

Fig. 1

SEQ ID NO: 1

MAAASTSAAT TIPKPSSHIS SSSRSSIFIS RFTLPLSLNP QKAIPHRSLH 50
ISNSVSKPTT PAPSSSTTLT IPQASPPRFS PDEARKGADI LVEALERQGV 100
TDVFAYPGGA SMEIHQALTR SPIIRNVLP R HEQGGVFAAE GYARASGKPG 150
VCIATSGPGA TNLVSGLADA LLDSVPIVAI TGQVPRRMIG TDAFQETPIV 200
EVTRSITKHN YLVLDVDDIP RIVSEAFFLA TSGRPGPVLI DVPKDIQQQL 250
AVPNWNTPIK LPGYMSRLPK VPNESHLEQI VRLIFESKKP VLYVGGGCLN 300
SSEELRKFEV LTGIPVASTL MGLGAFPVGH ELSLQMLGMH GTVYANYSD 350
KSDLLLAFGV RFDDRVTGKL EAFASRAKIV HIDIDSAEIG KNKQPHVSVC 400
ADVKFALQGM NKILESRC AK SKLDFKAWRE ELNEQKSKYP LKYKTFGDAI 450
PPQYAIQVLD ELTDGNAIIS TGVGQHQMWA AQFYKYKRPR QWLTSGGLGA 500
MGFGLPAAIG AAVANPGAVV VDIDGDGSFI MNVQELATIR VENLPIKIML 550
LNNQHLGMVV QWEDRFYKAN RAHTYLGDPS KESEIFPNML KFAEACGIPA 600
ARVTRKEGLR MAIQKMLDTP GPYLLDVIVP HQEHVLP MIP SGGAFKDVIT 650
EGDGR TKY

Fig. 2

SEQ ID NO: 2

ATGGCGGCGGCGTCTACCTCTGCGGCTACCACTATCCCTAAACCCTCTTCTCACATTTCT
TCCTCCTCCAGATCTTCAATCTTCATTTCCAGATTACCCCTCCCATTGTCTCTCAACCCC
CAAAAGGCCATTCTCACCCTCTCTCCACATATCAAACCTCTGTCTCTAAACCTACAACC
CCTGCCCCCTCATCCTCCACCACCTTAACCATTCTCAAGCGTCTCCTCCCAGGTTTTCT
CCTGATGAAGCTCGAAAAGGCGCCGACATCCTCGTTGAAGCGCTGGAACGCCAAGGGGTC
ACTGATGTATTTGCTTATCCAGGCGGCGCATCCATGGAGATCCATCAAGCCCTGACTCGC
TCACCTATAATTGCAATGTCCTCCCGCGCCATGAGCAAGGTGGGGTCTTTGCGGCTGAG
GGATATGCTCGCGCTTCTGGCAAGCCTGGCGTCTGTATCGCAACCTCGGGACCCGGCGCT
ACAAATCTCGTAAGTGGCTTGGCAGACGCTCTCCTTGACAGCGTCCCCATTGTGGCTATC
ACCGGCCAAGTTCCTCGCCGCATGATTGGCACCGACGCATTCCAAGAACTCCCATTGTT
GAGGTAACCTCGGTCAATAACTAAGCACAATTACCTGGTCCTTGATGTTGATGATATTCCT
AGAATTGTAAGTGAAGCTTTCTTTTTTGGCCACCTCGGGACGTCCTGGCCAGTTCTGATT
GATGTACCAAAGATATACAACAACAATTAGCTGTTCCAAATTGGAATACACCTATTAAA
TTGCCTGGTTACATGTGAGGTTGCCTAAAGTGCCCAACGAATCACATTTGGAGCAGATT
GTGAGGCTAATTTTTGAGTCAAAGAAACCGGTTTTTATACGTGGGAGGTGGGTGTTTAAAT
TCAAGTGAGGAGTTGAGAAAGTTTGTCGAGTTAACTGGGATCCCAGTGGCTAGTACTTTG
ATGGGGCTCGGAGCATTCCCAGTTGGCCACGAATTGTCATTACAAATGCTTGGAATGCAT
GGAACGTGTTTATGCTAACTACTCGGTGGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTG
AGGTTTGATGACAGGGTGACAGGCAAGCTTGAGGCCTTTGCAAGCAGAGCTAAGATTGTT
CACATTGATATTGATTCCGCTGAGATTGGGAAAAATAAGCAGCCCCATGTGTCTGTTTGT
GCAGATGTGAAGTTTGCCTTGCAAGGGATGAACAAGATTTTGAGAGAGCAGATGTGCTAAG
AGTAAGCTAGATTTTAAGGCTTGAGAGGAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAGTAAATATCCA
TTGAAATACAAGACATTTGGAGATGCAATTCCTCCTCAGTACGCCATACAAGTTCTCGAT
GAATTAACAGATGGGAATGCCATTATAAGTACTGGCGTTGGACAACATCAGATGTGGGCT
GCTCAATTTTACAAGTACAAGAGACCACGGCAATGGTTGACGTCAGGGGGATTAGGGGCT
ATGGGTTTTGGATTGCCTGCCGCCATTGGGGCTGCTGTTGCTAATCCTGGTGCAGTTGTT
GTAGATATTGATGGTGATGGAAGTTTTATCATGAATGTCCAGGAGTTGGCAACAATTCGT
GTGGAGAATCTGCCAATTAAAATAATGCTTTTGAATAATCAGCATTTGGGAATGGTGGTA
CAATGGGAGGACCGATTCTACAAGGCTAATAGAGCTCATACTTATTTGGGGGATCCATCA

Fig. 2 continuación

AAGGAGTCTGAGATTTTCCCCAATATGTTGAAGTTTGCAGAAGCTTGTGGAATACCTGCT
GCTCGCGTGACAAGAAAAGAGGGTCTTAGAATGGCGATTCAGAAAATGCTAGATACTCCA
GGGCCATACTTGTTGGATGTGATTGTGCCCCATCAAGAACATGTGCTGCCCATGATCCCA
AGTGGGGGAGCTTTTAAGGATGTGATAACTGAGGGTGATGGAAGAACGAAGTATTGA

Fig. 3

SEQ ID NO: 5

MAAASTSAAT TIPKPSSHIS SSSRSSIFIS RFTLPLSLNP QKAIPHRSLH
ISNSVSKPTT PAPSSSTTLT IPQASPPRFS PDEARKGADI LVEALERQGV
TDVFAYPGGA SMEIHQALTR SPIIRNVLP R HEQGGVFAAE GYARASGKPG
VCIATSGPGA TNLVSGLADA LLDSVPIVAI TGQVPRRMIG TDAFQETPIV
EVTRSITKHN YLVLDVDDIP RIVSEAFFLA TSGRPGPVLI DVPKDIQQQL
AVPNWNTPIK LPGYMSRLPK VPNESHLEQI VRLIFESKKP VLYVGGGCLN
SSEELRKFEV LTGIPVASTL MGLGAFPVGH ELSLQMLGMH GTVYANYSVD
KSDLLLAFGV RFDARVTGKL EAFASRAKIV HIDIDSAEIG KNKQPHVSVC
ADVKFALQGM NKILESRC AK SKLDFKAWRE ELNEQKSKYP LKYKTFGDAI
PPQYAIQVLD ELTDGNAIIS TGVGQHQMWA AQFYKYKRPR QWLTSGGLGA
MGFGLPAAIG AAVANPGAVV VDIDGDGSFI MNVQELATIR VENLPIKIML
LNNQHLGMVV QSEDRFYKAN RAHTYLGDPS KESEIFPNML KFAEACGIPA
ARVTRKEGLR MAIQKMLDTP GPYLLDVIVP HQEHVLP MIP SGGAFKDVIT
EGDGRTKY

Fig. 4

SEQ ID NO: 4

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
Val Met Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys
Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg
Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu
Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe
Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu
Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala

Fig. 4 Continuación

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys
Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys
Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala
Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr
Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr

