

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 337 762**

51 Int. Cl.:

A01H 1/06 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2000 E 00970716 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **23.12.2015 EP 1223799**

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

30 Prioridad:

07.10.1999 US 158027 P
30.12.1999 US 173564 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
22.04.2016

73 Titular/es:

CIBUS INTERNATIONAL LP (100.0%)
Nemours Chambers
Road Town Tortola, VG

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 337 762 T5

DESCRIPCIÓN

Plantas no transgénicas resistentes a herbicidas

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a la producción de una planta no transgénica resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfonometilglicina, p. ej., el glifosato. La presente invención también se refiere al uso de una oligonucleobase recombinagénica para generar una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episómicas de una planta en el gen que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). La proteína mutada, que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína natural, permite una mayor resistencia o tolerancia de la planta a un herbicida de la familia de la fosfonometilglicina y permite el crecimiento o desarrollo sustancialmente normales de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta natural independientemente de la presencia o ausencia del herbicida. La presente invención también se refiere a una célula vegetal no transgénica en la cual se ha mutado el gen EPSPS, una planta no transgénica regenerada a partir de esta, así como también una planta que resulte de un cruce que utiliza una planta no transgénica regenerada que tiene un gen EPSPS mutado.

2. Antecedentes de la invención

2.1 Herbicidas de tipo fosfonometilglicina

Las plantas tolerantes herbicidas podrán reducir la necesidad de labranza para controlar las malezas y de esta manera reducir eficazmente la erosión del suelo. Un herbicida que es el objeto de grandes esfuerzos de investigación en este aspecto es la *N*-fosfonometilglicina, denominada comúnmente glifosato. El glifosato inhibe la ruta del ácido shikímico que conduce a la biosíntesis de compuestos aromáticos incluidos aminoácidos, hormonas y vitaminas. Específicamente, el glifosato frena la conversión de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y ácido 3-fosfoshikímico en ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímico inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (denominada posteriormente en la presente EPSP sintasa o EPSPS). A efectos de la presente invención, el término "glifosato" incluye cualquier forma eficaz como herbicida de la *N*-fosfonometilglicina (incluida cualquiera de sus sales), otras formas que resulten en la producción del anión glifosato en plantas y cualesquiera otros herbicidas de la familia de la fosfonometilglicina.

La tolerancia de las plantas al glifosato se puede aumentar introduciendo en el genoma de la planta un gen EPSPS mutante que tiene una alteración en la secuencia que codifica los aminoácidos de EPSPS. En las siguientes patentes se describen ejemplos de algunas mutaciones en el gen EPSPS para inducir la tolerancia al glifosato: patente de EE. UU. N.º 5 310 667; patente de EE. UU. N.º 5 866 775; patente de EE. UU. N.º 5 312 910; patente de EE. UU. N.º 5 145 783. Estas mutaciones propuestas tienen normalmente una K_i mayor para el glifosato que la enzima EPSPS natural lo que confiere el fenotipo tolerante al glifosato, pero estas variantes también están caracterizadas por una K_m elevada para PEP lo que hace que la enzima sea menos eficiente cinéticamente (Kishore *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57:627-663; Schulz *et al.*, 1984, *Arch. Microbiol.* 137: 121-123; Sost *et al.*, 1984, *FEBS Lett.* 173: 238-241; Kishore *et al.*, 1986, *Fed. Proc.* 45: 1506; Sost y Amrhein, 1990, *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 433-436). Muchas mutaciones del gen EPSPS se escogen de modo que produzcan una enzima EPSPS que sea resistente a herbicidas, pero desafortunadamente, la enzima EPSPS producida por el gen EPSPS mutado tiene una actividad enzimática significativamente menor que la EPSPS natural. Por ejemplo, la K_m aparente para PEP y la K_i aparente para el glifosato de la EPSPS natural de *E. coli* son 10 μ M y 0.5 μ M, mientras que para un aislado tolerante al glifosato que tiene una sustitución de un único aminoácido de alanina por glicina en la posición 96, estos valores son 220 μ M y 4.0 mM, respectivamente. Varios genes EPSPS tolerantes al glifosato han sido construidos mediante mutagénesis. De nuevo, la EPSPS tolerante al glifosato tuvo una eficacia catalítica ($V_{m\acute{a}x}/K_m$) más baja, tal como lo muestra un incremento en la K_m para PEP y una ligera reducción de la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima vegetal natural (Kishore *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57:627-663).

Debido a que las constantes cinéticas de las enzimas variantes están alteradas respecto a PEP, se ha propuesto que se requerirían niveles elevados de la sobreproducción de la enzima variante, 40-80 veces, para mantener una actividad catalítica normal en plantas en presencia del glifosato (Kishore *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57:627-663). Se ha demostrado que pueden producirse plantas tolerantes al glifosato insertando en el genoma de la planta la capacidad para producir un nivel más alto de EPSP sintasa en el cloroplasto de la célula (Shah *et al.*, 1986, *Science* 233, 478-481), donde la enzima es preferentemente tolerante al glifosato (Kishore *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57:627-663).

La introducción de los genes EPSPS mutantes exógenos en una planta es un proceso muy documentado. Por ejemplo, de acuerdo con la patente de EE. UU. N.º 4 545 060, para incrementar la resistencia de una planta al glifosato, se introduce en el genoma de la planta un gen que codifica una variante de EPSPS que tiene al menos una mutación que hace que la enzima sea más resistente a su inhibidor competitivo, es decir, el glifosato. Sin embargo, muchas complicaciones y problemas están asociados con estos ejemplos. Muchas mutaciones de este tipo conllevan una expresión baja del gen EPSPS mutado o conllevan un producto del gen EPSPS con una actividad enzimática significativamente más baja en comparación con el producto natural. La expresión baja o la actividad enzimática baja de la enzima mutada conllevan unos niveles anormalmente bajos de crecimiento y desarrollo de la planta.

Aunque este tipo de variantes de las EPSP sintasas han demostrado ser útiles para obtener plantas transgénicas tolerantes al glifosato, sería aún más beneficioso obtener un gen de EPSPS variante que sea sumamente tolerante al glifosato pero mantenga su eficacia cinética, de modo que se pueda obtener tal tolerancia mejorada con un nivel

de expresión natural.

2.2 Oligonucleobases recombinagénicas

Las oligonucleobases recombinagénicas y su uso para llevar a cabo cambios genéticos en células eucariotas se describen en la patente de Estados Unidos N.º 5 565 350 de Kmiec (Kmiec I). Kmiec I describe un método para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. Kmiec I divulga, entre otros, oligonucleobases recombinagénicas que tienen dos hebras, en las cuales una primera hebra contiene dos segmentos de al menos 8 nucleótidos de tipo ARN que están separados por un tercer segmento de entre 4 y aproximadamente 50 nucleótidos de tipo ADN, denominado un "segmento de ADN interpuesto". Los nucleótidos de la primera hebra tienen sus bases emparejadas con los nucleótidos de tipo ADN de la segunda hebra. Además, la primera y la segunda hebras están unidas por un segmento de nucleótidos monocatenario de modo que la primera y la segunda hebras son parte de una única cadena de oligonucleótidos. Kmiec I describe además un método para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. De acuerdo con Kmiec I, las secuencias de los segmentos de ARN se seleccionan para que sean homólogas, es decir, idénticas, respecto a la secuencia de un primer y un segundo fragmento del gen diana. La secuencia del segmento de ADN interpuesto es homóloga respecto a la secuencia del gen diana entre el primer y el segundo fragmento excepto por una región de diferencia, denominada la "región heteróloga". La región heteróloga puede presentar una inserción o una delección o puede contener una o más bases que tengan un emparejamiento erróneo con la secuencia del gen diana de modo que se produzca una sustitución. De acuerdo con Kmiec I, la secuencia del gen diana se altera según lo dirija la región heteróloga, de modo que el gen diana se vuelve homólogo respecto a la secuencia de la oligonucleobase recombinagénica. Kmiec I describe específicamente que los nucleótidos que contienen ribosa y 2'-O-metilribosa, es decir, la 2'-metoxirribosa, se pueden utilizar en las oligonucleobases recombinagénicas y que nucleótidos que contienen desoxirribosa presente de manera natural se pueden utilizar como nucleótidos de tipo ADN.

La patente de EE. UU. N.º 5 731 181 de Kmiec (Kmiec II) divulga específicamente el uso de oligonucleobases recombinagénicas para llevar a cabo cambios genéticos en células vegetales y divulga ejemplos adicionales de análogos y derivados de nucleótidos de tipo ARN y de tipo ADN que se pueden utilizar para llevar a cabo cambios genéticos en genes diana específicos. Otras patentes que estudian el uso de oligonucleobases recombinagénicas incluyen: las patentes de EE. UU. N.ºs 5 756 325; 5 871 984; 5 760 012; 5 888 983; 5 795 972; 5 780 296; 5 945 339; 6 004 804 y 6 010 907 y en la patente internacional N.º PCT/US00/23457; y en las publicaciones de patente internacional N.ºs WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789. Las oligonucleobases recombinagénicas incluyen moléculas que contienen compuestos que no son nucleótidos, oligonucleótidos bicatenarios mixtos descritas en Kmiec II y otras moléculas descritas en las patentes y publicaciones de patentes mencionadas anteriormente.

La cita o identificación de cualquier referencia de la Sección 2, o cualquier sección de esta solicitud, no debe interpretarse como una admisión de que tal referencia está disponible como parte de la técnica anterior de la presente invención.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una célula vegetal o planta no transgénicas que tienen una o más mutaciones en el gen EPSPS, donde la planta tiene una mayor resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de la fosfometilglicina y donde la planta exhibe un crecimiento o desarrollo sustancialmente normales de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la célula o planta naturales correspondientes. La presente invención también se refiere a un método para producir una planta no transgénica que tiene una mutación en el gen EPSPS, donde la planta es resistente a un miembro de la familia de la fosfometilglicina, p. ej., glifosato, o tiene una mayor tolerancia a este, donde la proteína EPSPS tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína EPSPS natural.

La presente invención también se refiere a un método para producir una planta no transgénica que tiene un gen EPSPS mutado que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína natural independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida de la familia de la fosfometilglicina. El método comprende introducir en una célula vegetal una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS e identificar una célula, semilla o planta que tiene un gen EPSPS mutado.

En las siguientes publicaciones de patente, las cuales incorporan a la presente por referencia en su totalidad, se pueden consultar ejemplos ilustrativos de una oligonucleobase recombinagénica: patente de EE. UU. N.ºs 5 565 350; 5 756 325; 5 871 984; 5 760 012; 5 731 181; 5 888 983; 5 795 972; 5 780 296; 5 945 339; 6 004 804 y 6 010 907 y en la patente internacional N.º PCT/US00/23457; y en las publicaciones de patente internacional N.ºs WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789.

La planta puede ser cualquier especie de planta dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma, incluida cualquier especie de planta leñosa que crezca como un árbol o matorral, cualquier especie herbácea o cualquier especie que produzca verduras, semillas o frutos comestibles, o cualquier especie que produzca flores aromáticas o coloridas. Por ejemplo, la planta se podrá seleccionar entre una especie de planta procedente del grupo constituido por canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisante, habas comunes, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y hierbas forrajeras, lino, colza oleaginosa, pepino, campanillas, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, tulipán, iris, azucena y plantas que producen frutos secos siempre que no se hayan mencionado de manera específica

previamente.

La oligonucleobase recombinagénica se puede introducir en una célula vegetal utilizando cualquier método de uso común en la técnica incluidos, sin carácter limitante, microportadores (suministro biolístico), microfibras, electroporación y microinyección.

- 5 También se divulga un método para controlar de manera selectiva las malezas en un campo, comprendiendo el campo plantas con las alteraciones del gen EPSPS divulgadas y malezas, comprendiendo el método la aplicación al campo de un herbicida al cual dichas plantas se han vuelto resistentes.

- 10 También se divulgan mutaciones novedosas en el gen EPSPS que confieren resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de la fosfometilglicina, p. ej., glifosato, a una planta o donde la EPSPS mutada tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con la EPSPS natural.

3.1 Definiciones

La invención se debe entender de acuerdo con las siguientes definiciones.

Una oligonucleobase es un polímero de nucleobases, donde el polímero puede hibridarse mediante un emparejamiento de bases de Watson-Crick a un ADN que tiene la secuencia complementaria.

- 15 Las nucleobases comprenden una base, que es una purina, pirimidina o un derivado o un análogo de estas. Las nucleobases incluyen nucleobases peptídicas, las subunidades de ácidos nucleicos peptídicos, y nucleobases morfolínicas así como también nucleósidos y nucleótidos. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un resto de tipo pentosafuranosilo, p. ej., un ribósido o 2'-desoxirribósido sustituidos opcionalmente. Los nucleósidos pueden estar unidos mediante uno de entre varios restos de unión, que podrá contener fósforo o no contenerlo. Los
20 nucleósidos que están unidos mediante enlaces de tipo fosfodiéster no sustituidos se denominan nucleótidos.

Una cadena de oligonucleobases tiene un único fragmento 5'-terminal y 3'-terminal, constituidos por las últimas nucleobases del polímero. Una cadena de oligonucleobases concreta puede contener nucleobases de todos los tipos. Un compuesto de tipo oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobase que son complementarias y se hibridan mediante un emparejamiento de bases de Watson-Crick.

- 25 Las nucleobases son de tipo desoxirribo o de tipo ribo. Las nucleobases de tipo ribo son pentosafuranosilos que contienen nucleobases donde el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidroxilo, alquilo o halógeno. Las nucleobases de tipo desoxirribo son nucleobases distintas de las nucleobases de tipo ribo e incluyen todas las nucleobases que no contienen un resto pentosafuranosilo.

- 30 Una hebra de oligonucleobases incluye, de manera genérica, ambas cadenas de oligonucleobases y segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobases. Una hebra de oligonucleobases tiene un extremo 3' y un extremo 5'. Cuando una hebra de oligonucleobases tiene los mismos límites o extensión que una cadena, los extremos 3' y 5' de la hebra son también los fragmentos 3'-terminal y 5'-terminal de la cadena.

- De acuerdo con la presente invención, se define el crecimiento sustancialmente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal como la tasa de crecimiento o tasa de división celular de la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que es al menos un 35%, al menos un 50%, al menos un 60% o al menos un 75% de la tasa de crecimiento o tasa de división celular en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondientes que expresan la proteína EPSPS natural.

- 40 De acuerdo con la presente invención, se define el crecimiento sustancialmente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal como la presencia de uno o más eventos del desarrollo en la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que son sustancialmente idénticos a los que están presentes en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondientes que expresan la proteína EPSPS natural.

