tcaaccacta catcgagaca agcacggtca acttcogtac	3900
cgagccgcag gaaccgcagg agtggacgga cgacctcgtc cgtctcgggg agcgtatcc	3960
ctggctcgtc gccgaggtgg acggcgaggt cgcgggcata gcctacggcg gccctggaa	4020

- 54 -

```

ggcacgcaac gcctacgact ggacggccga gtcgaccgtg tacgtctccc cccgccacca 4080
gcggaacggga ctgggctcca cgctctacac ccacctgctg aagtccttgg aggcacaggg 4140
cttcaagagc gtggtcgtg tcatcgggct gcccaacgac ccgagcgtgc gcatgcacga 4200
ggcgctcggg tatgcccccc gcggcatgct gcgggcggcc ggcttcaagc acgggaactg 4260
gcatgacgtg ggtttctggc agctggactt cagcctgcgc gtaccgcccc gtccggtcct 4320
gcccgtcacc gagatctgag ctagcacgcg tctaggatcc gaagcagatc gttcaaacat 4380
ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata 4440
atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat 4500
gagatgggtt tttatgatta ggtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa 4560
aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt 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 fosfotransfera-

30 sa

 <220>

<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 acetiltrans-
ferasa

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (4650)..(4858)
<223> 3'nos: región de terminación de la transcripción
y de poliadenilación del gen de nopalina sintasa

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (4968)..(4992)

30 <223> secuencia de frontera izquierda de ADN T

<400> 5

agattcgaag ctccggtccc tgggtgttct gtcgtctcgt tgtacaacga aatccattcc	60
attccgcgc tcaagatggc ttcccctcgg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg	120
acttgtccgg tgaatgggc tgcactcaa cagaacaat caacaaaca tacacagcga	180
ttattcaca cgcgacaaat tacaacggtatatacctgc cagtactcgg ccgtcgacct	240
gcaggcaatt ggtacctacg tatgcatggc gcgccatatg caccatacat ggagtcaaaa	300
ttcagatcg aggatctaac agaactcgc gtgaagactg gcgaacagtt catacagagt	360
cttttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tgggtggagca cgacactctc	420
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggctat tgagactttt	480
caacaaaggg taatatcggg aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttc	540
atcaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat gccatcattg cgataaagga	600
aaggctatcg ttcaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc cccaccacg	660
aggagcatcg tggaaaaaga agcgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt	720
gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca agaccttcc	780
tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggaactcgag ctcatctctc tattacttca	840
gccataacaa aagaactctt ttctcttctt attaaaccaa aaccatgggtg agcaagggcg	900
aggagctggt caccggggtg gtgcccatcc tggctcgagct ggacggcgac gtaaacggcc	960
acaagttcag cgtgtccggc gaggggcagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga	1020
agttcatctg caccaccggc aagctgccg tgccttggcc caccctcgtg accacctga	1080
cctacggcgt gcagtgttc agcgcctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca	1140
agtccgccat gccgaaggc tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca	1200
actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc	1260
tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact	1320
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact	1380
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgcgcaccac taccagcaga	1440
acaccccat cggcgacggc ccgtgtctgc tgcgcgacaa ccactacctg agcaccagct	1500
ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttaggat	1560
aacagggtaa tggcgtgggc gacgggtccc ggcgcgtgta ccatgcatga tctggatttt	1620
agtactggat ttggtttta ggaattagaa attttattga tagaagtatt ttacaaatac	1680
aaatacatac taagggtttc ttatatgtc aacacatgag cgaaacccta taggaaccct	1740
aattccctta tctgggaact actcacacat tattatggag aaaatagaga gagatagatt	1800
tgtagagaga gactggtgat ttcagcgtgt ccaagcttga tatcctatc ctttgccctc	1860
ggacgagtgc tggggcgtcg gtttccacta tcggcgagta cttctacaca gccatcggtc	1920
cagacggccg cgcttctcgc ggcgatttgt gtacgcccga cagtccggc tccggatcgg	1980
acgattgcgt cgcacgacc ctgcgcccaa gctgcatcat cgaaattgcc gtcaaccaag	2040
ctctgataga gttggtcaag accaatgcg agcatatac cccggagccg cggcgatcct	2100

gcaagctccg gatgcctccg ctogaagtag cgcgtctgct gctccataca agccaaccac 2160
 ggctccaga agaagatgtt ggcgacctcg tattgggaat ccccgaaat cgcctcgctc 2220
 cagtcaatga ccgctgttat gcggccattg tccgtcagga cattgttga gccgaaatcc 2280
 gcgtgcacga ggtgccggac ttccggggcag tcctcggccc aaagcatcag ctcatcgaga 2340
 gcctgcgcga cggacgcact gacggtgtcg tccatcacag tttgccagtg atacacatgg 2400
 ggatcagcaa tcgcgcatat gaaatcacgc catgtagtgt attgaccgat tccttgcggg 2460
 ccgaatgggc cgaacccgct cgtctggcta agatcggccg cagcgatcgc atccatggcc 2520
 tccgcgaccg gctgcagaac agcgggcagt tcggtttcag gcaggctctg caacgtgaca 2580
 ccctgtgcac ggccgggagat gcaataggtc aggtctctcg tgaattcccc aatgtcaagc 2640
 acttccggaa tcgggagcgc ggccgatgca aagtgcgat aaacataacg atctttgtag 2700
 aaaccatcgg cgcagctatt taccgcagg acatatccac gccctcctac atcgaagctg 2760
 aaagcacgag attcttcgcc ctccgagagc tgcatcaggt cggagacgct gtcgaacttt 2820
 tcgatcagaa acttctcgac agacgtcgcg gtgagttcag gctttttcat ctcgagacaa 2880
 acttacaaat ttctctgaag ttgtatcctc agtacttcaa agaaaatagc ttacacaaaa 2940
 ttttttcttg ttttcacaaa tgcggaactt ggttccttat ataggaaaac tcaagggcaa 3000
 aaatgacacg gaaaaatata aaaggataag tagtggggga taagattcct ttgtgataag 3060
 gttactttcc gcccttacat tttccacctt acatgtgtcc tctatgtctc tttcacatc 3120
 accgacctta tcttcttctt ttcatctgtg tcgtcagtcg ttacgtcttc aagattcttt 3180
 tcttcgcctg gttcttcttt ttcaatttct acgtattctt ctctgtattc tggcagtata 3240
 ggatcttgta tctgtacatt cttcatTTTT gaacataggt tgcataatgt ccgcataatg 3300
 atctgcttct tgcgtgagtc acataatact tccatagttt ttcccgtaaa cattggattc 3360
 ttgatgctac atcttgata attaccttcg gcgcgccatg catacgtagg taccaattgc 3420
 cgggacccgt gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 3480
 cggggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagtcc atctgcacca ccggcaagct 3540
 gccctgccc tggcccacc tcgtgaccac cctgacctac ggctgacgt gcttcagccg 3600
 ctaccccgac cacatgaagc agcacgaact cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt 3660
 ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 3720
 gttcgagggc gacaccttg tgaaccgat cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga 3780
 cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 3840
 gcccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 3900

- 59 -