Fig. 5

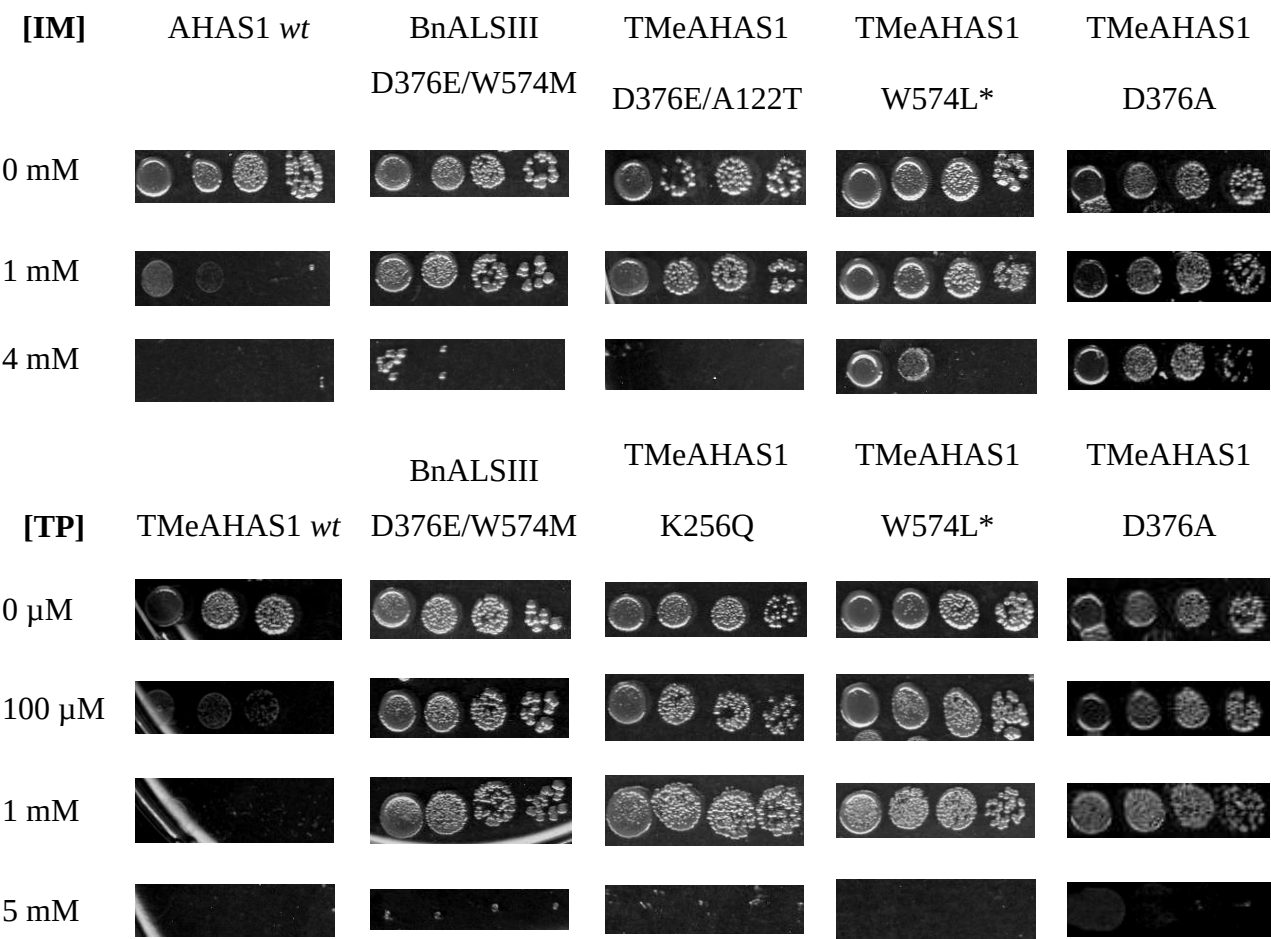


Fig. 6A

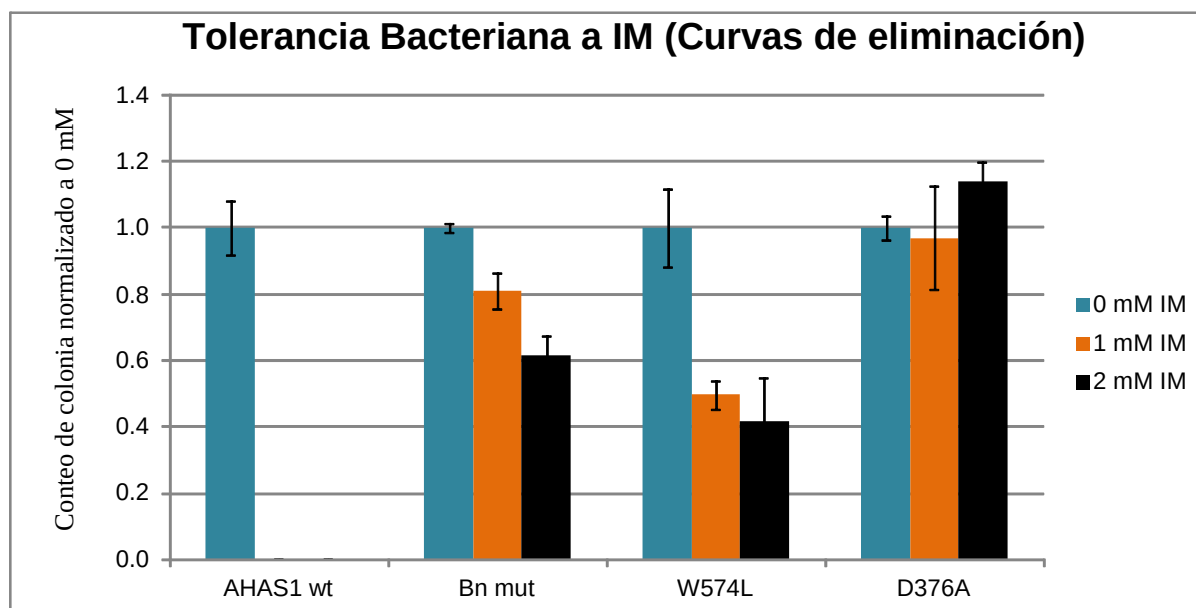


Fig. 6B

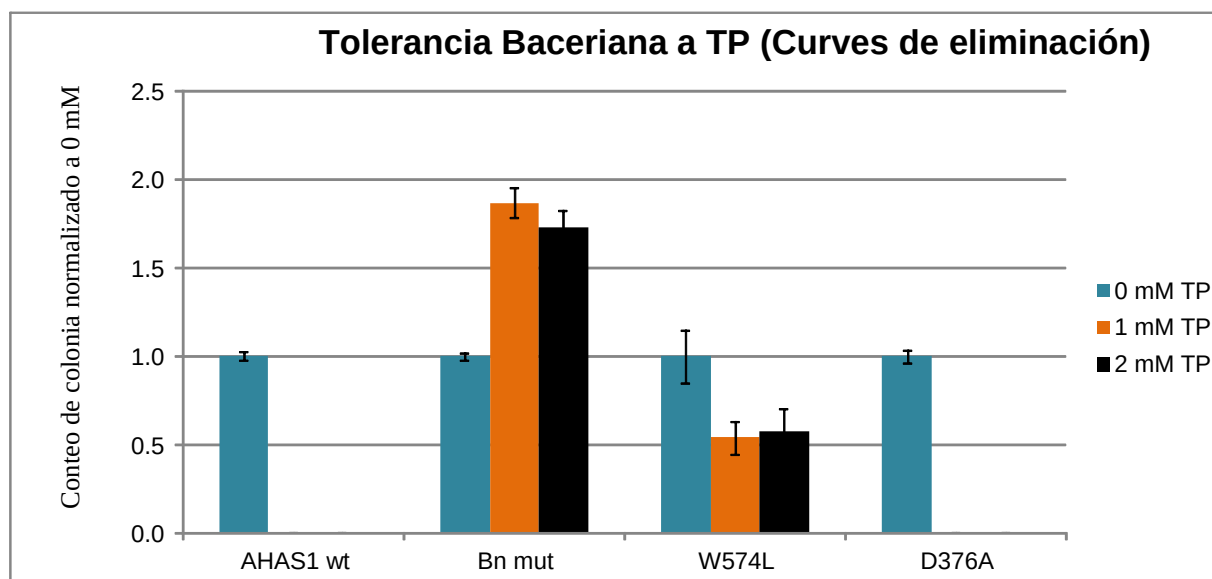


FIG. 7A

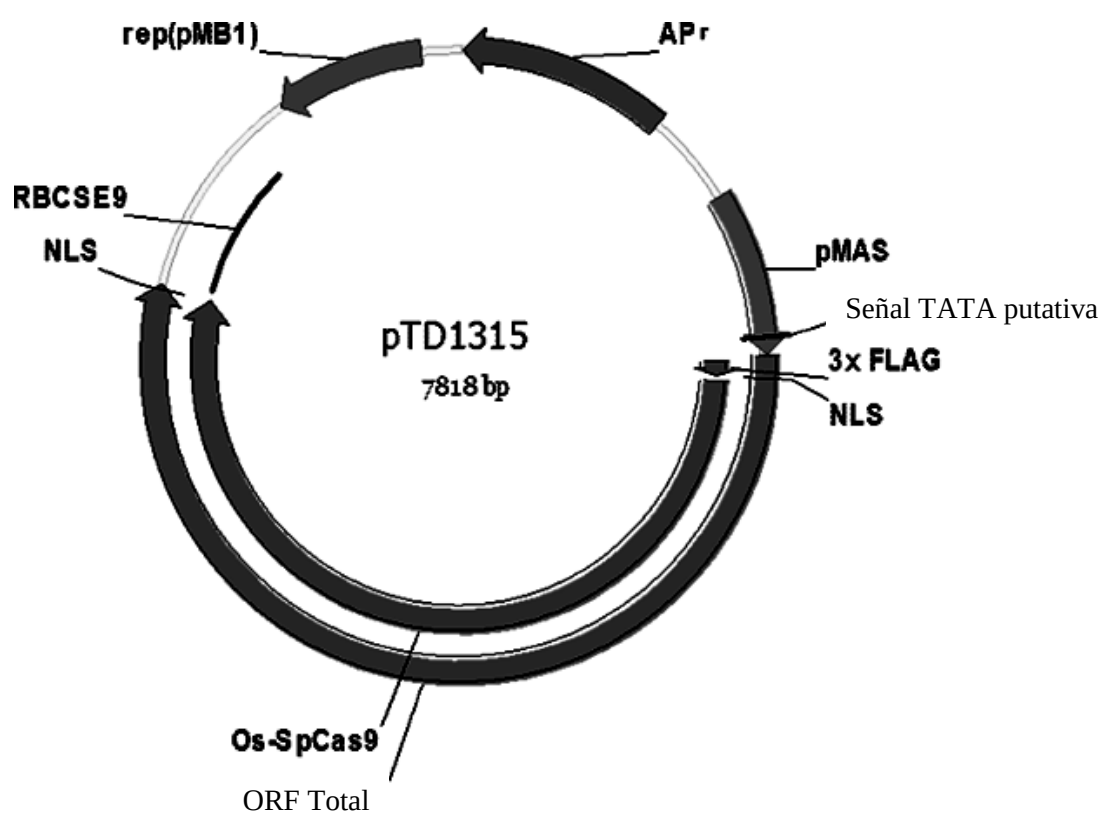
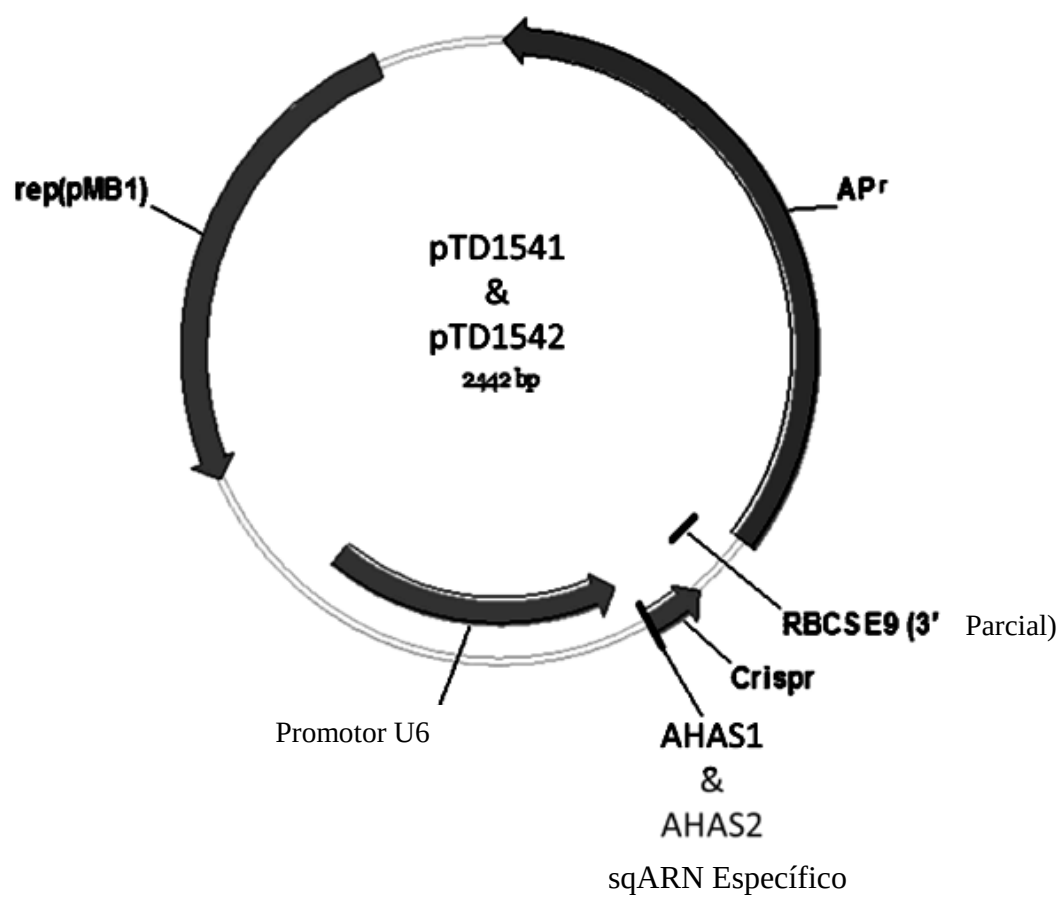


Fig. 7B



Doctora

María José Lamus Becerra

Directora de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO -SIC-

E.

S.

D.

TOBOS ABOGADOS S.A.S.

Calle 151 No. 18A-34

Oficina 409 Bogotá D.C.

C.P. 110131166 - Colombia

NIT 900.367.556-3

Tel +57 1 526 0350

Tel +57 1 805 1166

Cel +57 320 334 0887

<http://www.tobos.com.co>

tobos@tobos.com.co

Referencia: Solicitud divisional No. NC2019/0004514

Solicitantes: Cibus US LLC y Cibus Europe B.V.

Título de la invención: Métodos para la mutación de los genes de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en *Euphorbiaceae*

RESPUESTA AL OFICIO No. 5535

ANDREA TOBOS MATEUS, mayor de edad y domiciliada en Bogotá D.C., identificada según aparece debajo de mi firma, como apoderada de las sociedades Cibus US LLC y Cibus Europe B.V., doy respuesta al examen notificado por medio de correo electrónico del día 02 de julio de 2019, dentro del término legal.

1. Descripción

1.1. El Examinador señala que:

“La solicitud presentada el 30 de abril de 2019 mediante radicado NC2019/0004514 no cumple con el requisito de ajustar la descripción a la materia reclamada en la solicitud divisional, estipulado en la Circular Única, toda vez que la descripción corresponde en su totalidad al capítulo descriptivo de la solicitud parental, presentado el 7 de agosto de 2017 mediante radicado NC2017/0007985.

Teniendo en cuenta que la divisional reclama un ácido nucleico que codifica una proteína AHAS que comprende una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 376 respecto de la SEQ ID NO: 4, se requiere ajustar la descripción conservando los ejemplos y referencias que den sustento a dicha materia, eliminando lo relacionado con la proteína AHAS que comprende una mutación de triptófano a serina en la posición 574 de la SEQ ID NO: 4.”

1.2. En respuesta a esta observación, las solicitantes presentan un capítulo descriptivo modificado en el cual se describe la materia que busca protección en la presente solicitud divisional. Asimismo, las solicitantes han retirado las figuras que ya no son aplicables a la presente solicitud.

Agradezco su amable colaboración.

Atentamente,



ANDREA TOBOS MATEUS

C.C. 52.223.325 de Bogotá

T.P. 148648

15100110CO_MemorialReqDivisional_040819

MÉTODOS PARA LA MUTACIÓN DE LOS GENES DE ACETOHIDROXIÁCIDO

SINTASA (AHAS) EN EUPHORBIACEAE

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud
5 provisional estadounidense n.º 62/102,009, presentada el 10
de enero de 2015, y la solicitud provisional estadounidense
n.º 62/102,010, presentada el 10 de enero de 2015, cada una
de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad y de
las cuales se reivindica prioridad.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las plantas y
semillas resistentes a herbicidas y, más específicamente, a
15 mutaciones en la proteína y el gen de acetohidroxiácido
sintasa (AHAS).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La siguiente descripción se proporciona simplemente como
ayuda para comprender la invención y no pretende describir ni
constituir técnica previa de la invención.

La mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*), flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*) y la maleza invasiva ésula (*Euphorbia esula*) se
 5 encuentran dentro de los miembros importantes en términos económicos de la familia Euphorbiaceae. A continuación, figura una lista más completa de los géneros dentro de la familia:

- Género Acalypha L. - hoja cobriza
- 10 Género Adelia L. - espinillo
- Género Alchornea Sw. - achiotillo
- Género Alchorneopsis Müll. Arg. - Macaglia megalocarpa
- Género Aleurites J.R. Forst. & G. Forst. - nuez de la India
- Género Antidesma L. - bignai
- 15 Género Argythamnia P. Br. - arbusto campanilla
- Género Baccaurea Lour. - uva birmana
- Género Bernardia Mill. - oreja de ratón
- Género Bischofia Blume - biscofia
- Género Breynia J.R. Forst. & G. Forst. - árbol de nieve
- 20 Género Caperonia A. St.-Hil. - capirona
- Género Chamaesyce Gray - golondrina
- Género Chrozophora A. Juss. - tornasol
- Género Claoxylon A. Juss. - claoxylon

- Género *Cnidoscolus* Pohl - cnidoscolus
- Género *Codiaeum* Juss. - crotón de jardín
- Género *Croton* L. - crotón
- Género *Dalechampia* L. - granadilla
- 5 Género *Ditrysinia* Raf. - *Sebastiania fructicosa*
- Género *Dittia* Griseb. - jaboncillo
- Género *Drypetes* Vahl - drypetes
- Género *Euphorbia* L. - cardón
- Género *Excoecaria* L.
- 10 Género *Flueggea* Willd. - tamujo
- Género *Garcia* Rohr
- Género *Glochidion* J.R. Forst. & G. Forst. - glochidion
- Género *Gymnanthes* Sw. - yaití
- Género *Hevea* Aubl. - árbol del caucho
- 15 Género *Hippomane* L. - árbol de la muerte
- Género *Hura* L. - jabillo
- Género *Hyeronima* Allemao - pilón
- Género *Jatropha* L. - jatrofa
- Género *Leptopus* Decne. - coralillo
- 20 Género *Macaranga* Thouars - macaranga
- Género *Mallotus* Lour. - mallotus
- Género *Manihot* Mill. - mandioca
- Género *Margaritaria* L. f. - margaritaria

- Género *Melanolepis* Rchb. f. & Zoll.
- Género *Mercurialis* L. - mercurial
- Género *Micrandra* Benth. - carapacho
- Género *Microstachys* Juss. - sebastiania
- 5 Género *Pedilanthus* Neck. ex Poit. - pedilanto
- Género *Pera* Mutis - sapito
- Género *Phyllanthus* L. - filanto
- Género *Reutealis* Airy Shaw - nogal de la India
- Género *Reverchonia* A. Gray - reverchonia arenaria
- 10 Género *Ricinodendron* Müll. Arg. - ricinodendron
- Género *Ricinus* L. - ricino
- Género *Sapium* Jacq. - palo leche
- Género *Sauropus* Blume - sauropus
- Género *Savia* Willd. - savia
- 15 Género *Sebastiania* Spreng. - *Sebastiania fructicosa*
- Género *Stillingia* Garden ex L. - stillingia
- Género *Tetracarpidium* Pax - maní del Inca
- Género *Tetracoccus* Engelm. ex Parry - tetracoccus
- Género *Tragia* L. - tragia ramosa
- 20 Género *Triadica* Loureiro - árbol de sebo
- Género *Vaupesia* R.E. Schult. - vaupesia
- Género *Vernicia* Lour. - vernicia montana

Los beneficios de las plantas tolerantes a herbicidas son conocidos. Por ejemplo, las plantas tolerantes a herbicidas pueden reducir la necesidad de labranza para controlar las malezas, lo que reduce de manera eficaz la erosión del suelo.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

La descripción se refiere, en parte, a ácidos nucleicos de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae mutados y
10 las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos mutados. La descripción también se refiere, en parte, a plantas, células y semillas de mandioca que comprenden estos ácidos nucleicos mutados y proteínas.

15 En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 376 (que se denomina
20 en la presente mutación D376A). La numeración de los residuos y, por lo tanto, la posición de la mutación en ácido aspártico 376, se presenta con respecto a la numeración del residuo *Arabidopsis*. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus*

communis), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, la proteína de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae que comprende la mutación D376A es resistente a la inhibición mediante un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea.

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que contiene un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas

modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el ácido nucleico

5 aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, el ácido nucleico

10 aislado codifica una proteína que es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina,

15 pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea.

20 En otro aspecto, se proporciona una planta con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En otro aspecto, se proporciona una

planta con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde la planta es resistente a un herbicida que inhibe AHAS, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las

5 cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas

10 modalidades, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas

15 modalidades, la planta es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-

20 carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea. En algunas modalidades, la planta es una mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus*

communis), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, la planta no es transgénica.