- De acuerdo con la presente invención, los órganos vegetales incluyen, sin carácter limitante, hojas, tallos, raíces, brotes vegetativos, brotes florales, meristemos, embriones, cotiledones, endosperma, sépalos, pétalos, pistilos, carpelos, estambres, anteras, microsporas, polen, tubos polínicos, óvulos, ovarios y frutos o secciones, porciones o
45 discos extraídos a partir de estos. Los tejidos vegetales incluyen, sin carácter limitante, tejidos callosos, tejidos fundamentales, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos foliares, tejidos de las ramas, tejidos radiculares, tejidos de las cecidias, tejidos de tumores vegetales y tejidos reproductivos. Las células vegetales incluyen, sin carácter limitante, células aisladas con paredes celulares, agregados de estas con diversos tamaños y protoplastos.

- 50 Las plantas son sustancialmente "tolerantes" al glifosato cuando se exponen a este y proporcionan una curva de dosis/respuesta que está desplazada en comparación con la proporcionada por plantas de tipo no tolerante expuestas de manera similar. En tales curvas de dosis/respuesta se representa la "dosis" en el eje X y el "porcentaje de aniquilación", "efecto herbicida", etc. se representa en el eje Y. Las plantas tolerantes requerirán más herbicida que las plantas de tipo no tolerante con el fin de producir un efecto herbicida concreto. Las plantas que son
55 sustancialmente "resistentes" al glifosato exhiben pocas lesiones necróticas, líticas, cloróticas o de otro tipo, o ninguna en absoluto, cuando se someten al glifosato con las concentraciones y tasas que son empleadas normalmente por la comunidad agroquímica para aniquilar las malezas en el campo. Las plantas que son resistentes a un herbicida también son tolerantes al herbicida. Los términos "resistente" y "tolerante" se han de interpretar como "tolerante y/o resistente" dentro del contexto de la presente solicitud.

- 60 4. Descripción breve de las Figuras

La FIG. 1A es la secuencia de ADN del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:1). Los residuos

nucleotídicos en negrita y subrayados son los residuos objetivo.

La FIG. 1B es la secuencia de aminoácidos de la proteína EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:2). Los residuos aminoacídicos en negrita y subrayados son los residuos objetivo.

La FIG. 2 es una lista de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de EPSPS natural y mutante de *Arabidopsis thaliana* en la región de la posición aminoacídica 173 a la 183; secuencia de nucleótidos natural (SEQ ID NO:1) y secuencia de aminoácidos natural (SEQ ID NO:2), secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) del mutante A₁₇₇; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:5) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:6) del mutante I₁₇₈; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:7) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) del mutante A₁₇₇I₁₇₈; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:9) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:10) del mutante I₁₇₈S₁₈₂; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:11) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:12) del mutante A₁₇₇S₁₈₂; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:13) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:14) del mutante A₁₇₇I₁₇₈S₁₈₂; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:15) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:16) del mutante V₁₇₇S₁₈₂; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:17) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:18) del mutante L₁₁₈S₁₈₂; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:19) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:20) del mutante A₁₇₇V₁₁₈; secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:21) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:22) del mutante A₁₇₇L₁₈₂.

La FIG. 3A-C es una alineación del ADN del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* realizada mediante DNASTar (LaserGene), (SEQ ID NO:1) con las secuencias de nucleótidos del gen EPSPS de *Brassica napus* (SEQ ID NO:23); *Petunia hybrida* (SEQ ID NO:24); y *Zea mays* (SEQ ID NO:25). Las secuencias se alinean utilizando el método de J. Hein con una tabla de peso de residuos ponderada.

La FIG. 4 es una alineación de la secuencia de aminoácidos de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:2) con las secuencias de aminoácidos de EPSPS de *Brassica napus* (SEQ ID NO:26); *Petunia hybrida* (SEQ ID NO:27) y *Zea mays* (SEQ ID NO:28). Las secuencias se alinean utilizando el método de J. Hein con una tabla de peso de residuos ponderada.

La FIG. 5 es una lista de los cebadores de mutagénesis utilizados, con los codones objetivo con letras en negrita (cebador del mutante A₁₇₇ (SEQ ID NO:29); cebador del mutante I₁₇₈ (SEQ ID NO:30); cebador del mutante A₁₇₇I₁₇₈ (SEQ ID NO:31); cebador del mutante I₁₇₈S₁₈₂ (SEQ ID NO:32); cebador del mutante A₁₇₇S₁₈₂ (SEQ ID NO:34); cebador del mutante A₁₇₇I₁₇₈S₁₈₂ (SEQ ID NO:35); cebador del mutante V₁₇₇S₁₈₂ (SEQ ID NO:35); cebador del mutante L₁₇₈S₁₈₂ (SEQ ID NO:36); cebador del mutante A₁₇₇V₁₇₈ (SEQ ID NO: 37) y cebador del mutante A₁₇₇L₁₈₂ (SEQ ID NO:38)).

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

La FIG. 7 (cuadro superior) es una inmunoelectrotransferencia que muestra la expresión de proteínas EPSPS de *Bacillus* y de *Arabidopsis* naturales (WT) y mutadas (AS) marcadas con His aisladas de lisados celulares (L) y eluidos (E). La *Salmonella* no transformada como control negativo no muestra expresión de EPSPS. El cuadro inferior es un gel duplicado teñido con plata.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una planta o célula vegetal no transgénica que tiene una mutación en el gen EPSPS, donde la planta tiene una mayor resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de la fosfometilglicina y donde la planta muestra un crecimiento o desarrollo sustancialmente normales de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta o célula naturales correspondientes. La presente invención también se refiere a una planta no transgénica que tiene una mutación en el gen EPSPS, donde la planta es resistente o tiene una mayor tolerancia a un miembro de la familia de la fosfometilglicina, p. ej., glifosato, donde la proteína EPSPS mutada tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína EPSPS natural.

La presente invención también se refiere a un método para producir una planta no transgénica que tiene un gen EPSPS mutado que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína natural independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida de la familia de la fosfometilglicina. El método comprende introducir en una célula vegetal una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS e identificar una célula, semilla o planta que tiene un gen EPSPS mutado.

Se pueden consultar ejemplos ilustrativos de una oligonucleobase recombinagénica en las siguientes publicaciones de patente: patentes de EE. UU. N.^{os} 5 565 350; 5 756 325; 5 871 984; 5 760 012; 5 731 181; 5 888 983; 5 795 972; 5 780 296; 5 945 339; 6 004 804 y 6 010 907 y en la patente internacional N.^o PCT/US00/23457; y en las publicaciones de patente internacional N.^{os} WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789.

La planta puede ser cualquier especie de planta dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma, incluida cualquier especie de planta leñosa que crezca como un árbol o matorral, cualquier especie herbácea o cualquier especie que produzca verduras, semillas o frutos comestibles, o cualquier especie que produzca flores aromáticas o coloridas. Por ejemplo, la planta se podrá seleccionar entre una especie de planta procedente del grupo constituido por canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, guisante, habas comunes, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y hierbas forrajeras, lino, colza

oleaginosa, pepino, campanillas, bálsamo, pimienta, berenjena, caléndula, loto, repollo, margarita, clavel, tulipán, iris, azucena y plantas que producen frutos secos siempre que no se hayan mencionado de manera específica previamente.

- 5 La oligonucleobase recombinagénica se puede introducir en una célula vegetal utilizando cualquier método de uso común en la técnica incluidos, sin carácter limitante, microportadores (suministro biológico), microfibras, electroporación y microinyección.

Se divulga un método para controlar de manera selectiva las malezas en un campo, comprendiendo el campo plantas con las alteraciones del gen EPSPS divulgadas y malezas, comprendiendo el método la aplicación al campo de un herbicida al cual dichas plantas se han vuelto resistentes.

- 10 Se divulgan además mutaciones novedosas en el gen EPSPS que confieren resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de la fosfometilglicina, p. ej., glifosato, a una planta o donde la EPSPS mutada tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con la EPSPS natural.

5.1 Oligonucleobases recombinagénicas

- 15 La invención se puede llevar a la práctica con oligonucleobases recombinagénicas que tienen las conformaciones y propiedades químicas descritas en el gen de la patente de Estados Unidos N.º 5 565 350 de Kmiec (Kmiec I) y la patente de EE. UU. N.º 5 731 181 (Kmiec II). Kmiec I describe un método para introducir alteraciones genéticas específicas en un gen diana. Las oligonucleobases recombinagénicas de Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos hebras complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos de tipo ARN (un "segmento de ARN") cuyas bases se emparejan con los nucleótidos de tipo ADN de la otra hebra.

- 20 Kmiec II divulga que los componentes que no son nucleótidos que contienen bases de tipo purina y pirimidina pueden ser sustituidos por nucleótidos. Las patentes de EE. UU. N.ºs 5 756 325; 5 871 984; 5 760 012; 5 888 983; 5 795 972; 5 780 296; 5 945 339; 6 004 804 y 6 010 907 y en la patente internacional N.º PCT/US00/23457; y en las publicaciones de patente internacional N.ºs WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789, se divulgan moléculas recombinagénicas adicionales que se pueden utilizar para la presente invención.
- 25 La expresión "oligonucleobase recombinagénica" se utiliza en la presente para referirse a moléculas que se pueden utilizar en los métodos de la presente invención e incluyen moléculas que contienen oligonucleótidos o compuestos que no son nucleótidos bicatenarios mixtos descritos en Kmiec II, oligodesoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas recombinagénicas descritas en las patentes y publicaciones de patente mencionadas anteriormente.

- 30 La oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido bicatenario mixto en el cual los nucleótidos de tipo ARN del oligonucleótido bicatenario mixto se vuelven resistentes a la RNasa reemplazando el 2'-hidroxilo con una funcionalidad de tipo fluoro, cloro o bromo o colocando un sustituyente en el 2'-O. Los sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes descritos en Kmiec II. Los sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes descritos en la patente de EE. UU. N.º 5 334 711 (Sproat) y los sustituyentes descritos en las publicaciones de patente EP 629 387 y EP 679 657 (de manera global, las solicitudes Martin). Tal y como se utiliza en la presente, un derivado de tipo
- 35 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido con un sustituyente descrito en las solicitudes Martin o Sproat se denomina un "(ribonucleótido sustituido en 2')". Tal y como se utiliza en la presente, la expresión "nucleótido de tipo ARN" se refiere a un nucleótido 2'-hidroxilo o sustituido en 2' que está unido a otros nucleótidos de un oligonucleótido bicatenario mixto mediante una unión de tipo fosfodiéster no sustituido o cualquiera de las uniones no naturales descritas en Kmiec I o Kmiec II. Tal y como expresa la presente,
- 40 la expresión "nucleótido de tipo desoxirribo" se refiere a un nucleótido que tiene un 2'-H, el cual puede estar unido a otros nucleótidos de un MDON mediante una unión de tipo fosfodiéster no sustituido o cualquiera de las uniones no naturales descritas en Kmiec I o Kmiec II.

- La oligonucleobase recombinagénica es un oligonucleótido bicatenario mixto que está unido únicamente mediante enlaces de tipo fosfodiéster no sustituido. Como una alternativa, la unión se realiza mediante fosfodiésteres
- 45 sustituidos, derivados de fosfodiéster y uniones no basadas en el fósforo como los descritos en Kmiec II. Como alternativa, cada nucleótido de tipo ARN del oligonucleótido bicatenario mixto es un nucleótido sustituido en 2'. Los ribonucleótidos sustituidos en 2' podrán ser ribonucleótidos con una sustitución de tipo 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxietiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Los ribonucleótidos sustituidos en 2' preferidos son los nucleótidos con una sustitución de tipo 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi y 2'-aliloxi. Como alternativa, el oligonucleótido bicatenario mixto está unido mediante enlaces de tipo fosfodiéster no
- 50 sustituido.

- Aunque el oligonucleótido bicatenario mixto que tiene un único tipo de nucleótido de tipo ARN sustituido en 2' se sintetiza de manera más conveniente, los métodos se pueden llevar a la práctica con oligonucleótidos bicatenarios mixtos que tienen dos o más tipos de nucleótidos de tipo ARN. La función de un segmento de ARN podrá no verse
- 55 afectada por la interrupción causada por la introducción de un desoxinucleótido entre dos trinucleótidos de tipo ARN, en consecuencia, la expresión "segmento de ARN" engloba un "segmento de ARN interrumpido" de este tipo. Un segmento de ARN no interrumpido se denomina un segmento de ARN contiguo. En una realización alternativa, un segmento de ARN puede contener nucleótidos 2'-OH no sustituidos y resistentes a la RNasa alternantes. Los oligonucleótidos bicatenarios mixtos preferentemente tendrán menos de 100 nucleótidos y más preferentemente
- 60 menos de 85 nucleótidos pero más de 50 nucleótidos. La primera y segunda hebras presentan un emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las hebras del oligonucleótido bicatenario mixto están enlazadas covalentemente

mediante un conector, tal como un hexa-, penta- o tetranucleótido monocatenario de manera que la primera y segunda hebras son segmentos de una cadena oligonucleotídica sencilla que tiene un único extremo 3' y un único extremo 5'. Los extremos 3' y 5' pueden protegerse mediante la adición de una "caperuza de tipo horquilla" de manera que los nucleótidos 3'- y 5'-terminales presenten un emparejamiento de Watson-Crick con los nucleótidos adyacentes. Se puede colocar, adicionalmente, una segunda caperuza de tipo horquilla en la unión entre la primera y segunda hebras distante de los extremos 3' y 5', de modo que el emparejamiento de Watson-Crick entre la primera y segunda hebras se estabilice.

La primera y segunda hebras contienen dos regiones que son homólogas a dos fragmentos del gen EPSPS diana, es decir, tienen la misma secuencia que el gen diana. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y podrá contener uno o más nucleótidos de tipo ADN del segmento de ADN conector y también podrá contener nucleótidos de tipo ADN que no están comprendidos en el segmento de ADN intercalado. Las dos regiones de homología están separadas por una región que tiene una secuencia que difiere de la secuencia del gen diana, denominada una "región heteróloga", y cada una de ellas es adyacente a dicha región. La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos emparejados erróneamente. Los nucleótidos emparejados erróneamente pueden ser contiguos o, como alternativa, pueden estar separados por uno o dos nucleótidos que son homólogos al gen diana. Como alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción de uno, dos, tres o de cinco o menos nucleótidos. Como alternativa, la secuencia del oligonucleótido bicatenario mixto podrá diferir de la secuencia del gen diana únicamente por la delección de uno, dos, tres o cinco o menos nucleótidos del oligonucleótido bicatenario mixto. En este caso, se considera que la longitud y posición de la región heteróloga es la longitud de la delección, aun cuando no estén comprendidos en la región heteróloga nucleótidos del oligonucleótido bicatenario mixto. La distancia entre los fragmentos del gen diana que son complementarios con las dos regiones homólogas es exactamente la longitud de la región heteróloga cuando se pretende una sustitución o sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas están separadas de esta manera en el oligonucleótido bicatenario mixto más lejos de lo que lo están sus fragmentos homólogos complementarios en el gen y el caso inverso es aplicable cuando la región heteróloga codifica una delección.