```

cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcgggc acggccccgt 3960
gctgtgtccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga 4020
gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat 4080
ggacgagctg tacaagatgg acccagaacg acgcccggcc gacatccgcc gtgccaccga 4140
ggcggacatg ccggcgggtct gcaccatcgt caaccactac atcgagacaa gcacgggtcaa 4200
cttccgtacc gagccgcagg aaccgcagga gtggacggac gacctcgtcc gtctgcggga 4260
gcgctatccc tggctcgtcg ccgaggtgga cggcgaggtc gccggcatcg cctacggggg 4320
cccctggaag gcacgcaacg cctacgactg gacggccgag tcgaccgtgt acgtctcccc 4380
ccgccaccag cggacgggac tgggctccac gctctacacc cacctgotga agtccttggg 4440
ggcacagggc ttcaagagcg tggctcgtgt catcggggtg cccaacgacc cgagcgtgcg 4500
catgcacgag gcgctcggat atgccccccg cggcatgctg cgggcggccg gcttcaagca 4560
cgggaactgg catgacgtgg gtttctggca gctggacttc agcctgccgg taccgccccg 4620
tccggtcctg cccgtcaccg agatctgagc tagcacgctg ctaggatccg aagcagatcg 4680
ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc ttgcgatgat 4740
tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac 4800
gttatttatg agatggggtt ttatgattag agtcccgcaa ttatacatTT aatacgcgat 4860
agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcgcggtgt catctatgtt 4920
actagatcgg gaagatcctc tagatacgta gcgatcgcca tggagccatt tacaattgaa 4980
tatatcctgc 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