5

En un aspecto, se proporciona una semilla con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En otro aspecto, se proporciona una semilla con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde la semilla es de una planta de Euphorbiaceae que es resistente a un herbicida que inhibe AHAS, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el gen codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de

mandioca. En algunas modalidades, la semilla es de una planta de Euphorbiaceae que es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que
5 consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriasolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de
10 sulfonilurea. En algunas modalidades, la semilla es de una mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, la semilla es de una
15 planta de Euphorbiaceae que no es transgénica.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una planta de Euphorbiaceae resistente a herbicidas mediante la introducción en una célula vegetal de Euphorbiaceae de una
20 oligonucleobase de reparación génica (GRON) con una mutación dirigida en un gen de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) para producir una célula vegetal con un gen de AHAS que expresa una proteína de AHAS con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación

D376A; e identificar una célula vegetal de Euphorbiaceae modificada de este modo pero que tiene un crecimiento y actividad catalítica sustancialmente normales en comparación con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente en presencia de un herbicida que inhibe AHAS; y regenerar una planta de Euphorbiaceae resistente a herbicida no transgénica que tiene un gen de AHAS mutado de dicha célula vegetal. En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la resistencia a herbicidas de una planta mediante: (a) cruce de una primera planta de Euphorbiaceae con una segunda planta de Euphorbiaceae, donde la primera planta comprende un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A; (b) análisis de una población resultante del cruce para determinar un aumento de la resistencia a herbicidas de AHAS; (c) selección de un miembro resultante del cruce con una mayor resistencia a herbicidas de AHAS; y (d) producción de semillas resultantes del cruce. En algunas modalidades, se produce una semilla híbrida a través de cualquiera de los métodos anteriores. En algunas modalidades, se cultivan las plantas a partir de semillas producidas a través de cualquiera de los métodos anteriores. En otro aspecto, se proporciona un método para controlar las malezas

en un campo que contiene plantas mediante la aplicación de una cantidad eficaz de al menos un herbicida que inhibe AHAS a un campo que contiene dichas malezas y plantas, donde la planta tiene un gen de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína que tiene una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En otras modalidades, el herbicida que inhibe AHAS es un herbicida de imidazolinona. En otras modalidades, el herbicida que inhibe AHAS es un herbicida de sulfonilurea.

15

En los aspectos descritos en la presente, la mutación D376A puede combinarse con una o más mutaciones adicionales en la secuencia proteica. A modo de ejemplo, dichas mutaciones pueden incluir una o más de una sustitución de serina a treonina en una posición que corresponde a la posición 653, una sustitución de serina a asparagina en una posición que corresponde a la posición 653, una sustitución de alanina a valina en una posición que corresponde a la posición 205, una sustitución de alanina a ácido aspártico en una posición que

20

corresponde a la posición 205, una sustitución de arginina a triptófano en una posición que corresponde a la posición 577, en cada caso, la numeración de la posición se describe con respecto a la numeración del residuo *Arabidopsis*.

5

La expresión «ácido nucleico» o «secuencia de ácido nucleico» se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y a fragmentos o partes de estos, que pueden ser de cadena simple o doble, y que representan la cadena sentido o
10 antisentido. Un ácido nucleico puede incluir ADN o ARN y puede ser de origen natural o sintético. Por ejemplo, un ácido nucleico puede incluir ARNm o ADNc. Un ácido nucleico puede incluir un ácido nucleico que se ha amplificado (por ejemplo, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa).

15 La convención «NTwt###NTmut» se utiliza para indicar una mutación que produce el nucleótido de tipo silvestre NTwt en la posición ### en el ácido nucleico que se está reemplazando con NTmut mutante. El código de una letra para los nucleótidos es según se describe en la tabla 1, sección 2422
20 del Manual de Procedimiento del examen en materia de Patentes de la Oficina de Patentes de Estados Unidos. En este sentido, la designación de nucleótidos «R» significa purina como guanina o adenina, «Y» significa pirimidina como citosina o timina (uracilo en el caso de ARN); «M» significa adenina o

citosina; «K» significa guanina o timina; y «W» significa adenina o timina.

Un «gen» se refiere a una secuencia de ADN que comprende
5 secuencias codificantes y de control necesarias para la
producción de un ARN, que puede tener una función no
codificante (por ejemplo, un ARN ribosómico o de
transferencia) o que puede incluir un polipéptido o un
precursor de polipéptidos. El ARN o el polipéptido se pueden
10 codificar mediante una secuencia codificante de longitud
completa o mediante cualquier parte de la secuencia
codificante, siempre que se mantenga la actividad o la
función deseada. Como se usa en la presente, la expresión
«gen de AHAS» se refiere a un gen que tiene 70 %; 75 %; 80 %;
15 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o 100 % de identidad
con un gen de AHAS de Euphorbiaceae, por ejemplo, la
secuencia génica de la mandioca (*Manihot esculenta*) de la SEQ
ID NO: 2. En determinadas modalidades, el gen de AHAS tiene
60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %
20 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. En cada caso,
el gen puede comprender una mutación en la secuencia de
nucleótidos que genera una sustitución en una o más
posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a
una mutación W574S.

«Secuencia codificante» se refiere a una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte de este, que se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm para y/o el polipéptido o un fragmento de este. Las secuencias codificantes incluyen exones en transcripciones de ARN primarias inmaduras o un ADN genómico, que se unen por la maquinaria bioquímica de las células para proporcionar un ARNm maduro. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico y la secuencia codificante se puede deducir de allí.

«Secuencia no codificante» se refiere a una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte de este, que no se transcribe en el aminoácido *in vivo*, o donde el ARNt no interactúa para colocar o intentar colocar un aminoácido. Las secuencias no codificantes incluyen secuencias de intrones en ADN genómico o transcripciones de ARN primario inmaduro y secuencias asociadas con genes como promotores, potenciadores, silenciadores, etc.

Una nucleobase es una base, que en determinadas modalidades preferidas es una purina, pirimidina o un derivado o análogo de estas. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un

resto de pentosafuranosilo, por ejemplo, una ribosida o una 2'-desoxirribosa opcionalmente sustituidas. Los nucleósidos pueden estar unidos por uno de diversos restos de enlace, que pueden contener fósforo o no. Los nucleósidos que están
5 unidos por enlaces fosfodiéster insustituídos se denominan nucleótidos. El término «nucleobase», según se utiliza en la presente, incluye nucleobases de péptidos, las subunidades de ácidos nucleicos de péptidos y nucleobases de morfolina, así como nucleósidos y nucleótidos.

10

Una oligonucleobase es un polímero que comprende nucleobases; preferentemente, al menos una parte de las cuales se puede hibridar mediante emparejamiento de bases Watson-Crick con un ADN que tiene la secuencia complementaria. Una cadena de
15 oligonucleobases puede tener un extremo 5' y 3' único, que son las nucleobases finales del polímero. Una cadena de oligonucleobases particular puede contener nucleobases de todos los tipos. Un compuesto de oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobases
20 que pueden ser complementarias y se pueden hibridar mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las nucleobases tipo ribo incluyen nucleobases que contienen pentosafuranosilo en donde el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidroxilo, alquilo o halógeno. Las nucleobases tipo

desoxirribo son nucleobases diferentes de las nucleobases tipo ribo e incluyen todas las nucleobases que no contienen un resto de pentosafuranosilo.

- 5 En determinadas modalidades, una cadena de oligonucleobases puede incluir ambas cadenas de oligonucleobases y segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobases. Una cadena de oligonucleobases puede tener un extremo 3' y un extremo 5' y cuando una cadena de oligonucleobases es coextensiva con una
- 10 cadena, los extremos 3' y 5' de la cadena también son los extremos terminales 3' y 5' de la cadena.

La expresión «oligonucleobase de reparación génica», como se utiliza en la presente, denota oligonucleobases que incluyen oligonucleótidos dúplex mixtos, moléculas que no contienen

15 nucleótidos, oligodesoxinucleótidos de cadena simple y otras moléculas de reparación génica.

«Aislado», cuando se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido tal como ARN, ADN o un polímero

20 mixto), se refiere a un ácido nucleico que está separado de una parte sustancial del genoma en el cual aparece naturalmente y/o está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a dicho ácido nucleico. Por ejemplo, cualquier ácido nucleico que se

ha producido de forma sintética (por ejemplo, por condensación de base en serie) se considera aislado. Asimismo, los ácidos nucleicos que se expresan de forma recombinante, que se clonan, se producen por una reacción de
5 extensión del cebador (por ejemplo, PCR) o que se retiran de otro modo de un genoma también se consideran aislados.

Una «secuencia de aminoácidos» se refiere a un polipéptido o una secuencia proteica. La convención «AAwt###AAmut» se
10 utiliza para indicar una mutación que produce el AAwt de aminoácido de tipo silvestre en la posición ### en el polipéptido que se está reemplazando con AAmut mutante.

«Complemento» se refiere a la secuencia complementaria de un
15 ácido nucleico de acuerdo con las normas de emparejamiento de Watson/Crick estándar. Una secuencia complementaria también puede ser una secuencia de ARN complementaria de la secuencia de ADN o su secuencia complementaria y también puede ser un ADNc.

20

«Sustancialmente complementario» se refiere a que dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. El entendido en la técnica comprenderá que no es necesario que las secuencias sustancialmente complementarias

se hibriden a lo largo de la longitud completa.

Tal como se usa en la presente, el término «codón» se refiere a una secuencia de tres nucleótidos adyacentes (ARN o ADN) que constituyen el código genético que determina la inserción de un aminoácido específico en una cadena de polipéptidos durante la síntesis de proteínas o la señal para detener la síntesis de proteínas. El término «codón» también se utiliza para hacer referencia a las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARN mensajero en las que se transcribe el ADN original.

Como se usa en la presente, la expresión «proteína de AHAS» se refiere una proteína que tiene 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o 100 % de identidad con una proteína de AHAS de Euphorbiaceae, por ejemplo, la secuencia proteica de la mandioca (*Manihot esculenta*) de la SEQ ID NO: 1. En determinadas modalidades, la proteína de AHAS tiene 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En cada caso, el gen puede comprender una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A.

La expresión «tipo silvestre» se refiere a un gen o un producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es aquel que se observa con
5 mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma «normal» o «de tipo silvestre» del gen. «Tipo silvestre» también se puede referir a la secuencia en una posición o posiciones de nucleótidos específicas, o la secuencia en una posición o posiciones de
10 codones particulares, o la secuencia en una posición o posiciones de aminoácidos particulares.

Según se utiliza en la presente, «mutante» o «modificado» se refiere a un ácido nucleico o proteína que presenta
15 modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características modificadas) cuando se lo compara con el gen o producto génico de tipo silvestre. «Mutante» o «modificado» también se refiere a la secuencia en una posición o posiciones de nucleótidos específicas, o la
20 secuencia en una posición o posiciones de codones particulares, o la secuencia en una posición o posiciones de aminoácidos particulares que muestra modificaciones en la secuencia y/o en las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o

producto génico de tipo silvestre.

Una «mutación» pretende comprender al menos una única
variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico o
5 una única variación de aminoácidos en un polipéptido con
respecto a una secuencia normal o secuencia de tipo
silvestre. Una mutación puede incluir una sustitución, una
eliminación, una inversión o una inserción.

10 Tal como se usa en la presente, el término «homología» se
refiere a la similitud de secuencia entre las proteínas y el
ADN. El término «homología» u «homólogo» se refiere a un
grado de identidad. Puede haber homología parcial u homología
completa. Una secuencia parcialmente homóloga es la que tiene
15 menos de 100 % de identidad de secuencia en comparación con
otra secuencia.

«Heterocigoto» se refiere a tener distintos alelos en uno o
más loci genéticos en los segmentos de cromosoma homólogos.
20 Tal como se usa en la presente, «heterocigoto» también se
puede referir a una muestra, una célula, una población de
células o un organismo en el que se pueden detectar alelos
diferentes en uno o más locus genéticos. También se pueden
determinar muestras heterocigotas mediante los métodos

conocidos en la técnica como, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si un electroferograma de secuenciación muestra dos picos en un único locus y ambos picos tienen aproximadamente el mismo tamaño, la muestra se puede caracterizar como heterocigota. O, si un pico es más pequeño que otro, pero tiene al menos alrededor de 25 % del tamaño del pico más grande, la muestra se puede caracterizar como heterocigota. En algunas modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 15 % del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 10% del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 5 % del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, se detecta una cantidad mínima del pico más pequeño.

Como se usa en la presente, «homocigoto» se refiere a tener alelos idénticos en uno o más loci genéticos en segmentos de cromosoma homólogos. «Homocigoto» también puede referirse a una muestra, una célula, una población celular o un organismo en el cual se pueden detectar los mismos alelos en uno o más loci genéticos. Se pueden determinar muestras homocigotas mediante los métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, secuenciación de ácido nucleico. Por ejemplo, si un

electroferograma de secuenciación muestra un único pico en un locus particular, la muestra se puede denominar «homocigota» con respecto a ese locus.

- 5 El término «hemicigoto» se refiere a un gen o a un segmento de gen que aparece solo una vez en el genotipo de una célula o un organismo porque el segundo alelo se elimina. Según se utiliza en la presente, «hemicigoto» también se puede referir a una muestra, una célula, una población de células o un
10 organismo en el cual se puede detectar un alelo en uno o más loci genéticos solo una vez en el genotipo.

La expresión «estado de cigosidad», tal como se usa en la presente, se refiere a una muestra, una población celular o
15 un organismo que aparece como heterocigoto, homocigoto o hemicigoto, según se determina a través de los métodos de prueba conocidos en la técnica y descritos en la presente. La expresión «estado de cigosidad de un ácido nucleico» significa determinar si la fuente de ácido nucleico aparece
20 como heterocigota, homocigota o hemicigota. El «estado de cigosidad» se puede referir a diferencias en un único nucleótido en una secuencia. En algunos métodos, el estado de cigosidad de una muestra con respecto a una mutación única se puede categorizar como homocigoto de tipo silvestre,

heterocigoto (es decir, un alelo de tipo silvestre y un alelo mutante), mutante homocigoto o hemicigoto (es decir, una copia única del alelo mutante o de tipo silvestre).

5 Tal como se usa en la presente, el término «**RTDS**» se refiere al Rapid Trait Development System™ (RTDS™), desarrollado por Cibus. **RTDS** es un sistema de modificación génica específica del sitio que es eficaz para realizar cambios precisos en una
10 secuencia génica sin la incorporación de genes externos o secuencias de control.

La expresión «alrededor de», tal como se usa en la presente, significa en términos cuantitativos más o menos 10 %. Por ejemplo, «alrededor de 3 %» abarcaría 2,7-3,3 % y «alrededor
15 de 10 %» abarcaría 9-11 %. Además, cuando «alrededor de» se utiliza en la presente en combinación con un término cuantitativo, se entiende que además del valor más o menos 10 %, también se contempla y se describe el valor exacto del término cuantitativo. Por ejemplo, la expresión «alrededor de
20 3 %» contempla, describe e incluye, de forma expresa, exactamente el 3 %.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína de AHAS de mandioca (*Manihot esculenta*) de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La posición de D376 se muestra en cursiva y subrayado. Como se menciona en la presente, la
5 convención de numeración de residuos se basa en la de *Arabidopsis*.

La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de AHAS de mandioca (*Manihot esculenta*) de tipo
10 silvestre (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos de AHAS de mandioca (*Manihot esculenta*) que comprende una mutación D376A (SEQ ID NO: 5).
15

La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos de AHAS I de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 4). La posición de D376 se muestra en cursiva y subrayado.
20

La Figura 5 muestra el crecimiento en placas de cultivo de células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS de tipo silvestre y mutantes en presencia y ausencia del herbicida IM o TP, que incluyen el gen mutante D376A.