Cada uno de los segmentos de ARN de los oligonucleótidos bicatenarios mixtos son parte de una región homóloga, es decir, una región cuya secuencia es idéntica a un fragmento del gen diana, cuyos segmentos juntos contienen preferentemente al menos 13 nucleótidos de tipo ARN y, preferentemente, entre 16 y 25 nucleótidos de tipo ARN o, aún más preferentemente, 18-22 nucleótidos de tipo ARN o, de la manera más preferida, 20 nucleótidos. En una realización, los segmentos de ARN de las regiones de heterología están separados, es decir, "conectados" por un segmento de ADN intercalado y son adyacentes a este. En una realización, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN intercalado. Un segmento de ADN intercalado que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido bicatenario mixto se denomina un "segmento mutador".

El cambio que se va introducir en el gen EPSPS diana está codificado por la región heteróloga. El cambio que se va introducir en el gen EPSPS puede ser un cambio en una o más bases de la secuencia del gen EPSPS o la adición o delección de una o más bases.

Como alternativa, la oligonucleobase recombinagénica es un vector mutacional oligodesoxinucleotídico monocatenario o SSOMV, que se divulga en la solicitud de patente internacional PCT/US00/23457. La secuencia del SSOMV está basada en los mismos principios que los vectores mutacionales descritos en las patentes de EE. UU. N.^{os} 5 756 325; 5 871 984; 5 760 012; 5 888 983; 5 795 972; 5 780 296; 5 945 339; 6 004 804 y 6 010 907 y en las publicaciones internacionales N.^{os} WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas a la secuencia diana separadas por una región que contiene la alteración genética deseada denominada la región mutadora. La región mutadora puede tener una secuencia que tiene la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia diana, pero que tiene una secuencia diferente. Una región mutadora de este tipo puede provocar una sustitución. Como alternativa, las regiones homólogas del SSOMV pueden ser contiguas entre sí, mientras que las regiones en el gen diana que tienen la misma secuencia están separadas por uno, dos o más nucleótidos. Un SSOMV de este tipo provoca una delección en el gen diana de los nucleótidos que están ausentes del SSOMV. Por último, la secuencia del gen diana que es idéntica a las regiones homólogas podrá ser adyacente en el gen diana pero estar separada por uno o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Un SSOMV de este tipo provoca una inserción en la secuencia del gen diana.

Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que están unidos mediante enlaces fosfodiéster no modificados excepto en que la unión internucleotídica 3'-terminal y/o 5'-terminal o, como alternativa, las dos uniones internucleotídicas 3'-terminal y/o 5'-terminal pueden ser un fosforotioato o un fosfoamidato. Tal y como se utiliza en la presente, una unión internucleotídica es la unión entre nucleótidos del SSOMV y no incluye la unión entre el nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' y un sustituyente de bloqueo, consulte la parte anterior. La longitud del SSOMV está comprendida entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología tienen, en consecuencia, una longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deberían tener cada una longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

El SSOMV se puede diseñar para que sea complementario tanto a la hebra codificante como a la no codificante del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una única base, se prefiere que el nucleótido mutador sea una pirimidina. En la medida en que esto es coherente con la consecución del resultado funcional deseado, se prefiere que el nucleótido mutador y el nucleótido diana de la hebra complementaria sean pirimidinas. Son

particularmente preferidos los SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido mutador C o T se empareja de manera errónea, respectivamente, con un nucleótido C o T de la hebra complementaria.

Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un sustituyente de bloqueo 5' que se una a los carbonos 5'-terminales mediante un conector. Las propiedades químicas del conector no son cruciales, con la excepción de su longitud, que debería tener preferentemente al menos una longitud de 6 átomos y del hecho de que el conector debería ser flexible. Se pueden utilizar varios sustituyentes atóxicos, tales como biotina, colesterol u otros esteroides o un tinte fluorescente catiónico no intercalante. Son reactivos particularmente preferidos para generar SSOMV los reactivos comercializados como Cy3TM y Cy5TM por Glen Research, Sterling VA, que son fosforoamiditos bloqueados que, tras la incorporación en un oligonucleótido, producen los tintes indomonocarbocianina e indodicarbocianina con una sustitución 3,3',3',3'-tetrametilo *N,N'*-isopropilo, respectivamente. Cy3 es el más preferido. Cuando la indocarbocianina está sustituida con *N*-oxialquilo se puede unir convenientemente al oligodesoxinucleótido 5'-terminal mediante un fosfodiéster con un fosfato 5'-terminal. Las propiedades químicas del tinte conector entre el tinte y el oligodesoxinucleótido no son cruciales y se escogen por su conveniencia sintética. Cuando se utiliza el fosforamidito comercializado Cy3 según las indicaciones, la modificación 5' resultante consiste en un sustituyente de bloqueo y el conector juntos que son una indomonocarbocianina con una sustitución de tipo 3,3',3',3'-tetrametilo *N*-hidroxipropilo, *N'*-fosfatidilpropilo.

El tinte de tipo indocarbocianina podrá estar tetrasustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin desear ceñirse a la teoría, estas sustituciones evitan que el tinte sea un tinte intercalante. La identidad de los sustituyentes en estas posiciones no es crucial. Además, el SSOMV puede tener un sustituyente de bloqueo 3'. Nuevamente, las propiedades químicas del sustituyente de bloqueo 3' no son cruciales.

5.2 La ubicación y el tipo de mutación introducida en el gen EPSPS

En una realización de la presente invención, el gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (remítase a la Figura 1A) y la enzima EPSPS correspondiente (remítase a la Figura 1B) comprenden una mutación en uno o más residuos aminoácidos seleccionados a partir del grupo constituido por Leu₁₇₃, Gly₁₇₇, Thr₁₇₈, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Pro₁₈₂, Ser₉₈, Ser₂₂₅ y Leu₁₉₈ o en un residuo aminoácido análogo en un gen EPSPS de otra especie y la mutación resulta en una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la enzima EPSPS en comparación con la secuencia natural:

- (i) Leu₁₇₃ – Phe
- (ii) Gly₁₇₇ – Ala o Ile
- (iii) Thr₁₇₈ – Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₉ – Gly
- (v) Met₁₈₀ – Cys
- (vi) Arg₁₈₁ – Leu o Ser
- (vii) Pro₁₈₂ – Leu o Ser
- (viii) Ser₉₈ – Asp
- (ix) Ser₂₅₅ – Ala
- (x) Leu₁₉₈ – Lys.

En otra realización de la presente invención, en el producto del gen EPSPS, el residuo aminoácido que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Leu-Tyr-Leu-Gly-Asn (SEQ ID NO:29) y se cambia a Phe; o en el residuo aminoácido que se va a cambiar es Gly en la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEQ ID NO:30) y se cambia a Ala o Ile; o el aminoácido que se va a cambiar es Thr en la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEQ ID NO:31) y se cambia a Ile, Val o Leu; o el aminoácido que se va a cambiar es Ala en la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEQ ID NO:32) y se cambia a Gly; o el aminoácido que se va a cambiar es Met en la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro (SEQ ID NO:33) y se cambia a Cys; o el aminoácido que se va a cambiar es Arg en la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEQ ID NO:34) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Pro en la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO:35) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEQ ID NO:36) y se cambia a Asp; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEQ ID NO:37) y se cambia a Ala; o el aminoácido que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEQ ID NO:38) y se cambia a Lys. En otras realizaciones, se pueden realizar uno o más de los cambios anteriores en la secuencia de aminoácidos de EPSPS.

Como alternativa, y/o además, la mutación podría resultar en el reemplazo de cualquier aminoácido en las posiciones correspondientes a la 256, 284-288 y 353-356 con respecto a la proteína EPSPS representada en la Figura 1B (SEQ ID NO.2).

Como alternativa, se muta el gen EPSPS en la posición aminoácida 177, en la cual se reemplaza Gly por Ala. Como alternativa, se trata de la sustitución de Thr en la posición aminoácida 178 por Ile. Como alternativa, una mutación en la posición aminoácida 177 en la cual Gly se reemplaza por Ala, más la sustitución adicional de Thr en la posición 178 por Ile. Como alternativa, mutaciones en la posición aminoácida 178, en la cual Thr se reemplaza por Ile, más la mutación adicional en la posición 182, en la cual Pro se reemplaza por Ser. Como alternativa, incluye la sustitución de Gly en la posición aminoácida 177 por Ala, más la mutación adicional en la posición aminoácida 182, en la cual Pro se sustituye por Ser. Otras secuencias de EPSPS mutadas comprenden la

sustitución de Gly en la posición 177 por Ala, más la sustitución en la posición 178, en la cual Thr se reemplaza por Ile, más la sustitución adicional de Pro en la posición aminoacídica 182 por Ser. Como alternativa, la sustitución de Thr en la posición aminoacídica 178 por Val y la mutación adicional en la posición aminoacídica 182, en la cual Pro se reemplaza por Ser. Como alternativa, incluye la sustitución de Thr en la posición 178 por Leu, más la mutación en la posición aminoacídica 182, en la cual Pro se reemplaza por Ser. Una realización adicional incluye la sustitución en la posición aminoacídica 177 en la cual Gly se reemplaza por Ala, más la sustitución de Thr en la posición 178 por Val. La sustitución en la posición aminoacídica 177 en la cual Gly se reemplaza por Ala, más el reemplazo de Thr en la posición aminoacídica 178 por Leu (remítase a la Figura 2).

Las mutaciones anteriores en el gen EPSPS se describieron utilizando el gen (SEQ ID NO:1) y la proteína (SEQ ID NO:2) EPSPS de *Arabidopsis thaliana*. La presente invención también engloba los genes EPSPS mutantes de otras especies. Sin embargo, debido a las variaciones en los genes EPSPS de diferentes especies, el número de los residuos aminoacídicos que se ha de cambiar en una especie podrá ser diferente en otra especie. No obstante, el experto en la técnica podrá identificar fácilmente la posición análoga mediante la homología de secuencias. Por ejemplo, las Figuras 3A-C muestran las secuencias alineadas de nucleótidos y la Figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos alineadas de cuatro genes EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Petunia hybrida* y *Brassica napus*. Por lo tanto, las posiciones análogas en *Zea mays* son Leu₉₇, Gly₁₀₁, Thr₁₀₂, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Pro₁₀₆, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de EPSPS de *Zea mays* se muta en una o más de las siguientes posiciones aminoacídicas y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- (i) Leu₉₇ – Phe
- (ii) Gly₁₀₁ – Ala o Ile
- (iii) Thr₁₀₂ – Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₀₃ – Gly
- (v) Met₁₀₄ – Cys
- (vi) Arg₁₀₅ – Leu o Ser
- (vii) Pro₁₀₆ – Leu o Ser
- (viii) Ser₂₃ – Asp
- (ix) Ser₁₇₉ – Ala
- (x) Leu₁₂₂ – Lys.

En el producto del gen EPSPS de *Zea mays*, el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Leu-Phe-Leu-Gly-Asn (SEQ ID NO:39) y se cambia a Phe; o en el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Gly en la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEQ ID NO:30) y se cambia a Ala o Ile; o el aminoácido que se va a cambiar es Thr en la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEQ ID NO:31) y se cambia a Ile, Val o Leu; o el aminoácido que se va a cambiar es Ala en la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEQ ID NO:32) y se cambia a Gly; o el aminoácido que se va a cambiar es Met en la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro (SEQ ID NO:33) y se cambia a Cys; o el aminoácido que se va a cambiar es Arg en la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEQ ID NO:34) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Pro en la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO:35) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEQ ID NO:36) y se cambia a Asp; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEQ ID NO:37) y se cambia a Ala; o el aminoácido que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEQ ID NO:38) y se cambia a Lys. Como alternativa, se pueden realizar uno o más de los cambios anteriores en la secuencia de aminoácidos de EPSPS.

En *Brassica napus*, las posiciones aminoacídicas análogas son Leu₁₆₉, Gly₁₇₃, Thr₁₇₄, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Pro₁₇₈, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de EPSPS de *Brassica napus* se muta en una o más de las siguientes posiciones aminoacídicas y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- (i) Leu₁₆₉ – Phe
- (ii) Gly₁₇₃ – Ala o Ile
- (iii) Thr₁₇₄ – Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₅ – Gly
- (v) Met₁₇₆ – Cys
- (vi) Arg₁₇₇ – Leu o Ser
- (vii) Pro₁₇₈ – Leu o Ser
- (viii) Ser₉₄ – Asp
- (ix) Ser₂₅₁ – Ala
- (x) Leu₁₉₄ – Lys.

En el producto del gen EPSPS de *Brassica napus*, el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Leu-Tyr-Leu-Gly-Asn (SEQ ID NO:29) y se cambia a Phe; o en el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Gly en la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEQ ID NO:30) y se cambia a Ala o Ile; o el aminoácido que se va a cambiar es Thr en la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEQ ID NO:31) y se cambia a Ile, Val o Leu; o el aminoácido que se va a cambiar es Ala en la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEQ ID NO:32) y se cambia a Gly; o el aminoácido que se va a cambiar es Met en la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro (SEQ ID NO:33) y se cambia a Cys; o el aminoácido que se va a cambiar es Arg en la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEQ ID NO:34) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Pro en la

secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO:35) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va cambiar es Ser en la secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEQ ID NO:36) y se cambia a Asp; o el aminoácido que se va cambiar es Ser en la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEQ ID NO:37) y se cambia a Ala; o el aminoácido que se va cambiar es Leu en la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEQ ID NO:38) y se cambia a Lys. Como alternativa, se pueden realizar uno o más de los cambios anteriores en la secuencia de aminoácidos de EPSPS.

En *Petunia hybrida*, las posiciones aminoacídicas análogas son Leu₁₆₉, Gly₁₇₃, Thr₁₇₄, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Pro₁₇₈, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de EPSPS de *Petunia hybrida* se muta en una o más de las siguientes posiciones aminoacídicas y resulta en una o más de las siguientes sustituciones:

- (i) Leu₁₆₉ – Phe
- (ii) Gly₁₇₃ – Ala o Ile
- (iii) Thr₁₇₄ – Ile o Val o Leu
- (iv) Ala₁₇₅ – Gly
- (v) Met₁₇₆ – Cys
- (vi) Arg₁₇₇ – Leu o Ser
- (vii) Pro₁₇₈ – Leu o Ser
- (viii) Ser₉₄ – Asp
- (ix) Ser₂₅₁ – Ala
- (x) Leu₁₉₄ – Lys.