<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

<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	ctcgggcccg	tgggtgttct	gtcgtctcgt	tgtacaacga	aatccattcc	60
cattccgcgc	tcaagatggc	ttcccctcgg	cagttcatca	gggctaaatc	aatctagccg	120
acttgtcggg	tgaaatgggc	tgcaactcaa	cagaaacaat	caaacaaaca	tacacagcga	180
cttattcaca	cgcgacaaat	tacaacggta	tatatcctgc	cagtactcgg	ccgtcgacct	240
gcaggcaatt	gtttgttatt	gtggcgtctt	atcatagatg	tcgctataaa	cctattcagc	300
acaatatatt	gttttcattt	taatattgta	catataagta	gtaggggtaca	atcagtaaatt	360

tgaacggaga atattattca taaaaatacg atagtaacgg gtgatatatt cattagaatg	420
aaccgaaacc ggcggttaagg atctgagcta cacatgctca ggtttttttac aacgtgcaca	480
acagaattga aagcaaatat catgcatca taggcgtctc gcatatctca ttaaagcagg	540
gggtgggcga agaactccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca gccggcgctcc	600
cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cggtggaatc gaaatctcgt	660
gatggcagggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc gctcagaaga	720
actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa	780
gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca	840
acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa	900
agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat	960
cctcgccgtc gggcatgccc gccttgagcc tggcgaacag ttccgctggc gcgagcccct	1020
gatgtctctc gtccagatca tcttgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc	1080
gctcgatgcg atgtttcgtc tgggtggtcga atgggcagggt agccggatca agcgtatgca	1140
gccgccgcat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca	1200
ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgtc tcagtgacaa	1260
cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct	1320
cgtcctgcag ttcatcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga accgggcgcc	1380
cctgcgctga cagccggaac accggcgcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt	1440
catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt	1500
caatccacat gatcatgggc cggatctttg attgagagtg aatatgagac tctaattgga	1560
taccgagggg aatttatgga acgtcagtgg agcatttttg acaagaaata tttgctagct	1620
gatagtgacc ttaggcgact tttgaacgcg caataatggt ttctgacgta tgtgcttagc	1680
tcattaaact ccagaaaccc ggggtgagt ggctccttca atcgttgagg ttctgtcagt	1740
tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tcggcggggg tcataacgtg actcccttaa	1800
ttctccgtc atgacctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacacat	1860
tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gaattgacgg	1920
gatctatggc gcgccatatg agatttatag ggtcctaag cgggtactga acaccagggtg	1980
ggaaacaaaa aatatacaga acaactcctt tagaatttac aatttttgag cgtgttggtc	2040
tggtacgatt ctacttttca tatctctcgt catctcctaa ctctatgggt tcaccagcca	2100
ccgattaatt atgacaccgc taacaaaaat cttgcgacga cattgagaga aatttctttt	2160

cataaattgg taattcgtac atcattttata ggcgttagct ataacctttt agttagttaa	2220
tacaatactt tttgctatta ttatgtaact tttagatatg aatttacttt caaaaaaaaa	2280
aaaaggatcg atgttggtta tcaactaagg accaaccact ttggacgtct caccactaag	2340
ttaaataaat cactttgttc tcgaaaaaaaa ccccaaaagt gttaaaatgc ttttcatatc	2400
ataatcaaac aacgtgatta ataaaatcta ttaagttaat agaagtaggg aataaatcgg	2460
gcaaaagaat ttgatacaaa ccaaacgggt caaaaaagct agtattcata taaatggact	2520
atacaagtta ataccagcta gcagaaatta aatagtttat taagttgatt acaaaaacat	2580
tcctcattta aaaaaagtta atgtaatcaa gagatctttt gcttctaatt gatcagacga	2640
ggacccctct tatttatttt ctttttcata taagattttg aatagatata gggaaatctt	2700
gttcactctt tatctacttc aaattgcatg cattttaaga attctctttg tatgcaaact	2760
tcagtattta tgattgacat aaatcaatat tcatatcttc gataaagtta ataactctcc	2820
taatacttat gaatatctct tcctttacaa cctataaaa cccccacta tagctacctt	2880
cataattcat cttagagtac caaccctaaa tttcttagtg attaacctatg gctaaacccc	2940
ccaagaagaa gcgcaagggt aacatcaaaa aaaaccaggt aatgaacctg ggtccgaact	3000
ctaaactgct gaaagaatac aaatcccagc tgatcgaact gaacatcgaa cagttcgaag	3060
cagggtatcg tctgatcctg ggtgatgctt acatccgttc tcgtgatgaa ggtaaaacct	3120
actgtatgca gttcgagtgg aaaaaaaaag catacatgga ccacgtatgt ctgctgtacg	3180
atcagtgggt actgtccccg ccgcacaaaa aagaacgtgt taaccacctg ggtaacctgg	3240
taatcacctg gggcgcccag actttcaaac accaagcttt caacaaactg gctaacctgt	3300
tcatogttaa caacaaaaaa accatcccga acaacctggt tgaaaactac ctgaccccg	3360
tgctctctggc atactgggtc atggatgatg gtggtaaatg ggattacaac aaaaactcta	3420
ccaacaaatc gatcgtactg aacaccaggt ctttcacttt cgaagaagta gaataacctg	3480
ttaagggctc gcgtaacaaa ttccaactga actgttacgt aaaaatcaac aaaaacaaac	3540
cgatcatcta catcgattct atgtcttacc tgatcttcta caacctgac aaacctgacc	3600
tgatcccgca gatgatgtac aaactgcga aactatctc ctccgaaact ttctgaaat	3660
agggttagca agcttggaac cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctct	3720
ctattttctc cataataatg tgtgagtagt tcccagataa gggaattagg gttcctatag	3780
ggtttctctc atgtgttgag catataagaa acccttagta tgtatttgta ttgtgaaaat	3840
acttctatca ataaaatttc taattcctaa aaccaaatac cagtactaaa atccagatca	3900
tgcatggtag agcggccgcg ttaacgcgta tactctagat acgtagcgat cgccatggag	3960
ccatttacaa ttgaatatat cctgccg	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
25 flanqueantes y otra copia de al menos parte de dicha 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
30 situado entre dicha una de las regiones de ADN flanqueantes y dicha región de ADN flanqueante parcial 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 quimérico que codifica la enzima DSBI, comprendiendo dicho gen quimérico 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