La Figura 6A muestra curvas de eliminación de herbicida IM para células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS de tipo silvestre y mutantes, incluyendo el gen D376A
5 mutante.

La Figura 6B muestra curvas de eliminación de herbicida TP para células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS de tipo silvestre y mutantes, incluyendo el gen D376A
10 mutante.

La Figura 7A muestra la estructura del plásmido pTD1315.

La Figura 7B muestra la estructura de los plásmidos pTD1541 y
15 pTD1542.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan composiciones y métodos relacionados en parte con el direccionamiento satisfactorio de genes de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en Euphorbiaceae usando, por
20 ejemplo, la tecnología Rapid Trait Development System (**RTDS**TM) desarrollada por Cibus. Combinadas o solas, las plantas que contienen cualquiera de las mutaciones descritas en la presente pueden formar la base de nuevos productos

resistentes a herbicidas. También se proporcionan semillas producidas a partir de las plantas mutadas, donde los genes de AHAS son homocigotos o heterocigotos para las mutaciones. Las mutaciones descritas en la presente se pueden encontrar
5 combinadas con cualquier otra mutación conocida o con mutaciones que se descubran en el futuro.

RTDS se basa en la modificación de un gen diana mediante el uso del sistema de reparación génica propio de la célula para
10 modificar específicamente la secuencia génica in situ y no insertar ADN foráneo y secuencias de control de expresión génica. Este procedimiento realiza un cambio preciso en la secuencia genética, mientras que el resto del genoma permanece incambiado. Al contrario de las GMO transgénicas
15 convencionales, no hay integración del material genético foráneo y tampoco permanece ningún material genético foráneo en la planta. Los cambios en la secuencia genética introducidos por **RTDS** no se insertan de forma aleatoria. Dado que los genes afectados permanecen en su ubicación natural,
20 no se produce un patrón de expresión aleatorio, incontrolado o adverso.

El **RTDS** que realiza este cambio es un oligonucleótido sintetizado por medios químicos que puede estar compuesto

tanto por bases de ARN modificado como ADN, así como otros restos químicos, y se diseña para hibridarse en la ubicación del gen diana para crear un par de bases no emparejadas. Este par de bases no emparejadas actúa como una señal para atraer el sistema de reparación génica natural de la propia célula a ese sitio y corregir (reemplazar, insertar o eliminar) los nucleótidos designados dentro del gen. Una vez que se completa el proceso de corrección, la molécula de **RTDS** se degrada y el gen recién modificado o reparado se expresa con los mecanismos de control endógenos normales de dicho gen.

La introducción de genes mutantes exógenos en las plantas está bien documentada. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,545,060 se refiere al aumento de la resistencia de una planta a glifosato mediante la introducción en el genoma de la planta de un gen que codifica una variante de EPSPS que tiene al menos una mutación que vuelve a la enzima más resistente a su inhibidor competitivo, es decir, glifosato.

Los ejemplos de algunas de las mutaciones en los genes de AHAS son conocidos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,094,606.

Mediante la mutagénesis química, se encontró una mutación en

el gen de AHAS I con menor expresión. Esta mutación es conocida como PM-1 (una mutación en una posición equivalente conocida como 653 en función de la secuencia de aminoácidos de acetolactato sintasa (ALS) de *Arabidopsis*, un cambio de aminoácidos de serina a asparagina, que se codifican respectivamente de la siguiente manera - AGT a AAT). Se encontró otra mutación en el gen de AHAS III con mayor expresión, conocido como PM-2 . Estas dos mutaciones, PM-1 y PM-2, se combinan en una variedad comercial de colza conocida como colza Clearfield (Tan et ál., 2005).

A efectos ilustrativos, las mutaciones en cuestión se ilustran en mandioca (*Manihot esculenta*). Las composiciones y métodos también comprenden genes de AHAS mutantes de otras especies de Euphorbiaceae (parálogos). Sin embargo, debido a las variaciones en los genes de AHAS de diferentes especies, la cantidad de residuo de aminoácidos que se cambiará en una especie puede ser diferente en otra especie. Sin embargo, los entendidos en la técnica pueden identificar fácilmente la posición análoga mediante homología de secuencia.

Las composiciones y métodos se refieren en parte a mutaciones en un gen de AHAS que vuelven a una planta resistente o tolerante a un herbicida de la familia de herbicidas que

inhiben AHAS o ALS. Las composiciones y métodos también se refieren al uso de una oligonucleobase de reparación génica para realizar una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episomales de una planta en el gen que
5 codifica una proteína de AHAS. La proteína mutada, que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, permite mayor resistencia o tolerancia de la planta a un herbicida de la familia que inhibe AHAS, y permite el crecimiento o desarrollo
10 sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta de tipo silvestre independientemente de la presencia o ausencia del herbicida. Las composiciones y métodos también se refieren a una célula vegetal no transgénica en la cual se ha mutado un gen de
15 AHAS, una planta no transgénica regenerada a partir de esta, así como una planta resultante de un cruce utilizando una planta no transgénica regenerada con una planta que tiene una mutación en un gen de AHAS diferente o con una planta que tiene un gen de EPSPS mutado, por ejemplo.

20

Las imidazolinonas se encuentran entre las cinco familias químicas de herbicidas que inhiben AHAS. Las otras cuatro familias son sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos y sulfonilamino-carboniltriazolinonas

(Tan et ál., 2005).

También se proporciona una planta o célula vegetal transgénica o no transgénica que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS, por ejemplo, como se describe en la presente. En determinadas modalidades, la planta o célula vegetal que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS tiene mayor resistencia o tolerancia a un miembro inhibidor de AHAS. En determinadas modalidades, la planta o célula vegetal que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS puede presentar un crecimiento o un desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células, en comparación con la célula o planta de tipo silvestre correspondiente. En aspectos y modalidades particulares, se proporcionan plantas no transgénicas con una mutación en un gen de AHAS, por ejemplo, como se describe en la presente, que, en determinadas modalidades, presenta una mayor resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de herbicidas que inhiben AHAS y puede presentar un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente, es decir, en presencia de uno o más herbicidas, tales como, por ejemplo, una imidazolinona y/o sulfonilurea, la proteína de AHAS

mutada tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína de AHAS de tipo silvestre.

Además, se proporcionan métodos para producir una planta que
5 tiene un gen de AHAS mutado, por ejemplo, que tiene una o más mutaciones como se describe en la presente; preferentemente, la planta mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida pertinente. En
10 determinadas modalidades, los métodos incluyen introducir en una célula vegetal una oligonucleobase de reparación génica con una o más mutaciones dirigidas en el gen de AHAS (por ejemplo, como se describe en la presente) e identificar una célula, semilla o planta que tenga un gen de AHAS mutado.

15

La oligonucleobase de reparación génica se puede introducir a una célula vegetal mediante cualquier método comúnmente utilizado en la técnica que incluye, de modo no taxativo, microportadores (administración biolística), microfibras,
20 absorción mediada por polietilenglicol (PEG), electroporación y microinyección.

También se proporcionan métodos y composiciones relacionadas con el cultivo de células mutadas de acuerdo con los métodos

descritos en la presente para obtener una planta que produzca semillas, en adelante una «planta fértil» y la producción de semillas y plantas adicionales a partir de dicha planta fértil.

5

También se proporcionan métodos para controlar de forma selectiva las malezas en un campo, donde el campo comprende plantas con modificaciones en el gen de AHAS descrito y malezas, donde el método comprende la aplicación al campo de un herbicida al cual las plantas se han vuelto resistentes.

10

También se proporcionan mutaciones en el gen de AHAS que otorgan resistencia o tolerancia a un miembro del herbicida pertinente a una planta o donde el gen de AHAS mutado tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con AHAS de tipo silvestre.

15

Oligonucleobases de reparación génica

Los métodos y las composiciones que se describen en la presente se pueden poner en práctica o realizarse con las «oligonucleobases de reparación génica» que tienen las conformaciones y la química que se describen en detalle a continuación. Las «oligonucleobases de reparación génica» que

20

se consideran en la presente también se han descrito en la bibliografía de patentes y científica publicada mediante el uso de otros nombres como «oligonucleobases recombinagénicas»; «oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN»;
5 «oligonucleótidos quiméricos»; «oligonucleótidos dúplex mixtos» (MDON); «oligonucleótidos de ADN y ARN (RDO)»; «oligonucleótidos dirigidos a genes»; «genoplastos»; «oligonucleótidos modificados de cadena simple»; «vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos de cadena simple
10 »(SSOMV); «vectores mutacionales dúplex»; y «vectores mutacionales heterodúplex».

Las oligonucleobases que tienen conformaciones y química descritas en la patente estadounidense n.º 5,565,350 de Kmiec
15 (Kmiec I) y la patente estadounidense n.º 5,731,181 de Kmiec (Kmiec II), que se incorporan a la presente mediante esta referencia, son adecuadas para su uso como «oligonucleobases de reparación génica» de la invención. Las oligonucleobases de reparación génica en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos
20 cadenas complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos tipo ARN (un «segmento de ARN), que tienen las bases emparejadas con los nucleótidos tipo ADN de la otra cadena.

Kmiec II describe que los no nucleótidos que contienen bases de purina y pirimidina pueden sustituir a los nucleótidos. Las moléculas de reparación génica adicionales que se pueden usar para la presente invención se describen en las patentes
5 estadounidenses n.º 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 patentes internacionales n.º WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO
10 99/40789, que se incorporan a la presente en su totalidad.

En una modalidad, la oligonucleobase de reparación génica es un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) donde los nucleótidos tipo ARN del oligonucleótido dúplex mixto se vuelven
15 resistentes a la ARNasa mediante el remplazo de 2'-hidroxilo con una funcionalidad fluoro, cloro o bromo o mediante la colocación de un sustituyente en el 2'-O. Los sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes ilustrados por Kmiec II. Los sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes
20 ilustrados en la patente estadounidense n.º 5.334.711 (Sproat) y los sustituyentes ilustrados en las publicaciones de patente EP 629 387 y EP 679 657 (en su conjunto, las solicitudes de Martin), que se incorporan a la presente mediante referencia. Según se utiliza en la presente, un

derivado de 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido con un sustituyente descrito en las solicitudes de Martin o Sproat se denomina un «ribonucleótido 2'-sustituido». Según se
5 utiliza en la presente, la expresión «nucleótido tipo ARN» significa un 2'-hidroxilo o nucleótido 2'-sustituido que está unido a otros nucleótidos de un oligonucleótido dúplex mixto por un enlace fosfodiéster insustituido o cualquiera de los enlaces no naturales presentados por Kmiec I o Kmiec II.
10 Según se utiliza en la presente, la expresión «nucleótido tipo desoxirribo» significa un nucleótido que tiene un 2'-H que puede estar unido a otros nucleótidos de una oligonucleobase de reparación génica mediante un enlace fosfodiéster insustituido o cualquiera de los enlaces no
15 naturales presentados por Kmiec I o Kmiec II.

En una modalidad particular de la presente invención, la oligonucleobase de reparación génica es un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) que está unido solamente mediante enlaces
20 fosfodiéster insustituidos. En modalidades alternativas, el enlace es mediante fosfodiésteres sustituidos, derivados de fosfodiéster y enlaces no basados en fósforo según lo presenta Kmiec II. En aun otra modalidad, cada nucleótido tipo ARN en el oligonucleótido dúplex mixto es un nucleótido

2'-sustituido. Algunas modalidades preferidas particulares de ribonucleótidos 2'-sustituidos son ribonucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxiletiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Algunas modalidades más preferidas de ribonucleótidos 2'-sustituidos son nucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi y 2'-aliloxi. En otra modalidad, el oligonucleótido dúplex mixto está unido por enlaces fosfodiéster insustituidos.

Si bien los oligonucleótidos dúplex mixtos (MDON) que tienen solo un tipo de nucleótido tipo ARN 2'-sustituido se sintetizan de forma más práctica, los métodos de la invención se pueden realizar con los oligonucleótidos dúplex mixtos que tienen dos o más tipos de nucleótidos tipo ARN. La función de un segmento de ARN puede no verse afectada por una interrupción provocada por la introducción de un desoxinucleótido entre dos trinucleótidos tipo ARN, en consecuencia, el término segmento de ARN abarca términos como «segmento de ARN interrumpido». Un segmento de ARN ininterrumpido se denomina un segmento de ARN contiguo. En una modalidad alternativa, un segmento de ARN puede contener nucleótidos 2'-OH no sustituidos y resistentes a la ARNasa

que alternan. Los oligonucleótidos dúplex mixtos tienen, preferentemente, menos de 100 nucleótidos y, más preferentemente, menos de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. La primera y la segunda cadena presentan
5 emparejamiento de bases Watson-Crick. En una modalidad, las cadenas del oligonucleótido dúplex mixto están unidas mediante enlace covalente con un enlazador, como un hexa, penta o tetranucleótido de cadena simple, de modo que la primera y la segunda cadena sean segmentos de una única
10 cadena de oligonucleótidos que tiene un extremo 3' único y un extremo 5' único. Los extremos 3' y 5' se pueden proteger mediante la adición de un «casquete de horquilla» mediante el cual los nucleótidos terminales 3' y 5' presentan emparejamiento Watson-Crick con los nucleótidos adyacentes.
15 Se puede colocar, además, un segundo casquete de horquilla en la unión entre la primera y la segunda cadena lejos de los extremos 3' y 5', de modo que se establezca el emparejamiento Watson-Crick entre la primera y la segunda cadena.

20 La primera y la segunda cadena contienen dos regiones que son homólogas con dos fragmentos del gen diana, es decir, tienen la misma secuencia que el gen diana. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y puede contener uno o más nucleótidos tipo ADN de segmento de ADN de

conexión y también puede contener nucleótidos tipo ADN que no se encuentran dentro del segmento de ADN intermedio. Las dos regiones de homología están separadas y cada una es adyacente a una región que tiene una secuencia que difiere de la
5 secuencia del gen diana, denominada «región heteróloga». La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos no emparejados. Los nucleótidos no emparejados pueden ser contiguos o, de manera alternativa, pueden estar separados por uno o dos nucleótidos que son homólogos al gen diana. De
10 manera alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción o uno, dos, tres o cinco o menos nucleótidos. De manera alternativa, la secuencia del oligonucleótido dúplex mixto puede diferir de la secuencia del gen diana solamente mediante la eliminación de uno, dos,
15 tres o cinco o menos nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto. La longitud y posición de la región heteróloga, en este caso, se considera la longitud de la eliminación, aunque no haya nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos
20 del gen diana que son complementarios a las dos regiones homólogas es idéntica a la longitud de la región heteróloga donde se pretende realizar una o más sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas se separan así en el oligonucleótido dúplex mixto

más que sus fragmentos homólogos complementarios en el gen, y lo opuesto se aplica cuando la región heteróloga codifica una eliminación.