En el producto del gen EPSPS de *Petunia hybrida*, el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Leu-Phe-Leu-Gly-Asn (SEQ ID NO:29) y se cambia a Phe; o en el residuo aminoacídico que se va a cambiar es Gly en la secuencia contigua Asn-Ala-Gly-Thr-Ala (SEQ ID NO:30) y se cambia a Ala o Ile; o el aminoácido que se va a cambiar es Thr en la secuencia contigua Ala-Gly-Thr-Ala-Met (SEQ ID NO:31) y se cambia a Ile, Val o Leu; o el aminoácido que se va a cambiar es Ala en la secuencia contigua Gly-Thr-Ala-Met-Arg (SEQ ID NO:32) y se cambia a Gly; o el aminoácido que se va a cambiar es Met en la secuencia contigua Thr-Ala-Met-Arg-Pro (SEQ ID NO:33) y se cambia a Cys; o el aminoácido que se va a cambiar es Arg en la secuencia contigua Ala-Met-Arg-Pro-Leu (SEQ ID NO:34) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Pro en la secuencia contigua Met-Arg-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO:35) y se cambia a Leu o Ser; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Pro-Gly-Ser-Lys-Ser (SEQ ID NO:36) y se cambia a Asp; o el aminoácido que se va a cambiar es Ser en la secuencia contigua Ile-Ser-Ser-Gln-Tyr (SEQ ID NO:37) y se cambia a Ala; o el aminoácido que se va a cambiar es Leu en la secuencia contigua Tyr-Val-Leu-Asp-Gly (SEQ ID NO:38) y se cambia a Lys. Como alternativa, se pueden realizar uno o más de los cambios anteriores en la secuencia de aminoácidos de EPSPS.

5.3 El suministro de oligonucleobases recombinagénicas a células vegetales

En los métodos de la presente invención, se puede utilizar cualquier método de uso común para transformar una célula vegetal con oligonucleobases recombinagénicas. A continuación, se enumeran métodos ilustrativos.

5.3.1 Microportadores y microfibras

El uso de microportadores (microesferas) metálicos para introducir fragmentos grandes de ADN en células vegetales que tienen paredes celulares de celulosa mediante la penetración de proyectiles es muy conocida por los expertos en la técnica relevante (en lo sucesivo en la presente, suministro biolístico). Las patentes de Estados Unidos N.º 4 945 050; 5 100 792 y 5 204 253 describen técnicas generales para seleccionar micro portadores y dispositivos para proyectarlos.

Las condiciones específicas para utilizar microportadores en los métodos de la presente invención se describen en la publicación internacional WO 99/07865. En una técnica ilustrativa, se añaden microportadores enfriados con hielo (60 mg/mL), oligonucleótido bicatenario mixto (60 mg/mL), CaCl₂ 2.5 M y espermidina 0.1 M en ese orden; la mezcla se agita suavemente, p. ej., mediante agitación vortical, durante 10 minutos y se deja que repose a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual los microportadores se diluyen en 5 volúmenes de etanol, se centrifugan y se resuspenden en etanol al 100%. Se pueden obtener buenos resultados con una concentración en la solución de adhesión de 8-10 µg/µL de microportadores, 14-17 µg/mL de oligonucleótido bicatenario mixto, CaCl₂ 1.1-1.4 M y espermidina 18-22 mM. Se observaron los resultados óptimos con condiciones de 8 µg/µL de micro portadores, 16.5 µg/mL de oligonucleótido bicatenario mixto, CaCl₂ 1.3 M y espermidina 21 mM.

Las oligonucleobases recombinagénicas también se pueden introducir en células vegetales para llevar a la práctica la presente invención utilizando microfibras para penetrar en la pared celular y la membrana celular. La patente de EE. UU. N.º 5 302 523 de Coffee *et al.* describe la utilización de fibras de carburo de silicio de 30 x 0.5 µm y 10 x 0.3 µm para facilitar la transformación de cultivos de maíz en suspensión de Black Mexican Sweet. Cualquier técnica mecánica que se pueda utilizar para introducir ADN para la transformación de la célula vegetal utilizando micro fibras se puede utilizar para suministrar las oligonucleobases recombinagénicas para la transmutación.

Una técnica ilustrativa para el suministro con microfibras de una oligonucleobase recombinagénica es de la siguiente manera: se suspenden microfibras estériles (2 µg) en 150 µL de medio de cultivo vegetal que contiene aproximadamente 10 µg de oligonucleótido bicatenario mixto. Se permite que el cultivo de suspensión sedimente y se agitan de manera vortical volúmenes idénticos de células empaquetadas y la suspensión de fibra estéril/nucleótido durante 10 minutos y se siembra en placas. Se aplica medio selectivo inmediatamente o con un

retraso de hasta aproximadamente 120 horas según proceda para el rasgo concreto.

5.3.2 Electroporación de protoplastos

En una realización alternativa, las oligonucleobases recombinagénicas se pueden suministrar a la célula vegetal mediante la electroporación de un protoplasto derivado de una parte de la planta. Los protoplastos se forman mediante el tratamiento enzimático de una parte de la planta, particularmente una hoja, de acuerdo con técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. Remítase a, p. ej., Gallois *et al.*, 1996, en *Methods in Molecular Biology* 55:89-107, Humana Press, Totowa, NJ; Kipp *et al.*, 1999, en *Methods in Molecular Biology* 133:213-221, Humana Press, Totowa, NJ. No es necesario cultivar los protoplastos en medio de cultivo antes de la electroporación. Las condiciones ilustrativas para la electroporación son 3×10^5 protoplastos en un volumen total de 0.3 mL con una concentración de oligonucleobase recombinagénica de entre 0.6-4 µg/mL.

5.3.3 Filamentos finos y microinyección

En otra realización alternativa más, la oligonucleobase recombinagénica se puede suministrar a la célula vegetal mediante filamentos finos o microinyección de la célula vegetal. La denominada técnica con filamentos finos se realiza esencialmente tal y como se describe en Frame *et al.*, 1994, *Plant J.*, 6:941-948. La oligonucleobase recombinagénica se añade a los filamentos finos y se utiliza para transformar las células vegetales. La oligonucleobase recombinagénica se podrá incubar conjuntamente con plásmidos que comprendan las secuencias que codifican las proteínas capaces de formar complejos de recombinasa en células vegetales, de modo que se cataliza la recombinación entre el oligonucleótido y la secuencia diana en el gen EPSPS.

5.4 Selección de plantas resistentes al glifosato

Las plantas o las células vegetales se pueden estudiar para determinar la resistencia o tolerancia a un herbicida utilizando métodos de uso común en la técnica, p. ej., cultivando la planta o célula vegetal en presencia de un herbicida y midiendo la tasa de crecimiento en comparación con la tasa de crecimiento en ausencia del herbicida.

6. Ejemplo

Los siguientes experimentos demuestran la producción de los genes EPSPS mutantes de *Arabidopsis thaliana* que son resistentes al herbicida glifosato y que permiten que las células vegetales mantengan una tasa de crecimiento.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Aislamiento de ADNc de EPSPS de *Arabidopsis thaliana*

Se amplificó un fragmento de ADN de 1.3 kb mediante PCR a partir de una colección de ADNc de *Arabidopsis* utilizando los cebadores AtEXPEXP1 y AtEXPEXP2CM-2. Se diseñaron los dos cebadores para amplificar el ADNc desde el péptido maduro hasta el codón de terminación. El cebador 5' AtEXPEXP1 contiene un sitio XbaI (subrayado) y el cebador 3' AtEXPEXP2CM-2 contiene un sitio BglII (subrayado), y dichos sitios serán útiles para la clonación del fragmento en el vector de expresión.

AtEXPEXP1

5'-GCTCTAGAGAAAGCGTCGGAGATTGTACTT-3' (SEQ ID NO:40)

AtEXPEXP2CM-2

5'-GCAGATCTGAGCTCTTAGTGCTTTGTGATTCTTTCAAGTAC-3' (SEQ ID NO:41)

Se escindió la banda de PCR del gel de agarosa y se purificó (GeneClean, Biol). A continuación se confirmó que su secuencia era la secuencia del péptido maduro del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana*.

6.1.2 Preparación del vector de expresión

Se obtuvo la región codificante de EPSPS del gen *AroE* de *Bacillus subtilis* mediante PCR utilizando los siguientes cebadores:

BsAroE5'Xba

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

BsAroE3'BamHI

5'-GCGGATCCTCAGGATTTTTCGAAAGCTTATTTAAATG-3' (SEQ ID NO:43).

El fragmento de PCR, que carece de un codón de iniciación (ATG), se clonó en fase con el marco de lectura del vector pACLacIMH6RecA reemplazando el ORF de RecA mediante la digestión con XbaI y BamHI. PACLacIMH6RecA contuvo la región LacI de Pet21 en las posiciones 1440-3176, la MH6 RecA en las posiciones 3809-5188, el gen de resistencia al cloranfenicol en las posiciones 5445-218 (5446-5885 y 1-218) y el origen de replicación p15A en las posiciones 5811-1424. La región codificante del gen RecA se clonó de *E. coli* en fase con el marco de lectura del codón de inicio y el conector de 6 histidinas (MH6) detrás del promotor LacZ de pUC19.

6.1.3 Clonación del gen EPSPS de *Arabidopsis* en un vector de expresión bacteriano

El fragmento de PCR de 1.3 kb de *Arabidopsis* se digirió con XbaI y BamHI (compatible con BglII) y se clonó en el plásmido pACYCLacIMH6EPSPS, en lugar del gen de *Bacillus*.

Los clones obtenidos (seleccionados con cloranfenicol) se secuenciaron a continuación y se confirmó que eran positivos. Se seleccionó uno de los clones confirmados (pAtEPS-12) y se confirmó también que las uniones entre el

ADNc y el plásmido de clonación eran idénticas a las secuencias esperadas.

6.1.4 Mutaciones puntuales novedosas en el gen EPSPS

Se diseñaron diez mutantes diferentes del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (remítase a la Figura 2). Para los experimentos de mutagénesis, se diseñaron cebadores para la PCR con una, dos o tres mutaciones. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un cebador flanqueante regular (5'ATEPS-198: 5'-GAAAGCGTCGGAGATTGTAC-3' (SEQ ID NO:44)) y uno de los cebadores que portaban la mutación (remítase a la Figura 5).

Los fragmentos de PCR de 353 pb obtenidos se purificaron (kit de purificación de PCR Qiagen) y se confirmó su secuencia. A continuación, se digirieron los fragmentos con PstI (subrayados en las secuencias de los cebadores) y BamHI y se ligaron con el vector pAtEPS-12, el cual se había digerido previamente con PstI y BamHI. Se utilizaron células competentes JM 109 (Promega) para la transformación y se sembraron en placas de LB que contenían cloranfenicol. A continuación, se aislaron clones de cada experimento de mutagénesis y se confirmó su secuencia.

6.1.5 Ensayos de resistencia al glifosato

Se prepararon células electrocompetentes de SA4247, una cepa Lac Z – *Salmonella typhi*, según procedimientos de uso común (remítase a Current Protocols in Molecular Biology, (Wiley and Sons, Inc.)). Se sometieron a electroporación 30 µL de células competentes SA4247 con 20 ng de cada ADN plasmídico que codificaba las proteínas EPSPS naturales y mutantes de *Arabidopsis*, EPSPS natural de *Bacillus*, junto con una transfección simulada como control. Los parámetros para la electroporación fueron 25 µF, 2.5 KV y 200 ohms. Después de la electroporación, se transfirieron las células a un tubo de cultivo de 15 mL y se suplementaron con 970 µL de medio SOC. Los cultivos se incubaron durante 1 ½ horas a 37 °C y 225 rpm. Se sembraron 50 µL de cada cultivo en placas de LB que contenían 17 µg/mL de cloranfenicol (por duplicado) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se seleccionaron 5 colonias de cada placa, se transfirieron a placas M9 y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Las colonias procedentes de la incubación nocturna en M9 sólido se inocularon en 4 mL de medio M9 líquido y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se inocularon 1-2 mL de cada cultivo nocturno (por duplicado) en 25 mL de medio M9 líquido que contenía cloranfenicol, IPTG y glifosato 17 mM o 0 mM (Aldrich, 33775-7), se midió la DO (a 600 nm) de partida y se normalizaron todos los cultivos para que comenzaran con la misma DO. Se realizó una medida de la DO a la hora durante siete horas. Como un control del crecimiento bacteriano, también se inoculó un cultivo de *Salmonella* no transformada en medio LB sencillo. En dos experimentos independientes, los clones A₁₇₇I₁₇₈, A₁₇₇V₁₇₈, A₁₇₇L₁₇₈ y I₁₇₇ no crecieron en medio M9, por lo tanto, no se pudieron realizar los ensayos de resistencia al glifosato con ellos.

6.1.7 Aislamiento y purificación de la proteína expresada a partir de clones bacterianos

Se inoculó un mililitro del cultivo nocturno de cada uno de los clones bacterianos en 100 mL de medio LB líquido que contenía cloranfenicol. Se permitió que las células crecieran a 37 °C hasta que alcanzaron una DO de 0.5-0.7 (aproximadamente 3 ½ horas). A continuación, se añadió IPTG a los cultivos con una concentración de 1.0 mM. Se cultivaron las células durante cinco horas más. A continuación, se sedimentaron a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.

El aislamiento y la purificación de las proteínas marcadas con His se realizó según el Sistema de Purificación de Proteínas Ni-NTA de Qiagen. Los lisados celulares y los eluidos se estudiaron por duplicado en geles de acrilamida al 12.5%. Uno de los geles se tiñó con plata para su visualización inmediata, el segundo gel se transfirió a una membrana Immobilon-P de Millipore, y se bloqueó durante toda la noche con leche al 5% en TBS-T. A continuación, se expuso la membrana a una solución del anticuerpo primario anti-His (Amersham Pharmacia biotech, n.º de cat. 37-4710), seguido de la exposición a una solución del anticuerpo secundario anti-Ig de ratón (NIF825, sistema de análisis por inmunoelectrotransferencia ECL de Amersham Pharmacia biotech, n.º de cat. RPN2108). Los lavados y las reacciones de detección se realizaron según las instrucciones del proveedor. Las autorradiografías se desarrollaron después de 5 minutos de exposición.

6.2 Resultados

Las células que contenían una mutación en el gen EPSPS produjeron células que eran resistentes al herbicida glifosato y que tenían una tasa de crecimiento sustancialmente similar en ausencia o presencia del glifosato, en comparación con las células naturales, independientemente de la presencia del glifosato (remítase a la Figura 6).

También se demostró que los clones de *Arabidopsis* que contenían un gen EPSPS mutante expresaron la proteína mutante sustancialmente con el mismo nivel que la proteína natural (remítase a la Figura 7).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> VALIGEN(US), INC.