20

 - interés;
 - 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 quimérico que codifica la enzima DSBI;
- g. cruzar dicha planta descendiente con otra planta,
- 30 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.

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 quimérica 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 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.

10 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.

15 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.

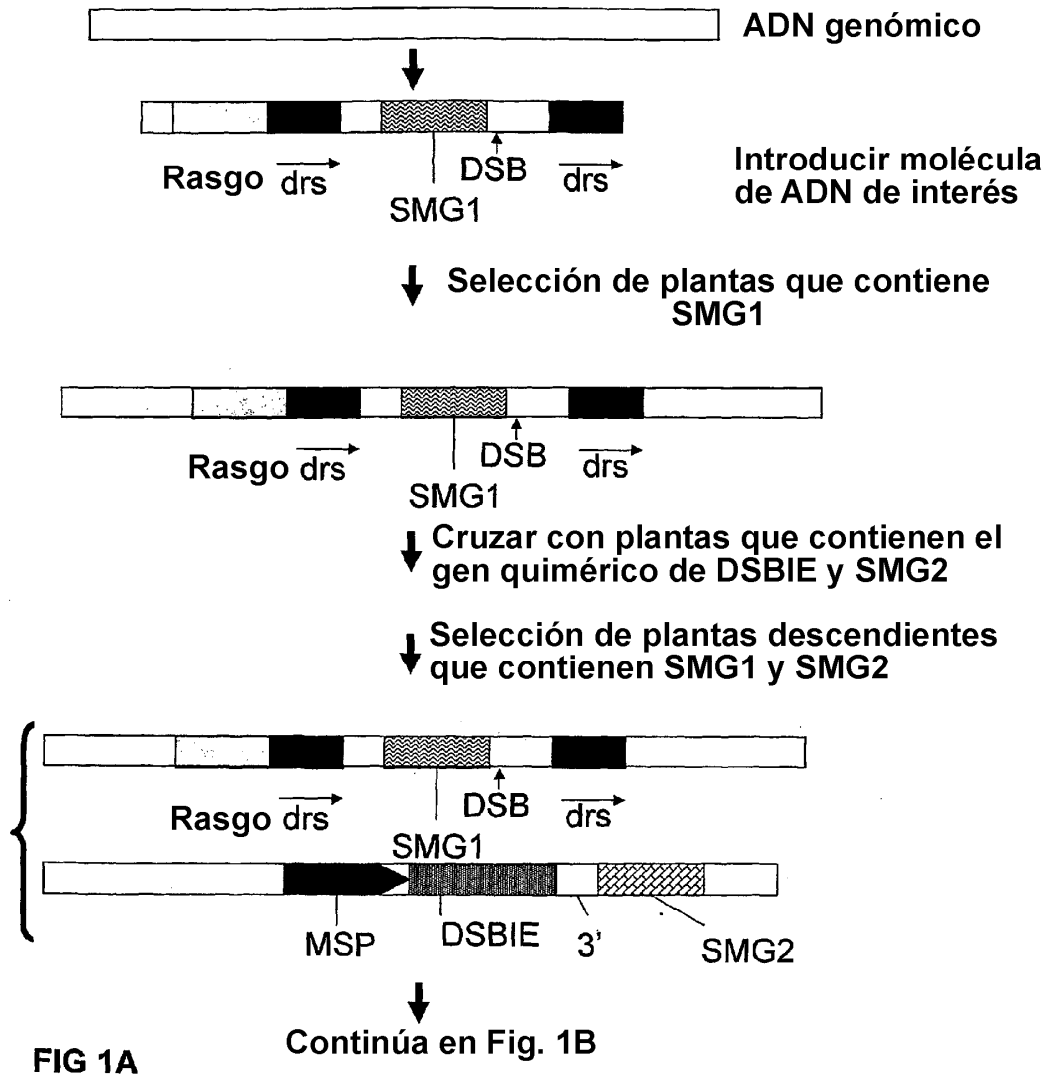
20 8.- Un vector de ADN para intercambiar una secuencia de ADN diana en el genoma de una célula vegetal por una secuencia de ADN de interés a través de la inducción de una ruptura bicatenaria en un sitio preseleccionado dentro de dicha secuencia diana o en su vecindad, comprendiendo dicho vector de ADN