5 Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos dúplex mixtos forman parte de una región homóloga, es decir, una región que es idéntica en secuencia a un fragmento del gen diana, cuyos segmentos juntos contienen, preferentemente, al menos 13 nucleótidos tipo ARN y, preferentemente, entre 16 y 25
10 nucleótidos tipo ARN o incluso, más preferentemente, 18-22 nucleótidos tipo ARN o, más preferentemente, 20 nucleótidos. En una modalidad, los segmentos de ARN de las regiones de homología están separados por y adyacentes a, es decir, «conectados por» un segmento de ADN intermedio. En una
15 modalidad, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN intermedio. Un segmento de ADN intermedio que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido dúplex mixto se denomina un «segmento mutador».

20

En otra modalidad de la presente invención, la oligonucleobase de reparación génica (GRON) es un vector mutacional oligodesoxinucleótido de cadena simple (SSOMV), que se describe en la solicitud de patente internacional

PCT/US00/23457, patente estadounidense n.º 6,271,360, 6,479,292 y 7,060,500 que se incorporan en su totalidad mediante referencia. La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales descritos en las patentes estadounidenses n.º 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 publicación internacional n.º WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789. La secuencia de los SSOMV contiene dos regiones que son homólogas a la secuencia diana separada por una región que contiene la modificación genética deseada denominada región mutante. La región mutante puede tener una secuencia con la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia diana, pero con una secuencia distinta. Dicha región mutante puede provocar una sustitución. De manera alternativa, las regiones homólogas en el 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. Dicho SSOMV provoca una eliminación del gen diana de los nucleótidos del SSOMV que están ausentes. Por último, la secuencia del gen diana, que es idéntica a las regiones homólogas, puede ser adyacente en el gen diana, pero estar separada por uno, dos o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Dicho SSOMV

provoca una inserción en la secuencia del gen diana.

Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que se unen mediante enlaces fosfodiéster no modificados, salvo que
5 la unión internucleotídica del extremo 3' y/o 5' o, de manera alternativa, los dos enlaces internucleotídicos del extremo 3' y/o 5' puedan ser un fosforotioato o fosfoamidato. Según se utiliza en la presente, un enlace internucleótido es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace
10 entre el nucleótido de extremo 3' o el nucleótido de extremo 5' y un sustituyente de bloqueo. En una modalidad específica, la longitud del SSOMV es de entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología son, por consiguiente, la longitud total de al menos 20
15 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deberían tener, cada una, longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

El SSOMV se puede diseñar para ser complementario de la
20 cadena codificante o no codificante del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una base única, se prefiere que el nucleótido mutador y el nucleótido diana sean una pirimidina. En la medida en que sea compatible con el logro del resultado funcional deseado, se prefiere que el

nucleótido mutador y el nucleótido diana en la cadena complementaria sean pirimidinas. Se prefieren, en particular, SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido mutador C o T que no esté emparejado, respectivamente, con un nucleótido C o T en la cadena complementaria.

Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un sustituyente de bloqueo 5' que está unido a los carbonos de extremo 5' a través de un enlazador. La química del enlazador no es fundamental más allá de su longitud, que, preferentemente, debería ser de al menos 6 átomos de longitud y el enlazador debería ser flexible. Se pueden utilizar diversos sustituyentes no tóxicos como biotina, colesterol u otros esteroides o una tinta fluorescente catiónica no intercalante. Los reactivos particularmente preferidos para hacer SSOMV son los reactivos comercializados como Cy3™ y Cy5™ por Glen Research, Sterling Va. (ahora GE Healthcare), que son fosforamiditas bloqueadas que tras la incorporación en un oligonucleótido producen tintas de indomonocarbocianina e indodicarbocianina 3,3,3',3'-tetrametil N,N'-isopropil sustituidas, respectivamente. Se prefiere particularmente el Cy3. Cuando la indocarbocianina es N-oxialquilo sustituida, se puede unir de forma conveniente al extremo 5' del

oligodesoxinucleótido como un fosfodiéster con un fosfato de extremo 5'. La química del enlazador de tinta entre la tinta y el oligodesoxinucleótido no es fundamental y se elige por practicidad de síntesis. Cuando se utiliza la fosforamidita de Cy3 disponible a nivel comercial como se indica, la modificación en 5' resultante consiste en un sustituyente de bloqueo y un enlazador juntos que son un N-hidroxipropilo, N'-fosfatidilpropilo 3,3,3',3'-tetrametilo indomonocarbocianina.

10

En una modalidad preferida, la tinta de indocarbocianina se encuentra tetra sustituida en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitarse a ninguna teoría, estas sustituciones evitan que la tinta sea una tinta intercalante.

15 La identidad de los sustituyentes en estas posiciones no es fundamental. El SSOMV puede tener, además, un sustituyente de bloqueo en 3'. Nuevamente, la química del sustituyente de bloqueo en 3' no es fundamental.

20 Las mutaciones descritas en la presente también se pueden obtener por mutagénesis (aleatoria, somática o dirigida) y otras tecnologías de edición o recombinación de ADN que incluyen, de modo no taxativo, direccionamiento génico utilizando recombinación homóloga específica del sitio

mediante nucleasas de dedos de cinc.

Aumento de la eficacia de la modificación génica dirigida

5 Los ácidos nucleicos que dirigen cambios específicos al
genoma se pueden combinar con diversos enfoques para
potenciar la disponibilidad de los componentes de los
sistemas de reparación naturales presentes en las células a
las que se dirige la modificación. Estos enfoques incluyen,
10 de modo no taxativo, el uso de nucleasas efectoras similares
al activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en
inglés) o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y
regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés).
Véanse, por ejemplo, WO2014/144951 y WO2014/144951, cuyo
15 contenido se incorpora en la presente en su totalidad
mediante esta referencia.

Las TALEN son nucleasas que se pueden dirigir, que se
utilizan para inducir interrupciones de cadena simple y doble
en sitios de ADN específicos, que luego se reparan mediante
20 mecanismos que se pueden aprovechar para crear alteraciones
en la secuencia en el sitio de escisión. El bloque de
construcción fundamental que se utiliza para modificar
genéticamente la región de unión al ADN de TALEN es un
dominio de repetición muy conservado derivado de TALE de

origen natural codificadas por proteobacteria *Xanthomonas* spp. La unión al ADN mediante TALEN es mediada por matrices de repeticiones de 33-35 aminoácidos muy conservadas flanqueadas por dominios derivados de TALE adicionales en los extremos amino y carboxi de las repeticiones. Estas repeticiones de TALE se unen específicamente a una única base de ADN, cuya identidad se determina mediante dos residuos hipervariables que se encuentran comúnmente en las posiciones 12 y 13 de la repetición, con correspondencia de la cantidad de repeticiones en una matriz a la longitud del ácido nucleico diana deseado, y elección de la identidad de la repetición para que coincida con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El ácido nucleico diana tiene preferentemente entre 15 y 20 pares de bases para maximizar la selectividad del sitio diana. La escisión del ácido nucleico diana se produce comúnmente a 50 pares de bases de la unión a TALEN. En la técnica se han descrito programas informáticos para el diseño de sitios de reconocimiento de TALEN. Véase, por ejemplo, Cermak et ál., *Nucleic Acids Res.* julio de 2011; 39(12): e82. Una vez que se ha diseñado para que coincida con la secuencia diana deseada, las TALEN se pueden expresar de forma recombinante e introducirse en protoplastos como proteínas exógenas, o expresarse a partir de un plásmido dentro del protoplasto.

De manera similar, el sistema CRISPR/Cas se puede usar para la edición génica. Al suministrar Cas9 u otra proteína asociada a CRISPR y ARN de guía apropiados (ARNg) a una
5 célula, el genoma del organismo puede cortarse en cualquier lugar deseado. El complejo ARNg/Cas9 se recluta a la secuencia diana mediante emparejamiento de bases entre la secuencia de ARNg y el complemento con la secuencia diana en el ADN genómico. Para la unión satisfactoria de Cas9, la
10 secuencia diana genómica también debe contener la secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) correcto inmediatamente después de la secuencia diana. La unión del complejo gRNA/Cas9 localiza la Cas9 a la secuencia diana genómica de manera que la Cas9 de tipo
15 silvestre pueda cortar ambas cadenas de ADN para provocar una ruptura de cadena doble (DSB, por sus siglas en inglés). Cas9 cortará 3-4 nucleótidos corriente arriba de la secuencia de PAM. Una DSB se puede reparar mediante una de dos vías de reparación generales: (1) la vía de reparación de ADN de
20 unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o (2) la vía de reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés). La vía de HDR utiliza una plantilla de reparación para fijar la DSB. La HDR copia fielmente la secuencia de la plantilla de reparación a la

secuencia diana cortada. Se pueden introducir cambios de nucleótidos específicos en un gen dirigido mediante el uso de HDR con una plantilla de reparación para editar un gen.

5 Otra clase de endonucleasas artificiales son las meganucleasas modificadas genéticamente. Las endonucleasas homing modificadas genéticamente se generan mediante la modificación de la especificidad de las endonucleasas homing existentes. En un enfoque, se introducen variaciones en la
10 secuencia de aminoácidos de las endonucleasas homing de origen natural y luego se evalúan las endonucleasas homing modificadas genéticamente resultantes para seleccionar proteínas funcionales que escinden un sitio de unión diana. En otro enfoque, las endonucleasas homing quiméricas se
15 modifican genéticamente mediante la combinación de los sitios de reconocimiento de dos endonucleasas homing distintas para crear un nuevo sitio de reconocimiento compuesto por un medio sitio de cada endonucleasa homing.

20 Administración de oligonucleobases de reparación génica en células vegetales

Se puede utilizar cualquier método comúnmente conocido utilizado para transformar una célula vegetal para

administrar las oligonucleobases de reparación génica. A continuación, se enumeran métodos ilustrativos.

Microportadores y microfibras

5

El uso de microportadores metálicos (microesferas) para introducir fragmentos grandes de ADN en las células vegetales con paredes celulares de celulosa mediante penetración de proyectiles es conocido por los expertos en la técnica
10 pertinente (de ahora en adelante, administración biolística). Las Patentes estadounidenses n.º 4,945,050; 5,100,792 y 5,204,253 describen técnicas generales para seleccionar microportadores y dispositivos para proyectarlos.

15 Las condiciones específicas para el uso de microportadores en los métodos de la presente invención se describen en la publicación internacional WO 99/07865. En una técnica ilustrativa, se agregan microportadores helados (60 mg/mL), oligonucleótidos dúplex mixtos (60 mg/mL), CaCl_2 2,5 M y
20 espermidina 0,1 M en ese orden; la mezcla se agita suavemente, por ejemplo, con vórtex, durante 10 minutos y luego se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego de lo cual los microportadores se diluyen en 5 volúmenes de etanol, se centrifugan y resuspenden en etanol

al 100 %. Se pueden obtener buenos resultados con una concentración en la solución adherente de 8-10 µg/µL de microportadores, 14-17 µg/mL de oligonucleótido dúplex mixto, CaCl₂ 1,1-1,4 M y 18-22 mM de espermidina. Se observaron
5 resultados óptimos en las condiciones de 8 µg/µL de microportadores, 16,5 µg/mL de oligonucleótido dúplex mixto, CaCl₂ 1,3 M y 21 mM de espermidina.

También se pueden introducir oligonucleobases de reparación
10 génica en las células vegetales para la práctica de la presente invención utilizando microfibras para penetrar la pared celular y la membrana celular. La patente estadounidense n.º 5.302.523 de Coffee et ál. describe el uso de 30 veces 0.5 µm y 10 veces 0.3 µm de fibras de carburo de
15 silicio para facilitar la transformación de los cultivos de maíz en suspensión de Black Mexican Sweet. Se puede utilizar cualquier técnica mecánica que se pueda utilizar para introducir ADN para la transformación de una célula vegetal mediante el uso de microfibras para administrar las
20 oligonucleobases de reparación génica para la transmutación.

A continuación, se describe una técnica ilustrativa para la administración de microfibras de una oligonucleobase de reparación génica: Se suspenden microfibras estériles (2 µg)

en 150 μ L de medio de cultivo vegetal con alrededor de 10 μ g de un oligonucleótido dúplex mixto. Se deja asentar un cultivo de suspensión y se agitan en vórtex en volúmenes iguales de células concentradas y la suspensión de
5 nucleótidos/fibras estériles durante 10 minutos y se colocan en placas. Los medios selectivos se aplican de inmediato o con un retraso de hasta alrededor de 120 h según sea apropiado para el rasgo particular.

10 Electroporación de protoplastos

En una modalidad alternativa, las oligonucleobases de reparación génica se pueden administrar a la célula vegetal mediante electroporación de un protoplasto derivado de una parte de planta. Los protoplastos se forman mediante
15 tratamiento enzimático de una parte de la planta, particularmente una hoja, de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gallois et ál, 1996, en Methods in Molecular Biology 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp et ál., 1999, en
20 Methods in Molecular Biology 133:213-221, Humana Press, Totowa, N.J. No es necesario cultivar los protoplastos en medio de crecimiento antes de la electroporación. Las condiciones ilustrativas para la electroporación son 3.veces.10.sup.5 protoplastos en un volumen total de 0.3 mL

con una concentración de oligonucleobase de reparación génica de entre 0.6-4 µg/mL.

Absorción de ADN mediada por PEG de protoplastos

5

En una modalidad alternativa, los ácidos nucleicos son absorbidos por protoplastos vegetales en presencia del agente modificador de la membrana polietilenglicol, de acuerdo con técnicas conocidas por los entendidos en la técnica (véase, 10 por ejemplo, Gharti-Chhetri et ál., 1992; Datta et ál., 1992).

Microinyección

15 En una modalidad alternativa, las oligonucleobases de reparación génica se pueden suministrar mediante inyección con un microcapilar en las células vegetales o en los protoplastos (véase, por ejemplo, Miki B. et ál., 1989; Schnorf M., et ál., 1991).

20

Selección de plantas resistentes a herbicidas y aplicación de herbicidas

Se pueden analizar las plantas y células vegetales para

determinar la resistencia o la tolerancia a un herbicida mediante el uso de métodos comúnmente conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo de la planta o célula vegetal en presencia de un herbicida y mediante la
5 medición de la tasa de crecimiento en comparación con la tasa de crecimiento en ausencia del herbicida.

Como se usa en la presente, crecimiento básicamente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal
10 se define como una tasa de crecimiento o velocidad de división celular de la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que es de al menos 35 %, al menos 50 %, al menos 60 % o al menos 75 % de la tasa de crecimiento o velocidad de división celular en una planta, órgano vegetal,
15 tejido vegetal o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína de AHAS de tipo silvestre.

Tal como se usa en la presente, el desarrollo básicamente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal se define como la aparición de uno o más eventos de
20 desarrollo en la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que son básicamente iguales a los que ocurren en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína de AHAS de

tipo silvestre.

En determinadas modalidades, los órganos vegetales proporcionados en la presente incluyen, entre otros, hojas,
5 tallos, raíces, brotes vegetativos, brotes florales, meristemos, embriones, cotiledones, endosperma, sépalos, pétalos, pistilos, estambres, carpelos, anteras, microsporas, polen, tubos de polen, óvulos, ovarios y frutas, o secciones, rodajas o discos de estos. Los tejidos vegetales incluyen,
10 entre otros, tejidos de callos, tejidos de tierra, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos foliares, tejidos de brotes, tejidos de raíz, tejidos de agallas, tejidos tumorales de las plantas y tejidos reproductivos. Las células vegetales incluyen,
15 entre otros, células aisladas con paredes celulares, agregados de diversos tamaños de estos y protoplastos.