<120> PLANTAS NO TRANSGÉNICAS RESISTENTES A HERBICIDAS

<130> 7991-086-228

<150> 60/158 027

<151> 07-10-1999

<150> 60/173 564

<151> 30-12-1999

<160> 44

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

5 <211> 2763

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

cccttcacgt	ctttttaga	aaccccat	tctttcttag	ggcccaattg	aaaaccaca	60
ttttctttca	cctaaccac	caaagcctg	cacatgtga	cgtgaacacc	aaactaacac	120
gtgtcâact	gccagtggt	atgataaat	ctcataccat	accagagtca	tagagttttt	180
ggttggtgaa	agatttgacg	gatgccttct	tctcatttct	caccaactcc	ctccaaaccc	240
aacaaaatgt	ttatattagc	aaagccgcca	aagtgtaaac	gaaagtttat	aaatttcatt	300
tctgtgatct	tacgtaattg	gaggaagatc	aaaattttca	atccccattc	ttcgattgct	360
tcaattgaag	tttctccgat	ggcgcaagtt	agcagaatct	gcaatgggtg	gcagaaccca	420
tctcttatct	ccaatctctc	gaaatccagt	caacgcaaat	ctcccttatc	ggtttctctg	480
aagacgcagc	agcatccacg	agcttatccg	atttcgtcgt	cgtggggatt	gaagaagagt	540
gggatgacgt	taattggctc	tgagcttcgt	cctcttaagg	tcagtctctc	tgtttccacg	600
gcgagagaa	cgctcgagat	tgtacttcaa	ccattagag	aaatctccgg	tcttattaag	660
cttctgggct	ccaagtctct	atcaaatcgg	atcctgcttc	tcgtgctctc	gtctgaggtg	720
tatatcactt	cgtttcgtcc	ttctctgtaa	tctgaactta	gattataaag	attgatactt	780
taccattttg	ctgtgggttt	atagggaaca	actgtagtgg	acaacttgtt	gaatagcgat	840
gacatcaatt	acatgcttga	tgcgttgaag	agattgggac	ttaatgtgga	aactgacagt	900
gaaaataatc	gtgctgtagt	tgaaggatgt	ggcgggatat	tcccagcttc	catagattca	960
aagagtata	tcgaacttta	cctcggtaat	gcaggaaacg	caatgcgtcc	acttaccgct	1020
gcggctactg	ctgcagggtg	aaacgcaagg	tagattgaag	gagttgatgc	ttcttggtat	1080
ttgatgttta	aggaatggag	cttttggtga	tgctttatga	tccatttatt	ccagttatgt	1140
gcttgatggg	gtgcctcgta	tgagagaaa	acctataggg	gatttggttg	ttggctctaa	1200
gcagcttggt	gctgatgttg	aatgtactct	tggaactaac	tgccctctcg	ttcgtgtcaa	1260
cgctaattgg	ggccttcccg	gtggaaaggt	tagatcttgc	aaatggcatg	tgaatatgta	1320
atctcgttcc	ttactctatg	aacacttgca	gaaatgtgtg	ttcatcatag	ccttagcttg	1380
acaagatttc	agtttttaac	ctactctcaa	cggatggatc	ctaaaaataga	atcggatttg	1440
gtgattgggt	ttcggtctcg	attaccgttt	tcggtgtatg	atttcttgat	taacaattag	1500
gagacatggt	atgcatttgc	aggtgaagct	ttctggatca	attagtagtc	agtacttgac	1560
tgctctgctc	atgtctgctc	ccttagctct	tggagacgtc	gagattgaga	ttgtcgataa	1620
attaatttct	gttccatata	ttgaaatgac	attgaagttg	atggaacggt	tcgggggttag	1680
tgctcgacat	agtgatagct	gggatcggtt	ctttgtcaag	ggcgggcaaa	aatacaagta	1740
ggagttattc	ttttcttctc	tttctgaaat	cacatccctt	agcttgacaa	tataatgact	1800
aaaagggtgaa	tgattcaggt	ctccgggttaa	tgcgtagtga	gaagggtgat	cttctagtgc	1860
atgttatctc	ttggctgggtg	ctgccattac	cgggtgaaact	gtcacagtcg	aagggtgtgg	1920
aactaccagc	ttgcaggtaa	tatttgtaca	ctgaatcatc	gacgaggctg	ttaagtttat	1980
agtgaatttc	gtctaggtca	aagtttcatc	ttttgacaag	ttgtatataa	catattcgca	2040
agatttctaag	ctcaattttt	gtgatgaatc	tctagggaga	tgtaaaaatc	gccgagggtcc	2100
ttgagaaaaat	gggatgtaaa	gtgtcctgga	cagagaacag	tgtgactgtg	acaggaccac	2160
ctagagatgc	ttttggaatg	agacacttgc	gggctattga	tgtcaacatg	aacaaaatgc	2220
ctgatgtagc	catgaccctt	gccgtcgttg	ctctctttgc	tgacggtcca	accaccatta	2280
gagatggtaa	gtaaaaagct	ctctcttata	attaagggtt	ctcaatattc	atgatcactt	2340
aatttctgtt	ggttaatata	gtggctagct	ggagagttaa	ggagacagaa	aggatgattg	2400
ccatttgcac	agagcttaga	aaagtaagag	attcttatct	ctctctttct	gtctcttgac	2460
agtgtctatt	ctaagtaatt	agctcataaa	tttgtgtgtt	tgtgttcagc	tgggagctac	2520
agtggaagaa	ggttcagatt	attgtgtgat	aactccgccc	aaaaagggtg	aaacggcaga	2580
gattgatata	tatgatgata	atagaatggc	aatggcattc	tctcttgacg	cttgtgctga	2640
tggtccaatc	accatcaacg	actctgggtg	caccaggaaa	accttccccg	actacttcca	2700
agtacttgaa	agaatcacaa	agcactaaac	aataaactct	gttttttctt	ctgatccaag	2760
ctt						2763

10

<210> 2

<211> 520

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

15 <400> 2

ES 2 337 762 T5

Met	Ala	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Cys	Asn	Gly	Val	Gln	Asn	Pro	Ser	Leu
1				5					10					15	
Ile	Ser	Asn	Leu	Ser	Lys	Ser	Ser	Gln	Arg	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	Val
		20						25				30			
Ser	Leu	Lys	Thr	Gln	Gln	His	Pro	Arg	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ser	Ser
		35					40					45			
Trp	Gly	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Met	Thr	Leu	Ile	Gly	Ser	Glu	Leu	Arg
50						55					60				
Pro	Leu	Lys	Val	Met	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	Glu
65					70					75				80	
Ile	Val	Leu	Gln	Pro	Ile	Arg	Glu	Ile	Ser	Gly	Leu	Ile	Lys	Leu	Pro
				85					90					95	
Gly	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser
				100					105					110	
Glu	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Asn	Ser	Asp	Asp	Ile	Asn
		115					120							125	
Tyr	Met	Leu	Asp	Ala	Leu	Lys	Arg	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Asp
130						135						140			
Ser	Glu	Asn	Asn	Arg	Ala	Val	Val	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Ile	Phe	Pro
145					150					155				160	
Ala	Ser	Ile	Asp	Ser	Lys	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala
				165						170				175	
Gly	Thr	Ala	Met	Arg	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly
			180					185						190	
Asn	Ala	Ser	Tyr	Val	Leu	Asp	Gly	Val	Pro	Arg	Met	Arg	Glu	Arg	Pro
		195					200						205		
Ile	Gly	Asp	Leu	Val	Val	Gly	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Val	Glu
210						215						220			
Cys	Thr	Leu	Gly	Thr	Asn	Cys	Pro	Pro	Val	Arg	Val	Asn	Ala	Asn	Gly
225					230					235				240	
Gly	Leu	Pro	Gly	Gly	Lys	Val	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln
				245					250					255	
Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Val
			260					265					270		
Glu	Ile	Glu	Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Glu	Met
		275					280						285		
Thr	Leu	Lys	Leu	Met	Glu	Arg	Phe	Gly	Val	Ser	Val	Glu	His	Ser	Asp
	290					295						300			
Ser	Trp	Asp	Arg	Phe	Phe	Val	Lys	Gly	Gly	Gln	Lys	Tyr	Lys	Ser	Pro
305				310						315				320	
Gly	Asn	Ala	Tyr	Val	Glu	Gly	Asp	Ala	Ser	Ser	Ala	Cys	Tyr	Phe	Leu
				325						330				335	
Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Cys	Gly
			340					345					350		
Thr	Thr	Ser	Leu	Gln	Gly	Asp	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Lys
		355					360						365		
Met	Gly	Cys	Lys	Val	Ser	Trp	Thr	Glu	Asn	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Gly
370						375						380			
Pro	Pro	Arg	Asp	Ala	Phe	Gly	Met	Arg	His	Leu	Arg	Ala	Ile	Asp	Val
385					390					395				400	
Asn	Met	Asn	Lys	Met	Pro	Asp	Val	Ala	Met	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Ala
				405						410				415	
Leu	Phe	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Asp	Val	Ala	Ser	Trp	Arg
			420					425					430		
Val	Lys	Glu	Thr	Glu	Arg	Met	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Glu	Leu	Arg	Lys
		435					440					445			
Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	Asp	Tyr	Cys	Val	Ile	Thr	Pro
450						455						460			
Pro	Lys	Lys	Val	Lys	Thr	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asp	His	Arg
465					470					475				480	
Met	Ala	Met	Ala	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Pro	Ile	Thr
				485						490				495	
Ile	Asn	Asp	Ser	Gly	Cys	Thr	Arg	Lys	Thr	Phe	Pro	Asp	Tyr	Phe	Gln
			500					505						510	
Val	Leu	Glu	Arg	Ile	Thr	Lys	His								
			515				520								

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

5 <400> 3

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

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT

10 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 33
 <212> ADN

15 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

20 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT

25 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 33
 <212> ADN

30 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

35 <400> 7

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

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT

40 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN

45

<213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
5 <400> 9
ctc ggt aat gca gga ata gca atg cgt tca ctt
Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
33
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
10 <213> *Arabidopsis thaliana*
<400> 10
Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
<210> 11
<211> 33
15 <212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
20 <400> 11
ctc ggt aat gca gca aca gca atg cgt tca ctt
Leu Gly Asn Ala Ala Thr Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
33
<210> 12
<211> 11
<212> PRT
25 <213> *Arabidopsis thaliana*
<400> 12
Leu Gly Asn Ala Ala Thr Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
<210> 13
<211> 33
30 <212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
35 <400> 13
ctc ggt aat gca gca ata gca atg cgt tca ctt
Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
33
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
40 <213> *Arabidopsis thaliana*
<400> 14
Leu Gly Asn Ala Ala Ile Ala Met Arg Ser Leu
1 5 10
<210> 15
<211> 33
45 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)
 5 <400> 15
 ctc ggt aat gca gga gta gca atg cgt tca ctt 33
 Leu Gly Asn Ala Gly Val Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 16
 Leu Gly Asn Ala Gly Val Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 33
 15 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)
 20 <400> 17
 ctc ggt aat gca gga tta gca atg cgt tca ctt 33
 Leu Gly Asn Ala Gly Leu Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 18
 Leu Gly Asn Ala Gly Leu Ala Met Arg Ser Leu
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)
 35 <400> 19
 ctc ggt aat gca gca gta gca atg cgt cca ctt 33
 Leu Gly Asn Ala Ala Val Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 20
 Leu Gly Asn Ala Ala Val Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 33
 45 <212> ADN

ES 2 337 762 T5

<213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

5 <400> 21
 ctc ggt aat gca gca tta gca atg cgt cca ctt 33
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 22
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Ala Met Arg Pro Leu
 1 5 10

<210> 23
 <211> 3831
 15 <212> ADN
 <213> *Brassica napus*
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> 1...3831
 20 <223> n=a, c, g, o t
 <400> 23
 agatcttaaa ggctcttttc cagtctcacc taccaaaact ataagaaaat ccacttgctg 60
 tctgaaatag ccgacgtgga taaagtactt aagacgtggc acattattat tggctactag 120
 aaaaaaaact catacaccat cgtaggagtt ggggttggtg aagaatttga tgggtgcctc 180
 tccccccccc actcaccaaa ctcatgttct ttgtaaagcc gtcactacaa caacaaagga 240
 gacgacagtt ctatagaaaa gctttcaa atcaatcaatg gcgcaatcta gcagaatctg 300
 ccatggcgtg cagaacccat gtgttatcat ctccaatctc tccaaatcca accaaaacaa 360
 atcacctttc tccgtctcct tgaagacgca tcagcctcga gcttcttcgt ggggattgaa 420
 gaagagtggg acgatgctaa acggttctgt aattcgcccc gttaaggtaa cagcttctgt 480
 ttccacgtcc gagaaagctt cagagattgt gcttcaacca atcagagaaa tctcgggtct 540