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

situada en la repetición directa; y

c. 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 situada en la repetición directa.



Continuación de la Fig. 1A

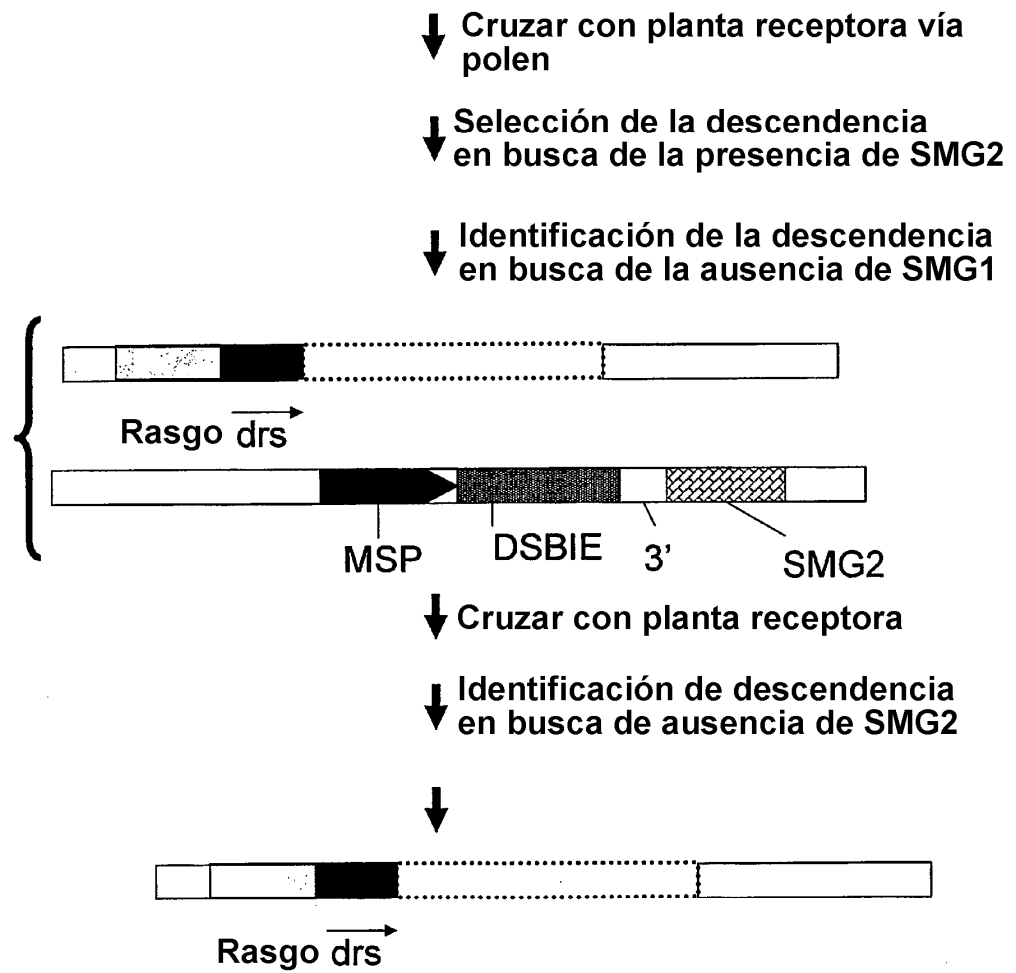
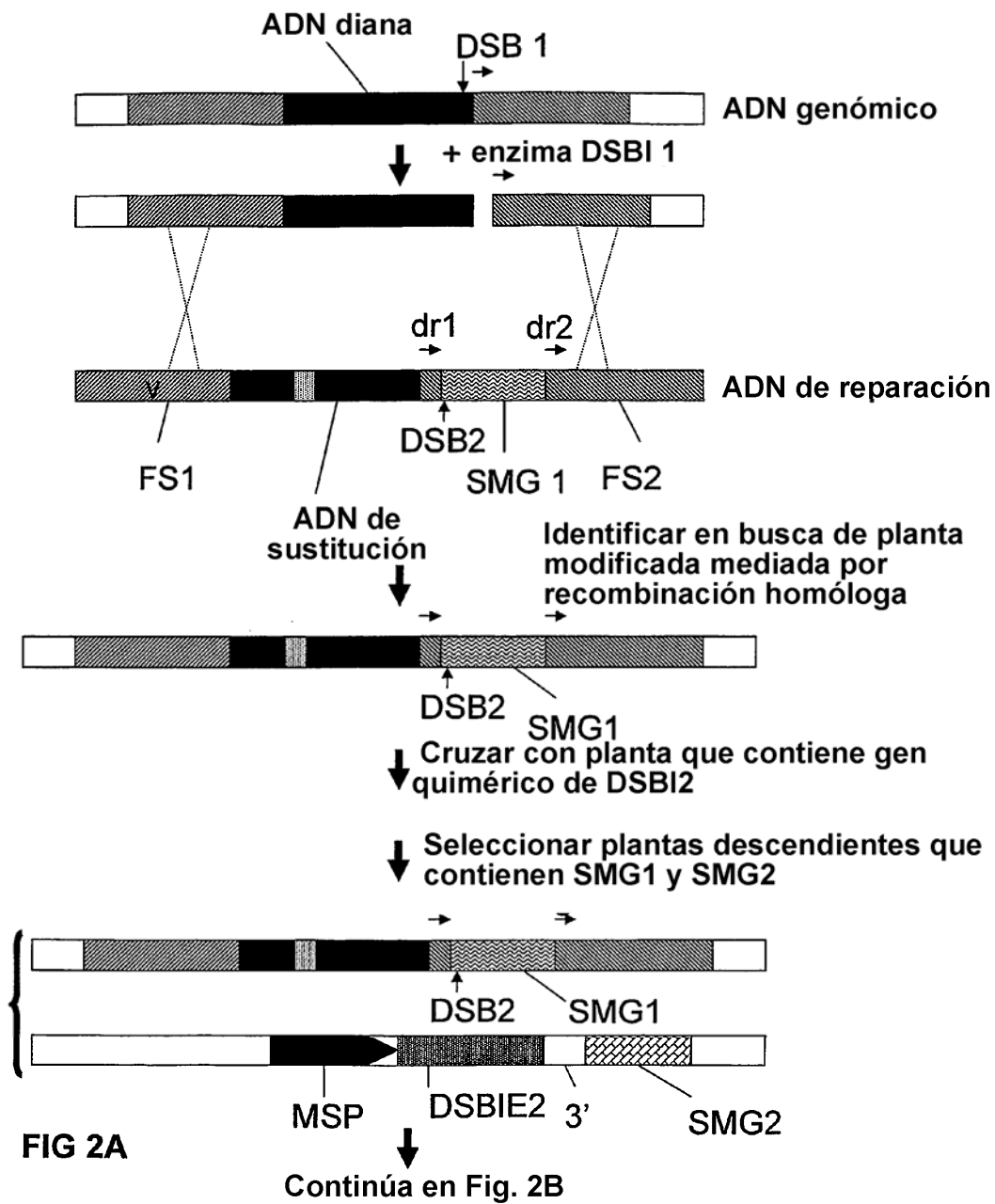