Las plantas son sustancialmente «tolerantes» a un herbicida relevante cuando se someten a este y proporcionan una curva
20 de dosis/respuesta que se desplaza a la derecha cuando se compara con la que proporciona una planta no tolerante que se somete de forma similar. Dichas curvas de dosis/respuesta tienen una «dosis» trazada en el eje X y un «porcentaje de eliminación», «efecto herbicida», etc. trazado en el eje y.

Las plantas tolerantes requerirán más herbicida que las plantas no tolerantes para producir un efecto herbicida determinado. Las plantas que son sustancialmente «resistentes» al herbicida presentan menos, si es que
5 presentan, lesiones necróticas, líticas, cloróticas u otras cuando se someten al herbicida en concentraciones y a tasas que comúnmente son empleadas por la comunidad agroquímica para eliminar malezas en el campo. Las plantas que son resistentes a un herbicida también son tolerantes al
10 herbicida.

EJEMPLOS

A continuación, se presentan ejemplos que ilustran los procedimientos para llevar a la práctica la invención. Estos
15 ejemplos no deben interpretarse en sentido restrictivo. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla en disolventes son en volumen, a menos que se indique algo diferente.

20 Ejemplo 1: Preparación de muestras de Euphorbiaceae resistentes a herbicidas

A menos que se indique de otro modo, como se usa en la presente, la numeración del o los genes se basa en la

secuencia de aminoácidos de acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Arabidopsis* At3g48560 (SEQ ID NO:4). En las referencias anteriores a octubre de 2005, la posición S653 (basada en la secuencia de aminoácidos de *Arabidopsis*) se denomina S621 en función de las secuencias de aminoácidos de maíz ZmAHAS108 y ZmAHAS109 (Fang et ál., 1992).

Preparación de muestras de Euphorbiaceae resistentes a herbicidas

10

Las mutaciones se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio (SDM, por sus siglas en inglés) del gen de AHAS de mandioca de tipo silvestre 1 y se transformaron en las células bacterianas CHI que carecen del homólogo de AHAS endógeno. Las células diluidas en serie se colocaron en placas con concentraciones crecientes de imazamox (IM) o flumetsulam (TP). Se usaron AHAS de mandioca wt y mutante de ALS de colza conocidos por ser muy tolerantes a herbicidas como controles negativos y positivos, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 7. Conjuntos representativos de pruebas de manchas bacterianas que muestran los controles positivos y negativos, algunos otros mutantes analizados y el mutante D376A. Las concentraciones de herbicida enumeradas en la columna izquierda corresponden

15

20

a la fila completa y las columnas separan distintas líneas. Cada prueba de mancha consiste en cuatro diluciones de 1:10 en serie (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) después de la normalización en función de OD600 de cada cultivo líquido de

5 M9.

Las células con el gen de AHAS de mandioca wt de control negativo se desarrollaron en placas sin herbicida, pero no se desarrollaron en las placas que contenían el herbicida IM o

10 TP. Las células de control positivo con el mutante de ALS de colza se desarrollaron en todas las concentraciones de IM y TP, hasta que cesó todo crecimiento con IM o TP 5 mM.

D376A, y su tolerancia importante a IM, es sorprendente ya

15 que esto no se ha descrito en la mandioca hasta la fecha. W574L también presenta tolerancia importante tanto a TP como a IM, si bien el crecimiento es inconsistente.

Los mutantes también se analizaron usando un ensayo de «curva

20 de eliminación» donde se colocaron en placas cantidades iguales de células que contenían el mutante de interés con concentraciones crecientes de herbicida y se contabilizó la cantidad de colonias resultantes. Se promediaron los resultados de la curva de eliminación entre tres

experimentos, cada uno con un promedio de tres replicaciones técnicas. Las barras de error representan $\pm$ una desviación estándar de los datos promediados. Los resultados se ilustran en la Figura 6A y 6B. D376A, y su tolerancia importante a IM, es sorprendente ya que esto no se ha descrito en la mandioca hasta la fecha. W574L también presenta tolerancia importante tanto a TP como a IM, si bien el crecimiento es inconsistente.

Ejemplo 2: Producción de tejidos vegetales de mandioca del cultivo

Las plántulas *in vitro* se mantienen mediante subcultivos mensuales como recortes de brotes luego del procedimiento descrito por Hankoua et ál., Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledon of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. Plant Cell, Tiss. Org. 81(2):200-211, 2005. Se recogen meristemos apicales de brotes y lóbulos de la hoja inmadura (0.1-0.9 mm de longitud) de las plántulas 10-14 días después del subcultivo previo y se cultivan en medio de inducción de embriones basado en picloram (P-CIM, por sus siglas en inglés) para la inducción de embriones somáticos primarios y estructura embriogénica organizada (OES, por sus siglas en inglés). OES se dividen en agrupaciones pequeñas de 5-10 embriones cada uno y se

transfieren a medio de maduración de embriones de mandioca (CMML, por sus siglas en inglés) (Tabla 1), como lo describen Hankoua et ál. (2005) para potenciar su desarrollo hacia embriones en etapa cotiledónea verde. Se colocan partes de cotiledón verdes (alrededor de 5 mm² cada una), obtenidas de embriones de etapa cotiledónea de 14-15 días de edad usando un bisturí, en P-CIM para la producción de embriones somáticos secundarios. Las agrupaciones de embriones somáticos secundarios inducidas por P-CIM se transfieren a CMML para la maduración. Las partes de cotiledón somáticas verdes obtenidas de embriones de etapa secundaria de 14-15 días de edad se colocan en P-CIM para la inducción de embriogénesis somática cíclica. OES inducida de todos los genotipos de mandioca se fragmentan en pequeñas partes de alrededor de 5 mm² cada una y se subcultivan en medio de inducción de callo friable y medio de mantenimiento (FEC-IM, por sus siglas en inglés) para la inducción de callo embriogénico friable (FEC, por sus siglas en inglés), como lo describen Taylor et ál., Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Nature Biotechnol. 14(6):726-730, 1996. FEC-IM es modificado mediante la inclusión de 25- mg/l- de hidrolisado de caseína y 2 µM de sulfato de cobre. Los callos con potencial para desarrollarse en FEC y FEC inducidos se

subcultivan en el mismo medio para la selección y proliferación de callo de embriogénesis friable de calidad alta. Se inician las suspensiones embriogénicas mediante la transferencia de aproximadamente 35 mg de FEC puro a 50 ml de medio de suspensión de embriogénesis (EMS) y cultivo como lo describen Taylor et ál. (1996). Todos los cultivos se incuban en la habitación de desarrollo a temperaturas que oscilan entre 25 °C y 28 °C en oscuridad total (una semana) para la inducción de los embriones a partir de explantos de meristemo apicales y lóbulo de la hoja o con un fotoperíodo de 16 h (40-100 μm de fotón $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$ PAR) para la multiplicación y el mantenimiento de todos los otros tejidos. A menos que se indique de otro modo, todos los medios de cultivo se complementan con agar al 0.6 %.

15

Ejemplo 3. Aislamiento de protoplastos de mandioca

Dos gramos de FEC se colocan en placas Petri que contienen 10 ml de solución de digestión de pared celular. La solución de digestión de la pared celular consistió en una mezcla de enzimas que degradan la pared celular; 10 mg/l de Pectolyase, 10 g/l de celulosa, 200 mg/l de reguladores del crecimiento Macerozyme (NAA 1 mg/l, 2,4-D 1 mg/l, de Zeatin 1 mg/l), sales mayores (368 mg/l de CaCl_2 ; 34 mg/l de KH_2PO_4 ; 740

mg/KNO₃; 492 mg/l de MgSO₄.7H₂O); sales menores (19.2 mg/l de NA-EDTA; 14 mg/l de FeSO₄.7H₂O) y osmoticum (91 g/l de D-manitol) y 0.5 g/l de MES. Las enzimas celulasa que degradan la pared celular (1-10 g/l) más Macerozyme (200 mg/l) son

5 satisfactorias para el aislamiento de protoplastos. La adición extra de Pectolyase (0.001-0.01 g/l) y/o Driselase (0.02 g/l) aumentó la producción de protoplastos. Después de 18 h de incubación, se agregan 10 ml de medio de lavado a la solución. El medio de lavado con una osmolaridad de 0.530

10 mOsm/kg consistió en sales mayores (ver la solución de digestión de la pared celular), 45.5 g/l de manitol y 7.3 g/l de NaCl. El tejido digerido se filtra a través de un filtro de 73 µm de tamaño de poro (PA 55/34 Nybolt-Suiza) en un vaso de vidrio de 250 ml. El filtrado se divide en partes iguales

15 en dos tubos cónicos de tapa roscada de 12 ml y se centrifuga a 600 rpm durante 3 min. (Mistral 2000). Se repite el procedimiento de lavado una vez más después de retirar el sobrenadante. La solución de protoplastos se vuelve a suspender mediante flotación en 9.5 ml de solución que

20 contiene sales mayores y menores (ver la solución de digestión de la pared celular) y 105 g/l de sacarosa. El pH es de 5.8 y la osmolaridad de 0.650 mOsm. La solución con protoplastos se deja equilibrar durante 5 minutos antes de agregar suavemente 0.5 ml de medio de lavado en la parte

superior. Después de la centrifugación a 700 rpm durante 15 min. (Mistral 2000), se concentraron los protoplastos en una banda entre la sacarosa y el medio de lavado. La capa de protoplastos se recoge con una pipeta de Pasteur y la
5 producción se contabiliza en una cámara de hemocitómetro estándar.

Ejemplo 4: Cultivo de protoplastos

Se cultivaron protoplastos en medio solidificado con agarosa
10 0.2 % p/v en placas petri que contenían 10 ml del mismo medio líquido. Los siguientes medios generaron la formación de microcallos:

Medio TM2G (Wolters et ál., 1991) complementado solamente con
15 auxinas (0.1-10 mg/l de NAA o 0.1-10 mg/l de Picloram, o 0.1-10 mg/l de IAA, o 0.1-10 mg/l de 2,4-D, o 0.1-10 mg/l de Dicamba, o 0.1-10 mg/l, o 0.1-10 mg/l) o auxinas más citocininas (0.01-1 mg/l de zeatina, 0.01-1 mg/l de 2-iP, 0.01-1 mg/l de BA, 0.01-1 mg/l de TDZ, 0.01-1 mg/l de
20 cinetina).

Sales y vitaminas de medio A (Murashige y Skoog (1962), 4.5 g/l de mio-inositol, 4.55 g/l de manitol, 3.8 g/l de xilitol, 4.55 g/l de sorbitol, 0.098 g/l de MES, 40 mg/l de

adeninsulfato y 150 mg/l de caseinhidrolisato, 0.5 mg/l de d-calcio-pantotenato, 0.1 mg/l de colina-cloruro, 0.5 mg/l de ácido ascórbico, 2.5 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 10 mg/l de tiamina-HCl, 0.5 mg/l de ácido fólico, 0.05 mg/l de biotina, 0.5 mg/l de glicina, 0.1 mg/l de L-cisteína y 0.25 mg/l de riboflavina y 59.40 g/l de glucosa) complementado solamente con auxinas (0.1-10 mg/l de NAA o 0.1-10 mg/l de Picloram, o 0.1-10 mg/l de IAA, o 0.1-10 mg/l de 2,4-D, o 0.1-10 mg/l de Dicamba más citocininas (0.01-1 mg/l de zeatina, 0.01-1 mg/l de 2-iP, 0.01-1 mg/l de BA, 0.01-1 mg/l de TDZ, 0.01-1 mg/l de cinetina).

Los medios se renuevan cada 10 días, reemplazando 9 ml con medio nuevo. Después de dos meses de cultivo en el primer medio, se selecciona FEC de calidad alta y cualquiera de los cultivos para proliferación adicional o para maduración. Para la proliferación, se transfiere FEC a medio Gresshoff y Doy complementado con 40 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar Daichin y 2 mg/l de picloram (GD4). Después de 3 semanas, se transfiere FEC a medio Gresshoff y Doy complementado con 20 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y 10 mg/l de Picloram (GD2). Se iniciaron los cultivos de suspensión mediante la transferencia de 1.0 g de FEC a medio SH6% líquido complementado con 10 mg/l de Picloram. Dos semanas después,

la suspensión se divide en nuevos matraces con un volumen de concentrado celular inicial de 1.0 ml.

Después de 2 meses de cultivo, 10^4 protoplastos cultivados en
5 TM2G complementado con 0.5 mg/l de NAA y 1 mg/l de Zeatina a una densidad de 10^5 /ml pueden producir >1000 micro-callos, mientras que 10^4 protoplastos cultivados a una densidad de 10^6 /ml pueden producir 64 microcallos. Reemplazar medio TM2G con medio A redujo en ambas densidades la cantidad de
10 microcallos de manera significativa. En esta etapa, se pueden distinguir al menos tres tipos de callos. Un tipo consiste en embriones con forma globular que se observan mayormente en protoplastos cultivados a una densidad de 10^6 . Algunos de ellos desarrollan estructuras tipo cotiledón, de color verde
15 claro. Sin embargo, estos embriones pueden no germinar de forma apropiada. Otro tipo crece rápidamente y consiste en un callo compacto grande. Este callo nunca desarrolla embriones. El tercer tipo es un callo muy friable y se observa en ambas densidades. A una densidad de $2-5 \times 10^5$ (medio TM2G) alrededor
20 de 60 % de los callos son friables y embriogénicos. El FEC se puede subcultivar para la proliferación adicional o para la maduración.

Ejemplo 5: Proliferación de FEC derivado de protoplastos

Luego de la selección de FEC, 0.1 g de este cultivado durante tres semanas en GD4 más 2 mg/l de Picloram aumentó hasta 0.7 g de tejido. Más del 95 % del tejido consiste en FEC de
5 calidad alta. Posteriormente, este tejido se mantiene mediante subcultivos de tres semanas en medio GD2 complementado con 10 mg/l de Picloram. Para iniciar los cultivos de suspensión, se transfiere FEC a medio líquido.

10 Ejemplo 6: Maduración de FEC derivado de protoplastos

El FEC aislado después de 2 meses de cultivo en TM2G se cultiva en medio de maduración. El medio de maduración consistió en sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962),
15 10 g/l de agar Daichin, 0.1 g/l de mio-inositol, 20 g/l de sacarosa, 18.2 g/l de manitol, 0.48 g/l de MES, 0.1 g/l de hidrolisado de caseína, 0.08 g/l de sulfato de adenina, 0.5 mg/l de d-calcio-pantotenato, 0.1 mg/l de cloruro de colina, 0.5 mg/l de ácido ascórbico, 2. Mg/l de ácido nicotínico, 1
20 mg/l de piridoxina-HCl, 10 mg/l de tiamina HCl, 0.5 mg/l de ácido fólico, 0.05 mg/l de biotina, 0.5 mg/l de glicina, 0.1 mg/l de L-cisteína, 0.25 mg/l de riboflavina y 1 mg/l de picloram. Este medio de maduración se renueva cada 3 semanas.