ES 2 337 762 T5

cattaagcta	cccggatcca	aatctctctc	caatcggatc	ctccttcttg	ccgctctatc	600
tgaggtagac	atacttgctt	agtgttaggc	ctttgctgtg	agattttggg	aactatagac	660
aattttagtaa	gaatttttat	ataatttttt	taaaaaaaat	cagaagccta	tatatattta	720
aatttttcca	aaatttttgg	aggttatagg	cttatgttac	accattctag	tctgcatctt	780
tcggtttgag	actgaagaat	tttatttttt	aaaaaattat	tatagggaa	tactgtagt	840
gacaacttgt	tgaacagtga	tgacatcaac	tacatgcttg	atgcgttgaa	gaagctgggg	900
cttaacgtgg	aacgtgacag	tgtaaacaa	cgtgcggttg	ttgaaggatg	cgggtggaata	960
ttcccagctt	ccttagattc	caagagtgat	attgagttgt	accttgggaa	tcgaggaaaca	1020
gccatgcgtc	cactcaccgc	tcgagttaca	gctgcagggtg	gcaacgcgag	gtaagggttaa	1080
cgagtttttt	gttattgtca	agaaattgat	cttgtgtttg	atgcttttag	tttggtttgt	1140
tttctagtta	tgtacttgat	gggggtgcta	gaatgaggga	aagacctata	ggagattttg	1200
ttgttggtct	taagcagctt	ggtgctgatg	ttgagttgt	tcctggcact	aactgtcctc	1260
ctgttcgtgt	caatgcta	ggtggccttc	ccggtggaaa	ggtgatcttc	acatttactc	1320
tatgaattgt	ttgcagcagt	ctttgttcat	cacagccttt	gcttcacatt	atttcatctt	1380
ttagtttgtt	gttatattac	ttgatggatc	tttaaaaagg	aattgggtct	ggtgtgaaag	1440
tgattagcaa	ttctctcgaa	ttccttgtag	ggcgtggggc	attactaagt	gaaacattag	1500
cctatttaacc	cccaaaattt	ttgaaaaaaa	tttagtatat	ggcccaaaaa	tagtttttta	1560
aaaaattaga	aaaactttta	ataaatcgtc	tacagtcccn	naaatcttag	agccggccct	1620
gcttgtagtg	tttctcgatt	gatataattag	actatgtttt	gaattttcag	gtgaagcttt	1680
ctggatcgat	cagtagtcag	tacttgactg	ccctctcat	ggcagctcct	ttagctcttg	1740
tagaagtgga	gatttgatgc	attgataaac	tgatatctgt	tccatatggt	gaaatgacat	1800
tgaagtgtat	ggagcgtttt	ggtgttagtg	ccgagcatag	tgatagctgg	gatcgtttct	1860
ttgtcaaggg	cggtcagaaa	tacaagtaat	gagttctttt	aagttagag	ttagattgaa	1920
gaatgaatga	ctgattaaac	aaatggcaaa	actgattcag	gtcgcctggt	aatgcttatg	1980
tagaagtgga	tgcttaagtg	gcttagatct	tcctggctgg	tgctgccatt	actggtgaaa	2040
ctgttactgt	cgaaggttgt	ggaacaacta	gcctccaggt	agtttatcca	ctctgaatca	2100
tcaaatatta	ttctccctcc	gttttatgtt	aaagtgtcatt	agcttttaaa	ttttgtttca	2160
ttaaaagtgt	cattttacat	tttcaatgca	tatatataat	aaattttcca	gtttttacta	2220
attcattaat	tacaaaaaat	aaacaaaaat	tatatataat	aatgtaaaat	tcgtaaattg	2280
tggtcgaata	ccttaaacct	tatgaaacgg	aaaccttatg	aaacagaggg	agtactaatt	2340
ttataataaaa	atttgattag	ttcaaaagttg	tgataaacat	gttttgtaag	aatctaagct	2400
cattctctctt	ttattttttg	tgatgaatcc	aaagggagat	gtgaaattcg	cagaggttct	2460
tgagaaaaatg	ggatgtaaaag	tgctatggac	agagaacagt	gtgactgtga	ctggaccatc	2520
aagagatgct	tttggaaatga	ggcacttgcg	tgctgttgat	gtcaacatga	acaaaatgcc	2580
tgatgtagcc	atgactctag	ccgttggtgc	tcctcttgcc	gatgggtccaa	ccaccatcag	2640
agatggtaaa	gcaaaaccct	ctctttgaat	cagcgtgttt	taaaagattc	atggttgctt	2700
aaactctatt	agtgctatg	tgagagtgta	aggagacaga	gaggatgatt	gaggatgatt	2760
gccatttgca	cagagcttag	aaaggttaagt	ttccttttct	ctcatgctct	ctcattcgaa	2820
gttaatcggt	gcataacttt	ttgctggttt	tttttttgcg	ttcagcttgg	agctacagt	2880
gaagaagggt	cagattattg	tggtgataact	ccaccagcaa	aggtgaaacc	ggcggagatt	2940
gatacgtag	atgatcatag	aatggcgatg	gcgttctcgc	ttgcagcttg	tgctgatgtt	3000
ccagtcacca	tcaaggatcc	tggtgtcacc	aggaagactt	tccttgacta	cttccaagtc	3060
cttgaaagta	tcacaaagca	ttaaaagacc	ctttctctcg	atccaaatgt	gagaatctgt	3120
tgctttctct	ttgttgccac	tgtaacattt	attagaagaa	caaagtgtgt	gtgttaagag	3180
tggttttgct	tgtaatgaac	tgagttagat	gcaatcggtg	aatcagtttt	gggcctta	3240
aaaggggttta	ggaagctgca	gctgagtgat	tgtttttgat	cgatcatctt	tgaaaatgtg	3300
tttgtttgag	taatttttct	aggggttgagt	tgattacact	aagaaacact	ttttgatttt	3360
ctattacacc	tatagacact	tcttacatgt	gacacacttt	gttgttgga	agcaacagat	3420
tggtggacaat	tttgccctta	atggaaagaa	cacagttgtg	gatgggtgat	ttgtggacga	3480
ttccatgtgt	gggttagggg	atttgtggac	ggatgatgtg	tagatgagtg	atgagtaatg	3540
tgtagaatatg	tgatgtta	gtgtttatag	tagataagtg	gacaaactct	ctgttttgat	3600
tccataaaac	tatacaacaa	tacgtggaca	tggaactcatg	ttactaaaat	tataccgtaa	3660
aacgtggaca	cggactctgt	atctccaata	caaacacttg	gcttcttcag	ctcaattgat	3720
aaattatctg	cagttaaact	tcaatcaaga	tgagaaagag	atgatattgt	gaatatgagc	3780
ggagagagaa	atcgaagaag	cgtttacctt	ttgtcggaga	gtaatagatc	t	3831

<210> 24

<211> 1944

<212> ADN

5 <213> *Petunia hybrida*

<400> 24

gaattccctc	aatctttact	ttcaagaatg	gcacaaatta	acaacatggc	tcaagggata	60
caaaccctta	atcccaattc	caattttccat	aaaccccaag	ttcctaaatc	ttcaagtttt	120
cttggttttg	gatctaaaaa	actgaaaaat	tcagcaaatt	ctatgttggt	tttgaaaaaa	180
gattcaattt	ttatgcaaaa	gttttggttcc	tttaggattt	cagcatcagt	ggctacagca	240
cagaagcctt	ctgagatagt	gttgcaaccc	attaaagaga	tttcaggcac	tgtaaatttg	300
cctggctcta	aatcattatc	taatagaatt	ctccttcttg	ctgccttatc	tgaagggaaca	360
actgtggttg	acaattttact	aagtagtgat	gatattcatt	acatgcttgg	tgcttgaaa	420
acacttggtg	tgcatgtaga	agaagatagt	gcaaaccaac	gagctgttgt	tgaaggttgt	480
ggtgggcttt	tccctgttg	taaagagtcc	aagggaagaa	ttcaactgtt	ccttggaat	540
gcaggaacag	caatgcccgc	actaacagca	gcagtactg	tagctgggtg	aaattcaagg	600
tatgtacttg	atggagttcc	tcgaatgaga	gagagaccaa	ttagtgattt	ggttgatggt	660
cttaaacagc	ttggtgcaga	ggttgattgt	ttccttggtg	cgaaatgtcc	tcctgttcga	720
attgtcagca	agggaggtct	tcctggagg	aagggtcaagc	tctctggatc	cattagcagc	780
caatacttga	ctgctctgct	tatggctgct	ccactggctt	taggagatgt	ggagattgaa	840
atcattgaca	aactaattag	tgtaccttat	gtcgagatga	cattgaagtt	gatggagcga	900
tttggtattt	ctgtggagca	cagtagtagc	tgggacagg	tctttgtccg	aggaggtcag	960
aaatacaagt	ctcctggaaa	agcttttgtc	gaagggtgatg	cttcaagtgc	tagctacttc	1020
ttggctggtg	cagcagtcac	aggtggaact	atcactgttg	aagggttgtg	gacaaacagt	1080
ttacaggggg	atgtcaaat	tgctgaggtg	cttgaaaaa	tgggagctga	agttacgtgg	1140
acagagaaca	gtgtcacagt	caaaggacct	ccaaggagtt	cttctgggag	gaagcatttg	1200
cgtgccattg	atgtgaacat	gaataaaaatg	cctgatgttg	ccatgacact	tgctgttgtt	1260
gcactttatg	ctgatggtcc	cacagctata	agagatgttg	ctagctggag	agtcaaggaa	1320
actgagcgca	tgatcgccat	atgcacagaa	cttaggaagt	taggagcaac	cgttgaagaa	1380
ggaccagact	actgcataat	caccccaccg	gagaaactaa	atgtgaccga	tattgatata	1440
tacgatgatc	acaggatggc	catggctttt	tctctgtctg	cttggtgcaga	tgctcccgct	1500
accatcaatg	accctggctg	cacgcggaaa	accttcctta	actactttga	tgtacttcag	1560
cagtactcca	agcattgaac	cgcttcctta	tattgcagaa	tgtaagtaag	aatatgtgaa	1620
gagtttagtt	cttgtacaag	acaggctacg	actgcctggt	atcagaacca	caatgggttc	1680
catttcagtt	cagaagggca	ttccaaggct	tcgaactctt	tacttatttg	cgagtgatga	1740
aatgtatttg	ttagagttga	gcttcttttt	gtctttaagg	aatgtacact	aatagagtta	1800
agaattacta	gtatgggcca	gtgtaaggag	tactattact	ctttgcttat	tttattgatt	1860
gagttttgtc	aaggatctgg	ctttgtcaag	aattactggt	taattttatt	gacaatctca	1920
tgtgtctaaa	tgaatttgtt	tgat				1944

<210> 25
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*
 <400> 25

gcgggtgccg	aggagatcgt	gctgcagccc	atcaaggaga	tctccggcac	cgtcaagctg	60
ccgggggtcca	agtcgctttc	caaccggatc	ctcctactcg	ccgccctgtc	cgagggggaca	120
acagtgggtg	ataacctgct	gaacagttag	gatgtccact	acatgctcgg	ggccttgagg	180
actcttggtc	tctctgtcga	agcggacaaa	gctgccaaaa	gagctgtagt	tggtggctgt	240
ggtggaaagt	tcccagttga	ggatgctaaa	gaggaagtgc	agctcttctt	ggggaatgct	300
ggaaactgcaa	tgcggccatt	gacagcagct	gttactgctg	ctgggtggaaa	tgcaacttac	360
gtgcttgatg	gagtaccaag	aatgagggag	agaccatttg	gcgacttggt	tgctcgattg	420
aagcagcttg	gtgcagatgt	tgattgtttc	cttggcactg	actgcccacc	tgctcgtgtc	480
aatggaatcg	gagggctacc	tggtggcaag	gtcaagctgt	ctggctccat	cagcagtcag	540
tacttgagtg	ccttgctgat	ggctgtcctt	ttggctcttg	gggatgtgga	gattgaaatc	600
attgataaat	taacttccat	tccgtacgtc	gaaatgacat	tgagattgat	ggagcgtttt	660
ggtgtgaaag	cagagcatte	tgatagctgg	gacagattct	acattaaggg	aggtcaaaaa	720
tacaagctcc	ctaaaaatgc	ctatgttgaa	ggtgatgcct	caagcgcaag	ctatttcttg	780
gctggtgctg	caattactgg	agggactgtg	actgtggaag	gttggtggcac	caccagtttg	840

caggggtgatg	tgaagtttgc	tgagggtactg	gagatgatgg	gagcgaaggt	tacatggacc	900
gcgactagcg	taactgttac	tggcccaccg	cgggagccat	ttgggaggaa	acacctcaag	960
gcgattgatg	tcaacatgaa	caagatgcct	gatgtcgcca	tgactcttgc	tgtggttgcc	1020
ctctttgccg	atggcccagc	agccatcaga	gacgtggctt	cctggagagt	aaaggagacc	1080
gagaggatgg	ttgcgatccg	gacggagcta	accaagctgg	gagcatctgt	tgaggaaggg	1140
ccggactact	gcacatcac	gccgcccggg	aagctgaacg	tgacggcgat	cgacacgtac	1200
gacgaccaca	ggatggccat	ggccttcttc	cttgccgcct	gtgccgaggt	ccccgtcacc	1260
atccgggacc	ctgggtgcac	ccggaagacc	ttccccgact	acttcgatgt	gctgagcact	1320
ttcgtcaaga	atttaa					1335

<210> 26
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> *Brassica napus*
 <400> 26

ES 2 337 762 T5

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

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

<210> 27
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> *Petunia hybrida*

<400>

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

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

<210> 28

5 <211> 444

<212> PRT
 <213> *Zea mays*
 <400> 28

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

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

5

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

10

<220>
 <223> Cebador mutante
 <400> 29

ES 2 337 762 T5

	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctgtt gctgcattac	60
	cgag	64
	<210> 30	
	<211> 64	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 30	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctatt gctgcattac	60
	cgag	64
10	<210> 31	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador mutante	
	<400> 31	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctatt cctgcattac	60
	cgag	64
	<210> 32	
	<211> 64	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 32	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctgtt gctgcattac	60
25	cgag	64
	<210> 33	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 33	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctatt gctgcattac	60
	cgag	64
	<210> 34	
35	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
40	<400> 34	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctgtt attgcattac	60
	cgag	64
	<210> 35	
	<211> 64	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 35	

ES 2 337 762 T5

	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctact cctgcattac	60
	cgag	64
	<210> 36	
	<211> 64	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 36	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtgaacg cattgctaact cctgcattac	60
	cgag	64
10	<210> 37	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador mutante	
	<400> 37	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctact gctgcattac	60
	cgag	64
	<210> 38	
	<211> 64	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<400> 38	
	cgtttccacc tgcagcagtg accgcagcgg taagtggacg cattgctaact gctgcattac	60
25	cgag	64
	<210> 39	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Petunia hybrida</i>	
30	<400> 39	
	Leu Phe Leu Gly Asn	
	1 5	
	<210> 40	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 40	
	gctctagaga aagcgtcgga gattgtact	
40	<210> 41	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 41	
	gcagatctga gctcttagtg cttgtgatt cttcaagta c	41
	<210> 42	
	<211> 28	
50	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 42
 5 gcgtctagaa aaacgagata aggtgcag 28
 <210> 43
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 43
 gcggatcctc aggattttt cgaaagctta tttaaag 38
 <210> 44
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 44
 gaaagcgtcg gagattgtac 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta no transgénica que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfometilglicina, que comprende:

(a) introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen EPSPS mutante que exprese una proteína EPSPS que está mutada en una o más posiciones aminoacídicas, donde dichas posiciones se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₇₃, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Ser₉₈, Ser₂₅₅ y Leu₁₉₈ de la proteína EPSPS de *Arabidopsis* o en un residuo aminoacídico análogo de un gen EPSPS de otra especie;

(b) identificar una célula vegetal que tiene un crecimiento normal en comparación con la célula vegetal natural correspondiente en presencia de glifosato; y

(c) regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas que tiene dicho gen EPSPS mutado a partir de dicha célula vegetal;

donde la planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas muestra un crecimiento y desarrollo normales en comparación con los de las plantas naturales correspondientes y donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima natural.

2. Un método para producir una planta no transgénica que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfometilglicina, que comprende:

(a) introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen EPSPS para producir células vegetales con un gen EPSPS mutante que exprese una proteína EPSPS mutante que está mutada en una o más posiciones aminoacídicas, donde dichas posiciones se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₇₃, Ala₁₇₉, Met₁₈₀, Arg₁₈₁, Ser₉₈, Ser₂₅₅ y Leu₁₉₈ de la proteína EPSPS de *Arabidopsis* o en un residuo aminoacídico análogo de un gen EPSPS de otra especie;

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

(c) regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas que tiene dicho gen EPSPS mutado a partir de dicha célula vegetal;

donde la planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas muestra un crecimiento y desarrollo normales en comparación con los de las plantas naturales correspondientes y donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima natural.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el cual la oligonucleobase recombinagénica es un nucleótido bicatenario mixto o un vector mutacional oligodesoxinucleotídico monocatenario (SSOMV).

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual el nucleótido bicatenario mixto contiene una primera región homóloga que tiene una secuencia idéntica a la secuencia de al menos 6 pares de bases del primer fragmento del gen EPSPS diana y una segunda región homóloga que tiene una secuencia idéntica a la secuencia de al menos 6 pares de bases de un segundo fragmento del gen EPSPS diana y una región intercalada que contiene al menos una nucleobase heteróloga respecto al gen EPSPS diana, donde la región intercalada conecta la primera y segunda regiones homólogas.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el cual la oligonucleobase recombinagénica se introduce mediante electroporación.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₉₇, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂ del gen EPSPS de *Zea mays*.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ del gen EPSPS de una *Brassica* sp.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ del gen EPSPS de *Petunia hybrida*.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el cual las células vegetales se seleccionan a partir del grupo constituido por maíz, trigo, arroz, cebada, soja, algodón, remolacha azucarera, colza oleaginosa, canola, lino, girasol, patata, tabaco, tomate, alfalfa, álamo, pino, eucalipto, manzana, lechuga, guisantes, lentejas, uva, hierbas forrajeras y *Brassica* sp.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₉₇, Ala₁₀₃, Met₁₀₄, Arg₁₀₅, Ser₂₃, Ser₁₇₉ y Leu₁₂₂ en el gen EPSPS de *Zea mays*.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ en el gen EPSPS de una *Brassica napus*.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual las posiciones aminoacídicas se seleccionan a partir del grupo constituido por Leu₁₆₉, Ala₁₇₅, Met₁₇₆, Arg₁₇₇, Ser₉₄, Ser₂₅₁ y Leu₁₉₄ en el gen EPSPS de *Petunia hybrida*.