FIG 1B



Continuación de Fig. 2A

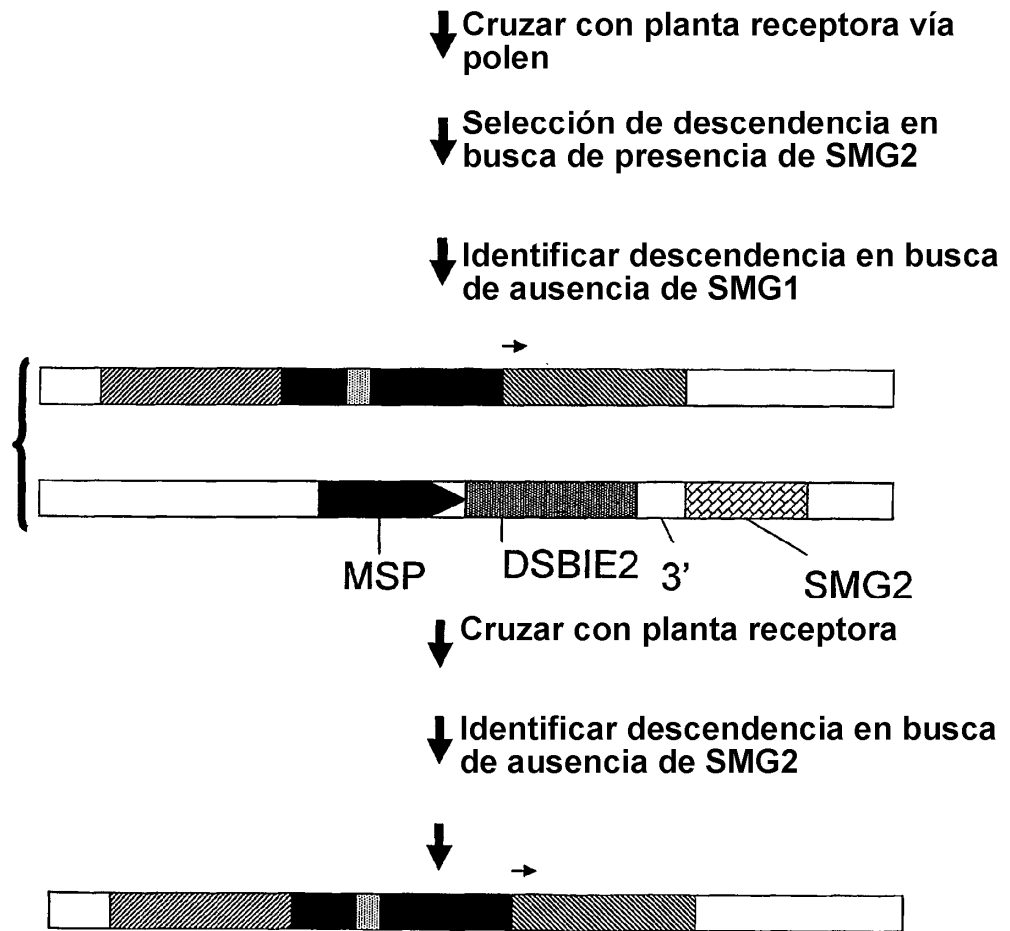
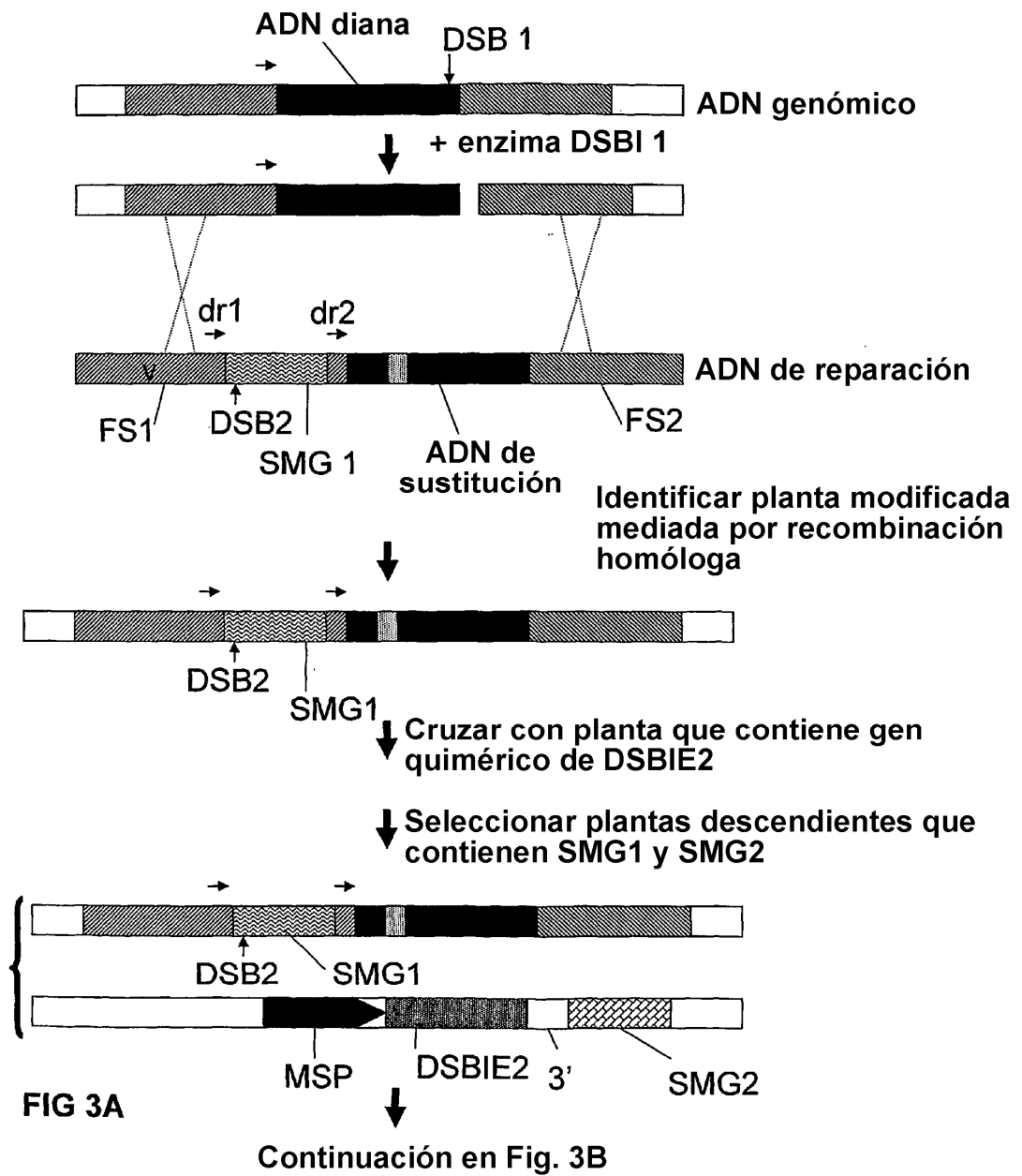