En este medio hay un cambio gradual de proliferación a maduración. Como resultado, el volumen de concentrado celular aumenta en un factor de 4 después de dos semanas de cultivo en medio de maduración líquido. Además, después de la
5 transferencia al medio de maduración sólido, hay proliferación. Después de dos semanas en medio sólido, la mayoría de los embriones alcanzan una forma globular y solamente unos pocos de estos embriones globulares continúan desarrollándose. Los primeros embriones en forma de torpedo
10 se vuelven visibles después de un mes de cultivo en medio de maduración sólido. La cantidad de embriones maduros y en forma de torpedo no se correlaciona con la eficacia de colocación en placas sino con la densidad de los protoplastos inicialmente cultivados. No se obtienen dichos embriones si
15 los protoplastos se cultivan en TM2G sin reguladores de crecimiento. La mayor cantidad de embriones maduros y en forma de torpedo se forma a partir de protoplastos cultivados en TM2G complementado con 0.5 mg/l de NAA y 1 mg/l de Zeatina. Después de 3 meses de cultivo, se aíslan entre 60 y
20 200 embriones en forma de torpedo y maduros por gota de agarosa. Los embriones en forma de torpedo se vuelven maduros a frecuencia alta si se cultivan en medio de maduración nuevo o en MS2 más 0.1 mg/l de BAP.

Ejemplo 7: Embriogénesis somática secundaria y germinación de embriones maduros derivados de protoplastos

Tanto en medio líquido como sólido, 2,4-D es superior para la inducción de embriogénesis secundaria en comparación con NAA. Si los embriones maduros se cultivan en primer lugar en 2,4-D y luego en NAA líquido, la respuesta es comparable al cultivo en 2,4-D solo. Además, los embriones que se sometieron en primer lugar a un ciclo de embriogénesis somática secundaria en medio con 2,4-D produjeron embriones secundarios muy eficaces en MS20 complementado con 10 mg/l de NAA. El desecado estimuló la germinación normal de embriones inducidos por NAA. Sin embargo, los embriones desecados requieren un medio complementado con citocininas, tal como bencitaminopurina (BAP) para la germinación a frecuencia alta. Con 1 mg/l de BAP, se forman plantas con raíces centrales gruesas y cortas y brotes ramificados con internodos cortos. Con 0.1 mg/l de BAP, las raíces centrales son delgadas y espigadas. Además, los embriones desecados que se cultivan en la oscuridad requieren una menor concentración de BAP y, además, estos embriones, germinan más rápido que los embriones cultivados en la luz. Las plantas completas se obtienen cuatro semanas después del inicio de la inducción de embriones somáticos. Los embriones inducidos con 2,4-D

muestran una respuesta distinta. En todos los genotipos, la desecación estimula la formación de raíces. Los embriones cultivados en la oscuridad forman raíces predominantemente inesperadas, mientras que los embriones cultivados en la luz
5 forman predominantemente raíces centrales.

Ejemplo 10: CRISPR y GRON en mandioca.

Este ejemplo demuestra conversión de W574S de AHAS en *Manihot*
10 *esculenta* a las 4 semanas después del suministro de PEG de plásmidos de CRISPR-Cas9 y GRON a protoplastos. Las CRISPR-Cas9 utilizadas en este experimento se dirigen a los genes de AHAS en el genoma de la mandioca mediante la introducción en los protoplastos de uno o más plásmidos que codifican el gen
15 Cas9 y ARNsg. El ARNsg es una fusión del ARN de CRISPR (ARNcr) y el ARNcr transactivador (ARNtracr). El ARNcr guía a Cas9 hacia los genes diana, donde Cas9 crea una interrupción de cadena doble en los genes de AHAS y los GRON se utilizan como una plantilla para la conversión de los genes de AHAS de
20 forma dirigida al sitio.

Métodos

Se aislaron protoplastos de mandioca de las suspensiones

celulares de raíces. El plásmido que codifica CRISPR-Cas9 (pTD1315, Figura 7A) contiene el promotor MAS que conduce la secuencia codificante de Cas9 con un terminador rbcSE9. Se usaron plásmidos de ARNsg individuales (pTD1541 y pTD1542, 5 Figura 7B) con el promotor U6 del arroz que conduce los ARNsg con un terminador rbcSE9. Los plásmidos se introdujeron en los protoplastos mediante administración mediada por PEG a una concentración final de 0.08 µg/µl. Se usaron GRON (AHAS1-2-C y AHAS2-2-C, ver más adelante) a una concentración final 10 de 0.5 µM. Los protoplastos se cultivaron en medio líquido, y se incubaron en la oscuridad a 28 °C durante dos semanas, luego de lo cual se movieron a un agitador giratorio a 50 rpm a 28 °C en luz baja indirecta. Las muestras individuales de microcallos de 30k se analizaron mediante NGS 4 semanas 15 después del suministro de plásmidos de CRISPR-Cas9 y/o GRON, para determinar el porcentaje de células (lecturas de ADN) que transportan la conversión de AHAS y que tienen indels en el gen de AHAS.

20 La CRISPR consiste en dos componentes: La Cas9 de *Streptococcus pyogenes* optimizada por codón vegetal (SpCas9) y el ARNsg, que se expresan a partir del mismo plásmido. El ARNsg es una fusión del ARN de CRISPR (ARNcr) y el ARNcr transactivador (ARNtracr). La región de ARNcr contiene la

secuencia espaciadora 5'-ACGAGGAGGGGCTTGGGTTGTGG-3 (SEQ ID NO: 6) usada para guiar a la nucleasa de Cas9 al gen diana. En este experimento, las CRISPR se dirigen a los genes de AHAS. Se utilizaron las siguientes secuencias en estos

5 métodos:

ARNsg de AHAS1 (SEQ ID NO: 7):

ATTTGGGAATGGTGGTACAATGGGAGG

ARNsg de AHAS2 (SEQ ID NO: 8):

GAACAATCAACATCTGGGTATGGTTGTTCAATGG

10 GRON de AHAS1-2-C (SEQ ID NO: 9):

TCTGCCAATTAAAATAATGCTTTTGAATAATCAGCATTTGGGAATGGTGGTACAATCGGAA

GACCGATTCTACAAGGCTAATAGAGCTCATACTTATTTGGGGGATCCATCAA

GRON de AHAS2-2-C (SEQ ID NO: 10):

ACCTGCCTGTGAAGATCTTGTTACTGAACAATCAACATCTGGGTATGGTTGTTTCAGTCGGA

15 GGACAGATTCTATCATTTCCAACAGAGCACATACATATTTAGGGAACCCATCA

Resultados

A las 4 semanas, los protoplastos del arroz presentan 0.024% de conversión del gen de AHAS1 y 0.007 % de AHAS2, según se

20 determina mediante NGS. Los controles únicamente con GRON sin CRISPR-Cas9 y los controles sin tratamiento no demostraron conversión. Además, estos datos demuestran que la CRISPR-Cas9 está activa y es capaz de escindir los genes diana de AHAS y

formar indels con un índice de hasta 52.1 %.

REFERENCIAS

- 5 Datta SK, Datta K, Soltanifar N, Donn G, Potrykus I (1992) Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Molec. Biol.* 20:619-629
- Dovzhenko A (2001) Towards plastid transformation in rapeseed
10 (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). PhD Dissertation, LMU Munich, Faculty of Biology
- Duggleby, R.G. McCourt, J.A.; Guddat L.W. *Plant Physiology and Biochemistry.* 46, (2008) 309-324.
- 15 Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**:1349.
- 20 Frigerio L, Vitale A, Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM (1998) Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J Biol Chem* 273:14194-14199

Fang LY, Gross PR, Chen CH, Lillis M (1992) Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. Plant Mol Biol. **18**(6):1185-7

5 Gharti-Chhetri GB, Cherdshewasart W, Dewulf J, Jacobs M, Negrutiu I (1992) Polyethylene glycol-mediated direct gene transfer in *Nicotiana* spp. Physiol. Plant. 85:345-351

Klaus S (2003) Markerfreie transplastome Tabakpflanzen (Marker-free transplastomic tobacco plants). PhD

10 Dissertation, LMU Munich, Faculty of Biology

Miki B, Huang B, Bird S, Kemble R, Simmonds D, Keller W (1989) A procedure for the microinjection of plant cells and protoplasts. Meth. Cell Science **12**:139-144

15

Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rouselle P, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasm hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. **191**: 244-250

20 Schnorf M, Neuhaus-Url G, Galli A, Iida S, Potrykus I, Neuhaus G (1991) An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis. Transgen. Res. **1**:23- 30

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Manag Sci. **61**(3):246-57.

- 5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.
- 10 La invención descrita de manera ilustrativa en la presente se puede poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se describen específicamente en la presente. Por lo tanto, por ejemplo, los términos «que comprende», «que
- 15 incluye», «que contiene», etc., se deberán leer en sentido amplio y de modo no taxativo. Además, los términos y expresiones utilizados en la presente han sido usados como términos de descripción y no de limitación y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún
- 20 equivalente de las características que se muestran y describen o partes de estas. Se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

Por lo tanto, se debería entender que, pese a que la presente invención fue descrita específicamente mediante modalidades preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación, mejora y variación de la invención descrita, y que se considera que dichas modificaciones, mejoras y variaciones se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos que se proporcionan en la presente son representativos de las modalidades preferidas, son ejemplos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

La invención se ha descrito de forma amplia y genérica en la presente. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos comprendidos dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si el material eliminado se menciona o no específicamente en la presente.

20

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describan en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se describe también en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de

miembros del grupo Markush.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan
5 expresamente en su totalidad mediante referencia, con el mismo alcance que si cada una de estas se incorporara mediante referencia de forma individual. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

10

Se presentan otras modalidades dentro de las siguientes reivindicaciones.

MÉTODOS PARA LA MUTACIÓN DE LOS GENES DE ACETOHIDROXIÁCIDO

SINTASA (AHAS) EN EUPHORBIACEAE

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud
5 provisional estadounidense n.º 62/102,009, presentada el 10
de enero de 2015, y la solicitud provisional estadounidense
n.º 62/102,010, presentada el 10 de enero de 2015, cada una
de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad y de
las cuales se reivindica prioridad.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las plantas y
semillas resistentes a herbicidas y, más específicamente, a
15 mutaciones en la proteína y el gen de acetohidroxiácido
sintasa (AHAS).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La siguiente descripción se proporciona simplemente como
ayuda para comprender la invención y no pretende describir ni
constituir técnica previa de la invención.

La mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*), flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*) y la maleza invasiva ésula (*Euphorbia esula*) se
 5 encuentran dentro de los miembros importantes en términos económicos de la familia Euphorbiaceae. A continuación, figura una lista más completa de los géneros dentro de la familia:

- Género Acalypha L. - hoja cobriza
- 10 Género Adelia L. - espinillo
- Género Alchornea Sw. - achiotillo
- Género Alchorneopsis Müll. Arg. - Macaglia megalocarpa
- Género Aleurites J.R. Forst. & G. Forst. - nuez de la India
- Género Antidesma L. - bignai
- 15 Género Argythamnia P. Br. - arbusto campanilla
- Género Baccaurea Lour. - uva birmana
- Género Bernardia Mill. - oreja de ratón
- Género Bischofia Blume - biscofia
- Género Breynia J.R. Forst. & G. Forst. - árbol de nieve
- 20 Género Caperonia A. St.-Hil. - capirona
- Género Chamaesyce Gray - golondrina
- Género Chrozophora A. Juss. - tornasol
- Género Claoxylon A. Juss. - claoxylon

- Género *Cnidoscolus* Pohl - cnidoscolus
- Género *Codiaeum* Juss. - crotón de jardín
- Género *Croton* L. - crotón
- Género *Dalechampia* L. - granadilla
- 5 Género *Ditrysinia* Raf. - *Sebastiania fructicosa*
- Género *Dittia* Griseb. - jaboncillo
- Género *Drypetes* Vahl - drypetes
- Género *Euphorbia* L. - cardón
- Género *Excoecaria* L.
- 10 Género *Flueggea* Willd. - tamujo
- Género *Garcia* Rohr
- Género *Glochidion* J.R. Forst. & G. Forst. - glochidion
- Género *Gymnanthes* Sw. - yaití
- Género *Hevea* Aubl. - árbol del caucho
- 15 Género *Hippomane* L. - árbol de la muerte
- Género *Hura* L. - jabillo
- Género *Hyeronima* Allemao - pilón
- Género *Jatropha* L. - jatrofa
- Género *Leptopus* Decne. - coralillo
- 20 Género *Macaranga* Thouars - macaranga
- Género *Mallotus* Lour. - mallotus
- Género *Manihot* Mill. - mandioca
- Género *Margaritaria* L. f. - margaritaria

- Género *Melanolepis* Rchb. f. & Zoll.
- Género *Mercurialis* L. - mercurial
- Género *Micrandra* Benth. - carapacho
- Género *Microstachys* Juss. - sebastiania
- 5 Género *Pedilanthus* Neck. ex Poit. - pedilanto
- Género *Pera* Mutis - sapito
- Género *Phyllanthus* L. - filanto
- Género *Reutealis* Airy Shaw - nogal de la India
- Género *Reverchonia* A. Gray - reverchonia arenaria
- 10 Género *Ricinodendron* Müll. Arg. - ricinodendron
- Género *Ricinus* L. - ricino
- Género *Sapium* Jacq. - palo leche
- Género *Sauropus* Blume - sauropus
- Género *Savia* Willd. - savia
- 15 Género *Sebastiania* Spreng. - *Sebastiania fructicosa*
- Género *Stillingia* Garden ex L. - stillingia
- Género *Tetracarpidium* Pax - maní del Inca
- Género *Tetracoccus* Engelm. ex Parry - tetracoccus
- Género *Tragia* L. - tragia ramosa
- 20 Género *Triadica* Loureiro - árbol de sebo
- Género *Vaupesia* R.E. Schult. - vaupesia
- Género *Vernicia* Lour. - vernicia montana

Los beneficios de las plantas tolerantes a herbicidas son conocidos. Por ejemplo, las plantas tolerantes a herbicidas pueden reducir la necesidad de labranza para controlar las malezas, lo que reduce de manera eficaz la erosión del suelo.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

La descripción se refiere, en parte, a ácidos nucleicos de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae mutados y
10 las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos mutados. La descripción también se refiere, en parte, a plantas, células y semillas de mandioca que comprenden estos ácidos nucleicos mutados y proteínas.

15 En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 376 (que se denomina
20 en la presente mutación D376A). La numeración de los residuos y, por lo tanto, la posición de la mutación en ácido aspártico 376, se presenta con respecto a la numeración del residuo *Arabidopsis*. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae

es mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el ácido nucleico

5 aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, la proteína de

10 acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae que comprende la mutación D376A es resistente a la inhibición mediante un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona,

15 sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea.

20

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que contiene un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae con una

mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea.

En otro aspecto, se proporciona una planta con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen

codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En otro aspecto, se proporciona una planta con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde la planta es resistente a un herbicida que inhibe AHAS, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot* 5 *esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde 15 a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, la planta es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, 20 el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas

modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea. En algunas modalidades, la planta es una mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, la planta no es transgénica.