13. Un método para producir una planta no transgénica que es resistente o tolerante a un herbicida de la familia de la fosfometilglicina que comprende:

(a) introducir en células vegetales una oligonucleobase recombinagénica con una mutación dirigida en el gen

EPSPS para producir células vegetales con un gen EPSPS mutante que expresa una proteína EPSPS que está mutada en dos posiciones aminoacídicas, donde dichas posiciones se seleccionan a partir del grupo constituido por Thr₁₇₈ y Pro₁₈₂, en la proteína EPSPS de *Arabidopsis* o en un residuo aminoacídico análogo en un gen EPSPS de otra especie, donde Thr₁₇₈ se cambia por Val o Leu y Pro₁₈₂ se cambia a serina;

5 (b) identificar una célula vegetal que tiene un crecimiento normal en comparación con la célula vegetal natural correspondiente en presencia de glifosato; y

(c) regenerar una planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas que tiene dicho gen EPSPS mutado a partir de dicha célula vegetal,

10 donde la planta no transgénica resistente o tolerante a herbicidas muestra un crecimiento y un desarrollo normales en comparación con las plantas naturales correspondientes, y

donde la enzima EPSPS mutada tiene la misma actividad catalítica en comparación con la de la enzima natural.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual las posiciones aminoacídicas son Thr₁₀₂ y Pro₁₀₆ del gen EPSPS de *Zea mays*.

15 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual las posiciones aminoacídicas son Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ del gen EPSPS de una *Brassica napus*.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual las posiciones aminoacídicas son Thr₁₇₄ y Pro₁₇₈ del gen EPSPS de *Petunia hybrida*.

Secuencia de ADN:

cccttcatgtctttttagaaccattatctttcttagggccaattgaaaaccacattttctttcacctaacc
 ccaaagccttgacatgttgacgtgaacaccaaactaacacgtgtcactgcccagtggttatgataaatgctcatacc
 ataccagagtcataagagtttttgggttgaaagatttgacggatgccttcttctcattttctcaccactccctccaaa
 cccaacaaaatgtttatattagcaaacgccaagtgtaaacgaaagttataaatttcatttctgtgatcttacgta
 attggaggaagatcaaaattttcaatccccattcttcgattgcttcaattgaagtttctccg
 [inicio del péptido de tránsito]
 ATGGCGCAAGTTAGCAGAATCTGCAATGGTGTGCAGAACCCATCTCTTATCTCCAATCTCTCGAAATCCAGTCAACGCA
 AATCTCCCTTATCGGTTTCTCTGAAGACGCAGCAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTCTGTCGTGCTGGGGATTGAAGAA
 GAGTGGGATGACGTTAATTGGCTCTGAGCTTCGTCTCTTAAGGTCATGCTTCTGTTTCCACGGCGGAG
 [inicio del péptido maduro]
 AAAGCGTCGGAGATTGTACTTCAACCCATTAGAGAAATCTCCGGTCTTATTAAGCTTCTGGCTCCAATCTCTATCAA
 ATCGGATCTGCTTCTCGTGCTCTGTCTGAGGTATATATCACTTCGTTTCGTCTTCTCTGTAATCTGAACCTTAGATT
 AATAAGATTGATACTTTACCATTTTGTGTGGTTTTATAGGGAACAACGTAGTGGACAACCTTGTTGAATAGCGATGAC
 ATCAATTACATGCTTGATGCGTTGAAGAGATTGGGACTTAATGTGGAACCTGACAGTGAAAATAATCGTGCTGTAGTTG
 AAGGATGTGGCGGATATCCAGCTTCCATAGATTCAAAGAGTGATATCGAACTTTACCTCGGTAATGCAGGAACAGC
 AATGCGTCCACTTACCGCTGCGGTCACTGCTGCAGGTGGAACGCAAGGTAGATTGAAGGAGTTGATGCTTCTGGTAT
 TTGATGTTAAGGAATGGAGCTTTTGTGATGCTTTATGATCCATTTATCCAGTTATGTGCTTGATGGGGTGCCTCGT
 ATGAGAGAAAGACCTATAGGGGATTGGTTGTTGGTCTTAAGCAGCTTGGTGCTGATGTTGAATGTACTCTTGAACCTA
 ACTGCCCTCTGTTCTGTCGAACGCTAATGGTGGCTTCCCGGTGGAAGGTTAGATCTTGCAAAATGGCATGTGAATAT
 GTAATCTCGTTTCTTACTCTATGAACACTTGCAGAAATGTGTGTTTATCATAGCTTAGCTTGACAAGATTTCAGTTTT
 TAATCTACTCTCAACGGATGGATCCTAAAATAGAATCGGATTTGGTGATTGGTTTTCTGTTCTCGATTACCGTTTTCTGTT
 GTATGATTTCTTGATTAACAATTAGGAGACATGTTATGCATTTGCAGGTGAAGCTTTCTGGATCAATTAGTAGTCAGTA
 CTTGACTGCTCTGCTCATGTCTGCTCCCTAGCTCTTGGAGACGTCGAGATTGAGATTGTCGATAAATTAATTTCTGTT
 CCATATGTTGAAATGACATTGAAGTTGATGGAACGTTTGGGGTTAGTGTCGAGCATAGTGATAGCTGGGATCGTTTCT
 TTGTCAAGGGCGGGCAAAAATACAAGTAGGAGTTATCTTTCTTCTTCTTCTGAAATCACATCCCTTAGCTTGACAAT
 ATAATGACTAAAAGGTGAATGATTGAGGTCTCCGGTAAATGCGTATGTAGAAGGTGATGCTTCTAGTGATGTTATTTCT
 TTGGCTGGTGCTGCCATTACCGGTGAAACTGTACAGTCGAAGGTTGTGGAACCTACCAGCTTGCAAGTAATATTTGTAC
 ACTGAATCATCGACGAGGCTGTTAAGTTTTATAGTGAAATTCGTCTAGGTCAAAGTTTCATCTTTTGACAAGTTGTATAT
 AACATATTGCAAGATTCTAAGCTCAATTTTGTGATGAATCTCTAGGGAGATGTAATTTGCGCGAGGTCCTTGAGAA
 AATGGGATGTAAGGTGCTCTGGACAGAGAACAGTGTGACTGTGACAGGACCACCTAGAGATGCTTTTGGAATGAGACAC
 TTGCGGGCTATTGATGTCAACATGAACAAAATGCCTGATGTAGCCATGACCCTTGCCGTCGTTGCTCTCTTTGCTGACG
 GTCCAACCACTTAGAGATGGTAAGTAAAAGCTCTCTCTTATAATTAAGGTTTCTCAATATTCATGATCACTTAATT
 CTGTTTGGTTAATATAGTGGCTAGCTGGAGAGTAAGGAGACAGAAAGGATGATTGCCATTTGCACAGAGCTTAGAAAA
 GTAAGAGATTCTATCTCTCTTTCTGTCTCTTGACAGTGCTCATTCTAAGTAATTAGCTCATAAATTTGTGTGTTG
 TGTTGAGCTGGGAGCTACAGTGAAGAAGGTTGAGATTATTGTGTGATAACTCCGCCAAAAAGGTGAAAACGGCAGAG
 ATTGATACATATGATGATCATAGAATGGCAATGGCATTCTCTTTGACGCTTGCTGCTGATGTTCCAATCACCATCAACG
 ACTCTGGTTGACACGAGGAAAACCTTCCCGACTACTTCCAAGTACTTGAAAGAATCACAAAGCACTAAaataaactc
 tggttttttcttctgatccaagctt

FIG. 1A

Secuencia de la proteína:

MAQVSRICNGVQNPSLISNLSKSSQRKSPLSVSLKTQQHPRAYPISSSWGLKKSGMTLIGSELRPLKVMSSVSTAE
KASEIVLQPIREISGLIKLPGSKSLSNRIILLAAALSEGTTVDNLLNSDDINYMLDALKRLGLNVETDSENNRAVV
EGCGGIFPASIDSKSDIELYLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVECTLG
TNCPPVRVNANGGLPGGKVKLSGSISSOYL TALLMSAPLALGDVEIEIVDKLISVPYVEMTLKLMERFGVSV EHS
SWDRFFVKGGQKYKSPGNAYVEGDASSACYFLAGAAITGETVTVEGCGTTSLOGDVKFAEVLEKMGCKVSWTENS
TVTGPPRDAFGMRHLRAIDVNMNKMPDVAMTLAVVALFADGPTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRKL GATVEEG
SDYCVITPPKKVKTAEIDTYDDHRMAMAFSLAACADVPIITINDSGCTRKTFPDYFQVLERITKH

FIG. 1 B

Secuencia natural de *Arabidopsis thaliana*:

Posición	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183
	L	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L
	CTC	GGT	AAT	GCA	GGA	ACA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
<u>Secuencias mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>:</u>											
Nombre											
A ₁₇₇	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	ACA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
	L	G	N	A	A	T	A	M	R	P	L
I ₁₇₈	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	ATA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
	L	G	N	A	G	I	A	M	R	P	L
A ₁₇₇ I ₁₇₈	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	ATA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
	L	G	N	A	A	I	A	M	R	P	L
I ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC	GGT	AAT	GCA	GGA	ATA	GCA	ATG	CGT	TCA	CTT
	L	G	N	A	G	I	A	M	R	S	L
A ₁₇₇ S ₁₈₂	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	ACA	GCA	ATG	CGT	TCA	CTT
	L	G	N	A	A	T	A	M	R	S	L
A ₁₇₇ I ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	ATA	GCA	ATG	CGT	TCA	CTT
	L	G	N	A	A	I	A	M	R	S	L
V ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC	GGT	AAT	GCA	GGA	GTA	GCA	ATG	CGT	TCA	CTT
	L	G	N	A	G	V	A	M	R	S	L
L ₁₇₈ S ₁₈₂	CTC	GGT	AAT	GCA	GGA	TTA	GCA	ATG	CGT	TCA	CTT
	L	G	N	A	G	L	A	M	R	S	L
A ₁₇₇ V ₁₇₈	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	GTA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
	L	G	N	A	A	V	A	M	R	P	L
A ₁₇₇ L ₁₇₈	CTC	GGT	AAT	GCA	GCA	TTA	GCA	ATG	CGT	CCA	CTT
	L	G	N	A	A	L	A	M	R	P	L

FIG.2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1	ATGGCGAAGTTAGCAGAACTCGCAATGGTGTGCAGAACCAAT	CTCTATCTCCAACTCTCGAAATCCAGTCAACGCAAAATCTCC	CTTATCGG	ADNcepspsat.SEQ						
1	ATGGCGCAATCTAGCAGAACTCGCATGGCGTGCAGAACCAATGTTATCATCTCCAAATCTCGAAATCCAAACAAATCACC	TTCTCGG	ADNcepsbn.SEQ							
1	ATGGCACAAATTAAACAACATGGCTCAAGGATACAAACCTTA	ATCCCAATTCCAAATTTCCATAAACCCCAAGTTCTCTAAATCTTCAAGTTTCTTG	ADNcaroapet.SEQ							
1	GCGG									epspszm.SEQ
95	TTTCT	CTGAAGACGACGAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTCGTGCTGGGGATTGAAGAAGAGTGGGATGACGTTAATTGGCTCTGAGCTTCG	ADNcepspsat.SEQ							
98	TCTCC	TTGAAGACGCAATCAGC	CTCGAGCTT	CTTCGTGGGATTGAAGAAGAGTGGAACGATGCTAAACGGTTCTGTAAATTCG	ADNcepsbn.SEQ					
98	TTTTTGGATCTAAAAAACTGAATAATTCAGCAAAAT	CTATGTTGGTTTTTGAAAAAAGATTCAATTT	ATGCAAAAGTTTGG	ADNcaroapet.SEQ						
5										epspszm.SEQ
192	TCTCTTAAGGTCATGCTTCTGTTTCCACGGGAGAAAGCGTGGAGATTGTACTCAACCCATTAGAGAAATCTCGGGTCTTATTAAGCTTCTCTGGC	ADNcepspsat.SEQ								
180	CCGGTTAAGGTAACAGCTTCTGTTTCCACGTCGAGAAAGCTTCAGAGATTGTGCTTCAACCAATCAGACAAATCTCGGGTCTTAAAGTACCCGGA	ADNcepsbn.SEQ								
180	TTCTTTAGGATTTCAAGCATCAGTGGCTACAGCACAGAAGCTTCTGAGATAGTTTGCAACCCATTAAAGAGATTTCAAGGACACTGTTAAATGGCTGGC	ADNcaroapet.SEQ								
14					AGATCGTGTCTGCAGGCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGGGG					epspszm.SEQ
292	TCCAAGTCTCTATCAAAATCGGATCCTGCTTCTCGCTGCTCTGCTGAGGGAACAACCTGTAGTGGCAACTTGTGAATAGGATGACATCAATTACATGC	ADNcepspsat.SEQ								
280	TCCAAATCTCTCCTCAATCGGATCCTCTCTTGGCGCTCTATCTGAGGGAACCTACTGTAGTGGCAACTTGTGAACAGTGTGATGACATCAACTACATGC	ADNcepsbn.SEQ								
280	TCTAAATCATTTATCTAATAGAAATTCCTCTTCTGCTGCTTATCTGAGGGAACAACCTGTGGTTGACAAATTTACTAAGTAGTGTATTCATTACATGC	ADNcaroapet.SEQ								
67	TCCAAGTGGCTTTCCAACCGGATCCTCTCTACTCGCGGCCCTGTCCGAGGGGACAACAGTGGTTGATTAACCTGCTGACAGTGGAGGTGTCCACTACATGC	epspszm.SEQ								
392	TTGATGGCTTGAAGAGATTGGGACTTAATGTGGAAACTGACAGTGAATAATGTGCTGTAGTTGAAGGATGTGGGGGATATCCAGCTTCCATAGA	ADNcepspsat.SEQ								
380	TTGATGGCTTGAAGAGCTGGGGCTTAACGTGGAACTGTGACAGTGTAAACAACCGTGGCTTGTGAAGGATGCGGTGGAAATATCCAGCTTCTTAGA	ADNcepsbn.SEQ								
380	TTGGTGGCTTGAACAACACTTGGACTGCATGTAGAAGAAGATAGTGCAACCAACACGAGCTGTGTGAAGGTTGTGGTGGGCTTTCCCTGTGTGTAAGA	ADNcaroapet.SEQ								
167	TCGGGGCTTGAAGACTCTTGGTCTCTCTGCGAAGGGAACAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTGGTGTGGTGGAAAGTCCAGTTG	AGGA	epspszm.SEQ							