FIG 2B



Continuación de Fig. 3A

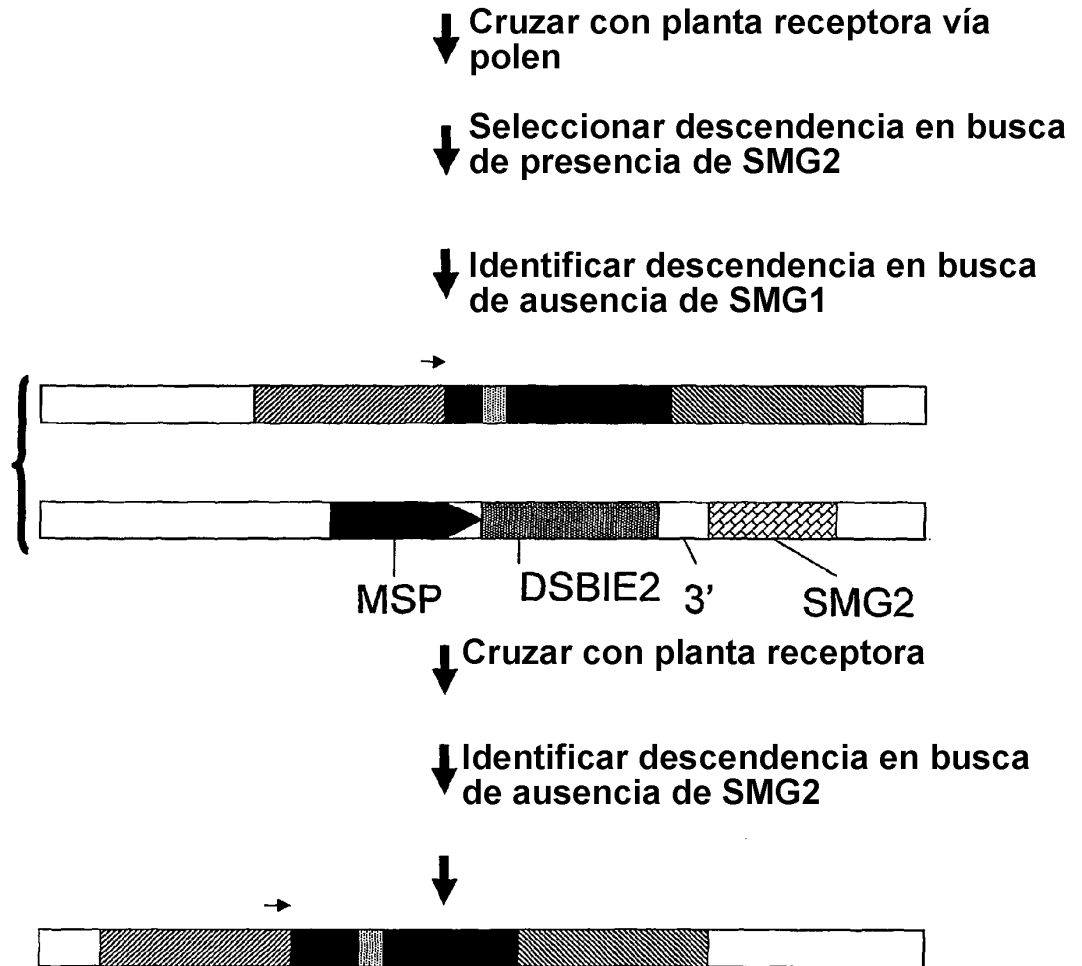


FIG 3B