FIG. 3A

FIG. 3B

	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	
992	GTGCATGTTATTCTTGGCTGGTGCTGCCATTACCGGTGAAAGTGTCAAGTCAAGTGTGTAACATACCAGCTTGCAGGGAGATGTAATAATTCGCCGA	ADNcepspsat.SEQ									
980	GTGCTAGCTATTCTTGGCTGGTGCTGCCATTACTGGTGAACAGTGTACTGCGAAGGTGTGCGAACACTTAGCCTCCAGGGAGATGTAATAATTCGCAGA	ADNcepsbn.SEQ									
980	GTGCTAGCTACTTCTTGGCTGGTGACAGCTCACAGTGGAACTATCACTGTTGAAGTCTTGCGACAACAGTGTACAGGGGATGTCAAATTTGCTGA	ADNcaroapet.SEQ									
764	GCGCAAGCTATTCTTGGCTGGTGCTGCAATTACTGGAGGGAGCTGTGACTGTGGAAGGTGTGCGACCAACCAGTTTGCAGGGTGATGTGAAGTTTGTCTGA	epspszm.SEQ									
1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190		
1092	GGTCTCTGAGAAAAATGGGATGTAAGGTGTCTTGGACAGAGAACAGTGTGACTGTGACAGSACCACCTAGAGATGCTTTTGSAAITGAGACACTTTCGGGGCT	ADNcepspsat.SEQ									
1080	GGTCTCTGAGAAAAATGGGATGTAAGGTGTGATGGACAGAGAACAGTGTGACTGTGACTGSAACCATCAAGAGATGCTTTTGSAAITGAGACACTTTCGGGGT	ADNcepsbn.SEQ									
1080	GGTACTTGAaaaaaatgggagctgaagtgtacgttgsgacagagaacagtggtcacagtcaaggaccctccaaggagtttcttcgsgagaaagcattttgcgtgcc	ADNcaroapet.SEQ									
864	GGTACTGGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGSGACCGAGACTAGCGTAACCTGTACTGGCCCCAGCGGGAGGCCATTGCGGAGSAAACACCTCAAGGGC	epspszm.SEQ									
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290		
1192	ATTGATGTCAACATGAACAAAATGCCCTGATGTAGCCATGACCTTGGCGTGTGCTCTCTTGTGACGGTCCAACCACCATTAGAGATGTGGCTAGCT	ADNcepspsat.SEQ									
11180	GTTGATGTCAACATGAACAAAATGCCCTGATGTAGCCATGACTCTAGCCGTGTGCTCTCTTGTGCGATGGTCCAACCACCATCAGAGATGTGGCTAGCT	ADNcepsbn.SEQ									
11180	ATTGATGTGAACATGAATAAAATGCCCTGATGTGCCATGACACTTGTGTTGTGACCTTATGCTGATGGTCCCACAGCTATAAGAGATGTGTCTAGCT	ADNcaroapet.SEQ									
964	ATTGATGTCAACATGAACAAAGATGCCCTGATGTGCCATGACTCTTGTGTGTTGCCCTCTTGTGCCGATGGCCCGACAGCCATCAGAGACGTGGCTTTCT	epspszm.SEQ									
1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390		
1292	GGAGAGTAAAGGAGACAGAAAGGATGATTGCCATTGTCACAGAGCTTAGAAAAC TGGAAGCTTGGAGCTACAGTGSAAAGGTTTCAGATTATGTGTGATACTCC	ADNcepspsat.SEQ									
1280	GGAGAGTTAAGGAGACAGAGAGGATGTTGCCATTGTCACAGAGCTTAGAAAAGCTTGGAGCTACAGTGSAAAGGTTTCAGATTATGTGTGATACTCC	ADNcepsbn.SEQ									
1280	GSAGAGTCAAGSAACTTGAGCGCATGATGCGCATATGCACAGAACTTAGSAGTTAGSAGCAACCGTTTGAAGAGGACACAGACTACTGCTAATAATCACCCC	ADNcaroapet.SEQ									
11064	GSAGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGTTGCGATCGGACGGAGCTAACCAAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGGCCGAGCTACTGCTATCATCAGCC	epspszm.SEQ									
1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490		
1392	GCCCCAAAAGGTGAAAAACGGCAGAGATTGATACATATGATCATAGAA TGGCAATGGCACTCTCTTGCAGCTTGTGCTGATGTTCGAATCACCATC	ADNcepspsat.SEQ									
1380	ACCAGCAAAGGTGAAAACCGCGGAGATTGATAGCTATGATGATCATAGAA TGGCGATGGCGTTCGCTTGCAGCTTGTGCTGATGTTCAGCTCACCATC	ADNcepsbn.SEQ									
1380	ACCGGAGAAACTAAATGTGACCGATTTGATACATACGATGATCAGAGATGGCAAGGCTTTTTCTCTTGGTGGCTTGTGCAGATGTTCGGGTCCACCATC	ADNcaroapet.SEQ									
11164	GCCGGAGAAAGCTGAACGTGACGGCCATCGACAGCTACGACGACCA CAGGATGGCCATGCGCTTTCCTTGGCGAGTCCCGGTCCACCATC	epspszm.SEQ									
1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560					
1492	AAGGACTCTGTGTGACCAAGGAAAACCTTCCCGACTACTTCCAA GTACTTGAAGATACAAAGGACTAA	ADNcepspsat.SEQ									
1480	AAGGATCTGTGTGACCAAGGAAAGACTTCCCTGACTACTTCCAA GTCTTGAAGTATACAAAGCATTA	ADNcepsbn.SEQ									
1480	AATGACCTGTGTGACCGGAAAACCTTCCCTTAAGTACTTGTGAT GACTTCCAGCTACTTCCAAAGGATTGA	ADNcaroapet.SEQ									
1264	CSSGACCTTGGSTGACACCGGAAGACCTTCCCGGACTACTTCG ATGTGCTGAGCACTTTCGTCAAGAATTAA	epspszm.SEQ									

FIG. 3C

10	11	20	30	40	50	60	70	80	90	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	MAQSRICHGVQNP	SLISNL	SKSQKSP	LSVLKTHQ	PRAYP	ISSWGLK	SGMTL	IGSEL		PLKWMSSV	STAEKASE	IVLQPI	REISGL	IKL	PGSKLSL	SN	epspsat.SEQ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
1	MAQSRICHGVQNP	CVTTISNL	SKSQKSP	SFVSLKTHQ		PRASSWGLK	SGMTL	NGSVJR		PWKVTASV	STSEKASE	IVLQPI	REISGL	IKL	PGSKLSL	SN	epspsbn.SEQ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
1	MAQINNMAGIQTL	NPNMNFH	PKVPQ	KSSFL	VFGSKK		LKNSA		NSMLVL	KDSTF	MQFCFS	RISASV	ATAQK	PSEIVL	QPIKE	ISGTVKL	PGSKLSL	SN	aroapet.SEQ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1	AG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

FIG. 4

<u>Nombre del oligo</u>	<u>Secuencia del oligo (5'y3')</u>
ATEPS-A ₁₇₇	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTGTTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-AI	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTATTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-IS	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTATTCCTGCATTACCGAG
ATEPS-AS	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTGTTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-AIS	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTATTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-I ₁₇₇	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTGTTATTGCATTACCGAG
ATEPS-VS	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTACTCCTGCATTACCGAG
ATEPS-LS	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGAACGCATTGCTAATCCTGCATTACCGAG
ATEPS-AV	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTACTGCTGCATTACCGAG
ATEPS-AL	CGTTTCCACCTGCAGCAGTGACCGCAGCGGTAAGTGGACGCATTGCTAATGCTGCATTACCGAG

FIG.5

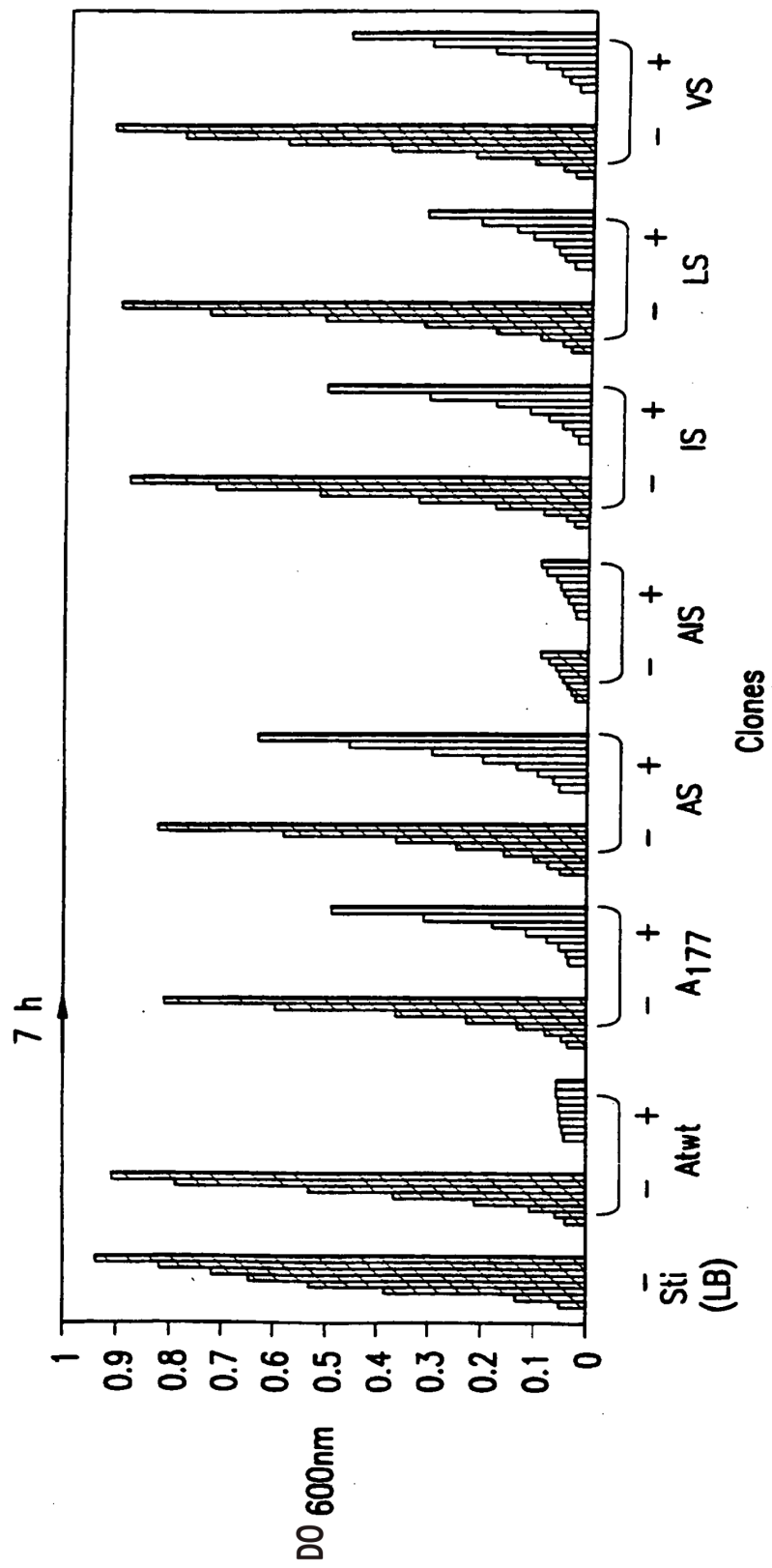


FIG.6

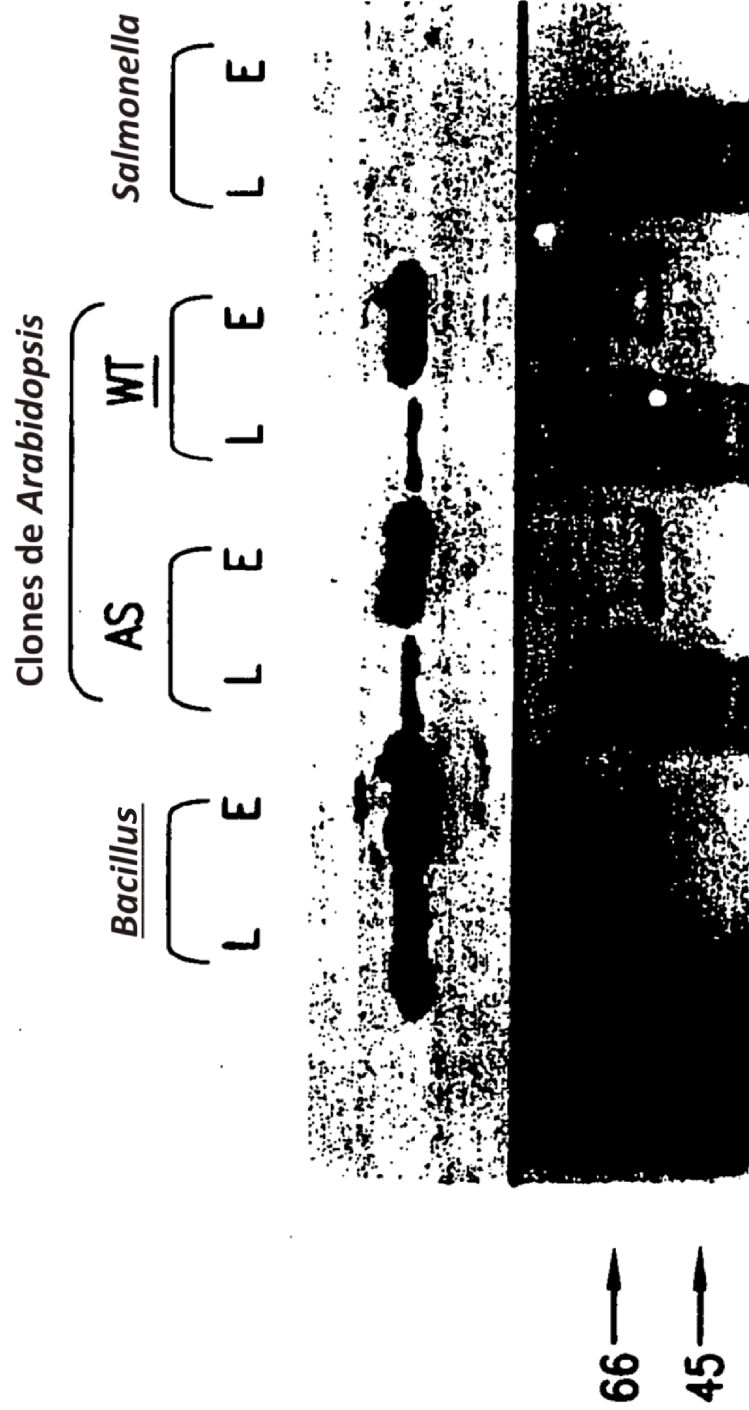


FIG.7