- 10 En un aspecto, se proporciona una semilla con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En otro aspecto, se proporciona una
- 15 semilla con un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde la semilla es de una planta de Euphorbiaceae que es resistente a un herbicida que inhibe AHAS, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales
- 20 corresponde a una mutación D376A. En algunas modalidades, la Euphorbiaceae es mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de

Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, el gen codifica una proteína que tiene una o más mutaciones, una de las cuales corresponde a una mutación de ácido aspártico a alanina en la posición 364 de la SEQ ID NO: 1, donde la SEQ ID NO: 1 representa una secuencia proteica de AHAS de mandioca. En algunas modalidades, la semilla es de una planta de Euphorbiaceae que es resistente a la aplicación de al menos un herbicida que inhibe AHAS. En algunas modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de imidazolinona. En algunas modalidades, el herbicida es un herbicida de sulfonilurea. En algunas modalidades, la semilla es de una mandioca (*Manihot esculenta*), semilla de ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), piñón de tempate (*Jatropha curcas*) o flor de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). En algunas modalidades, la semilla es de una planta de Euphorbiaceae que no es transgénica.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una planta de Euphorbiaceae resistente a herbicidas mediante la

introducción en una célula vegetal de Euphorbiaceae de una oligonucleobase de reparación génica (GRON) con una mutación dirigida en un gen de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) para producir una célula vegetal con un gen de AHAS que expresa

5 una proteína de AHAS con una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A; e identificar una célula vegetal de Euphorbiaceae modificada de este modo pero que tiene un crecimiento y actividad catalítica sustancialmente normales en comparación

10 con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente en presencia de un herbicida que inhibe AHAS; y regenerar una planta de Euphorbiaceae resistente a herbicida no transgénica que tiene un gen de AHAS mutado de dicha célula vegetal. En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la

15 resistencia a herbicidas de una planta mediante: (a) cruce de una primera planta de Euphorbiaceae con una segunda planta de Euphorbiaceae, donde la primera planta comprende un gen de acetohidroxiácido sintasa de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína con una mutación en una o más

20 posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A; (b) análisis de una población resultante del cruce para determinar un aumento de la resistencia a herbicidas de AHAS; (c) selección de un miembro resultante

del cruce con una mayor resistencia a herbicidas de AHAS; y

(d) producción de semillas resultantes del cruce. En algunas modalidades, se produce una semilla híbrida a través de cualquiera de los métodos anteriores. En algunas modalidades,

5 se cultivan las plantas a partir de semillas producidas a través de cualquiera de los métodos anteriores. En otro aspecto, se proporciona un método para controlar las malezas en un campo que contiene plantas mediante la aplicación de una cantidad eficaz de al menos un herbicida que inhibe AHAS

10 a un campo que contiene dichas malezas y plantas, donde la planta tiene un gen de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de Euphorbiaceae, donde el gen codifica una proteína que tiene una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A. En algunas

15 modalidades, el herbicida que inhibe AHAS se selecciona del grupo que consiste en herbicidas de: imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato, sulfonilamino-carboniltriazolinona y mezclas de estos. En otras modalidades, el herbicida que inhibe AHAS es un

20 herbicida de imidazolinona. En otras modalidades, el herbicida que inhibe AHAS es un herbicida de sulfonilurea.

En los aspectos descritos en la presente, la mutación D376A

puede combinarse con una o más mutaciones adicionales en la secuencia proteica. A modo de ejemplo, dichas mutaciones pueden incluir una o más de una sustitución de serina a treonina en una posición que corresponde a la posición 653, una sustitución de serina a asparagina en una posición que corresponde a la posición 653, una sustitución de alanina a valina en una posición que corresponde a la posición 205, una sustitución de alanina a ácido aspártico en una posición que corresponde a la posición 205, una sustitución de arginina a triptófano en una posición que corresponde a la posición 577, en cada caso, la numeración de la posición se describe con respecto a la numeración del residuo *Arabidopsis*.

La expresión «ácido nucleico» o «secuencia de ácido nucleico» se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y a fragmentos o partes de estos, que pueden ser de cadena simple o doble, y que representan la cadena sentido o antisentido. Un ácido nucleico puede incluir ADN o ARN y puede ser de origen natural o sintético. Por ejemplo, un ácido nucleico puede incluir ARNm o ADNc. Un ácido nucleico puede incluir un ácido nucleico que se ha amplificado (por ejemplo, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa). La convención «NTwt###NTmut» se utiliza para indicar una

mutación que produce el nucleótido de tipo silvestre NTwt en la posición ### en el ácido nucleico que se está reemplazando con NTmut mutante. El código de una letra para los nucleótidos es según se describe en la tabla 1, sección 2422

5 del Manual de Procedimiento del examen en materia de Patentes de la Oficina de Patentes de Estados Unidos. En este sentido, la designación de nucleótidos «R» significa purina como guanina o adenina, «Y» significa pirimidina como citosina o timina (uracilo en el caso de ARN); «M» significa adenina o

10 citosina; «K» significa guanina o timina; y «W» significa adenina o timina.

Un «gen» se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias codificantes y de control necesarias para la

15 producción de un ARN, que puede tener una función no codificante (por ejemplo, un ARN ribosómico o de transferencia) o que puede incluir un polipéptido o un precursor de polipéptidos. El ARN o el polipéptido se pueden codificar mediante una secuencia codificante de longitud

20 completa o mediante cualquier parte de la secuencia codificante, siempre que se mantenga la actividad o la función deseada. Como se usa en la presente, la expresión «gen de AHAS» se refiere a un gen que tiene 70 %; 75 %; 80 %;

85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o 100 % de identidad con un gen de AHAS de Euphorbiaceae, por ejemplo, la secuencia génica de la mandioca (*Manihot esculenta*) de la SEQ ID NO: 2. En determinadas modalidades, el gen de AHAS tiene
5 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. En cada caso, el gen puede comprender una mutación en la secuencia de nucleótidos que genera una sustitución en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a
10 una mutación W574S.

«Secuencia codificante» se refiere a una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte de este, que se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm para y/o
15 el polipéptido o un fragmento de este. Las secuencias codificantes incluyen exones en transcripciones de ARN primarias inmaduras o un ADN genómico, que se unen por la maquinaria bioquímica de las células para proporcionar un ARNm maduro. La cadena antisentido es el complemento de dicho
20 ácido nucleico y la secuencia codificante se puede deducir de allí.

«Secuencia no codificante» se refiere a una secuencia de un

ácido nucleico o su complemento, o una parte de este, que no se transcribe en el aminoácido *in vivo*, o donde el ARNt no interactúa para colocar o intentar colocar un aminoácido. Las secuencias no codificantes incluyen secuencias de intrones en
5 ADN genómico o transcripciones de ARN primario inmaduro y secuencias asociadas con genes como promotores, potenciadores, silenciadores, etc.

Una nucleobase es una base, que en determinadas modalidades
10 preferidas es una purina, pirimidina o un derivado o análogo de estas. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un resto de pentosafuranosilo, por ejemplo, una ribosida o una 2'-desoxirribosa opcionalmente sustituidas. Los nucleósidos pueden estar unidos por uno de diversos restos de enlace, que
15 pueden contener fósforo o no. Los nucleósidos que están unidos por enlaces fosfodiéster insustituídos se denominan nucleótidos. El término «nucleobase», según se utiliza en la presente, incluye nucleobases de péptidos, las subunidades de ácidos nucleicos de péptidos y nucleobases de morfolina, así
20 como nucleósidos y nucleótidos.

Una oligonucleobase es un polímero que comprende nucleobases; preferentemente, al menos una parte de las cuales se puede

hibridar mediante emparejamiento de bases Watson-Crick con un ADN que tiene la secuencia complementaria. Una cadena de oligonucleobases puede tener un extremo 5' y 3' único, que son las nucleobases finales del polímero. Una cadena de oligonucleobases particular puede contener nucleobases de todos los tipos. Un compuesto de oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobases que pueden ser complementarias y se pueden hibridar mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las nucleobases tipo ribo incluyen nucleobases que contienen pentosafuranosilo en donde el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidroxilo, alquilo o halógeno. Las nucleobases tipo desoxirribo son nucleobases diferentes de las nucleobases tipo ribo e incluyen todas las nucleobases que no contienen un resto de pentosafuranosilo.

En determinadas modalidades, una cadena de oligonucleobases puede incluir ambas cadenas de oligonucleobases y segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobases. Una cadena de oligonucleobases puede tener un extremo 3' y un extremo 5' y cuando una cadena de oligonucleobases es coextensiva con una cadena, los extremos 3' y 5' de la cadena también son los extremos terminales 3' y 5' de la cadena.

La expresión «oligonucleobase de reparación génica», como se utiliza en la presente, denota oligonucleobases que incluyen oligonucleótidos dúplex mixtos, moléculas que no contienen nucleótidos, oligodesoxinucleótidos de cadena simple y otras
5 moléculas de reparación génica.

«Aislado», cuando se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido tal como ARN, ADN o un polímero mixto), se refiere a un ácido nucleico que está separado de
10 una parte sustancial del genoma en el cual aparece naturalmente y/o está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a dicho ácido nucleico. Por ejemplo, cualquier ácido nucleico que se ha producido de forma sintética (por ejemplo, por
15 condensación de base en serie) se considera aislado. Asimismo, los ácidos nucleicos que se expresan de forma recombinante, que se clonan, se producen por una reacción de extensión del cebador (por ejemplo, PCR) o que se retiran de otro modo de un genoma también se consideran aislados.

20

Una «secuencia de aminoácidos» se refiere a un polipéptido o una secuencia proteica. La convención «AAwt###AAmut» se utiliza para indicar una mutación que produce el AAwt de

aminoácido de tipo silvestre en la posición ### en el polipéptido que se está reemplazando con AAmut mutante.

«Complemento» se refiere a la secuencia complementaria de un
5 ácido nucleico de acuerdo con las normas de emparejamiento de Watson/Crick estándar. Una secuencia complementaria también puede ser una secuencia de ARN complementaria de la secuencia de ADN o su secuencia complementaria y también puede ser un ADNc.

10

«Sustancialmente complementario» se refiere a que dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. El entendido en la técnica comprenderá que no es necesario que las secuencias sustancialmente complementarias
15 se hibriden a lo largo de la longitud completa.

Tal como se usa en la presente, el término «codón» se refiere a una secuencia de tres nucleótidos adyacentes (ARN o ADN) que constituyen el código genético que determina la inserción
20 de un aminoácido específico en una cadena de polipéptidos durante la síntesis de proteínas o la señal para detener la síntesis de proteínas. El término «codón» también se utiliza para hacer referencia a las secuencias correspondientes (y

complementarias) de tres nucleótidos en el ARN mensajero en las que se transcribe el ADN original.

Como se usa en la presente, la expresión «proteína de AHAS»
5 se refiere una proteína que tiene 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o 100 % de identidad con una proteína de AHAS de Euphorbiaceae, por ejemplo, la secuencia proteica de la mandioca (*Manihot esculenta*) de la SEQ ID NO: 1. En determinadas modalidades, la proteína de AHAS tiene 70
10 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En cada caso, el gen puede comprender una mutación en una o más posiciones de aminoácidos, una de las cuales corresponde a una mutación D376A.

15

La expresión «tipo silvestre» se refiere a un gen o un producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es aquel que se observa con
20 mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma «normal» o «de tipo silvestre» del gen. «Tipo silvestre» también se puede referir a la secuencia en una posición o posiciones de nucleótidos

específicas, o la secuencia en una posición o posiciones de codones particulares, o la secuencia en una posición o posiciones de aminoácidos particulares.

5 Según se utiliza en la presente, «mutante» o «modificado» se refiere a un ácido nucleico o proteína que presenta modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características modificadas) cuando se lo compara con el gen o producto génico de tipo silvestre. «Mutante» o
10 «modificado» también se refiere a la secuencia en una posición o posiciones de nucleótidos específicas, o la secuencia en una posición o posiciones de codones particulares, o la secuencia en una posición o posiciones de aminoácidos particulares que muestra modificaciones en la
15 secuencia y/o en las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de tipo silvestre.

Una «mutación» pretende comprender al menos una única
20 variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico o una única variación de aminoácidos en un polipéptido con respecto a una secuencia normal o secuencia de tipo silvestre. Una mutación puede incluir una sustitución, una

eliminación, una inversión o una inserción.

Tal como se usa en la presente, el término «homología» se refiere a la similitud de secuencia entre las proteínas y el
5 ADN. El término «homología» u «homólogo» se refiere a un grado de identidad. Puede haber homología parcial u homología completa. Una secuencia parcialmente homóloga es la que tiene menos de 100 % de identidad de secuencia en comparación con otra secuencia.

10

«Heterocigoto» se refiere a tener distintos alelos en uno o más loci genéticos en los segmentos de cromosoma homólogos. Tal como se usa en la presente, «heterocigoto» también se puede referir a una muestra, una célula, una población de
15 células o un organismo en el que se pueden detectar alelos diferentes en uno o más locus genéticos. También se pueden determinar muestras heterocigotas mediante los métodos conocidos en la técnica como, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si un electroferograma de
20 secuenciación muestra dos picos en un único locus y ambos picos tienen aproximadamente el mismo tamaño, la muestra se puede caracterizar como heterocigota. O, si un pico es más pequeño que otro, pero tiene al menos alrededor de 25 % del

tamaño del pico más grande, la muestra se puede caracterizar como heterocigota. En algunas modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 15 % del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 10% del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, el pico más pequeño tiene al menos alrededor de 5 % del tamaño del pico más grande. En otras modalidades, se detecta una cantidad mínima del pico más pequeño.

10

Como se usa en la presente, «homocigoto» se refiere a tener alelos idénticos en uno o más loci genéticos en segmentos de cromosoma homólogos. «Homocigoto» también puede referirse a una muestra, una célula, una población celular o un organismo en el cual se pueden detectar los mismos alelos en uno o más loci genéticos. Se pueden determinar muestras homocigotas mediante los métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, secuenciación de ácido nucleico. Por ejemplo, si un electroferograma de secuenciación muestra un único pico en un locus particular, la muestra se puede denominar «homocigota» con respecto a ese locus.

20

El término «hemicigoto» se refiere a un gen o a un segmento

de gen que aparece solo una vez en el genotipo de una célula o un organismo porque el segundo alelo se elimina. Según se utiliza en la presente, «hemicigoto» también se puede referir a una muestra, una célula, una población de células o un
5 organismo en el cual se puede detectar un alelo en uno o más loci genéticos solo una vez en el genotipo.

La expresión «estado de cigosidad», tal como se usa en la presente, se refiere a una muestra, una población celular o
10 un organismo que aparece como heterocigoto, homocigoto o hemicigoto, según se determina a través de los métodos de prueba conocidos en la técnica y descritos en la presente. La expresión «estado de cigosidad de un ácido nucleico» significa determinar si la fuente de ácido nucleico aparece
15 como heterocigota, homocigota o hemicigota. El «estado de cigosidad» se puede referir a diferencias en un único nucleótido en una secuencia. En algunos métodos, el estado de cigosidad de una muestra con respecto a una mutación única se puede categorizar como homocigoto de tipo silvestre,
20 heterocigoto (es decir, un alelo de tipo silvestre y un alelo mutante), mutante homocigoto o hemicigoto (es decir, una copia única del alelo mutante o de tipo silvestre).

Tal como se usa en la presente, el término «**RTDS**» se refiere al Rapid Trait Development System™ (RTDS™), desarrollado por Cibus. **RTDS** es un sistema de modificación génica específica del sitio que es eficaz para realizar cambios precisos en una
5 secuencia génica sin la incorporación de genes externos o secuencias de control.

La expresión «alrededor de», tal como se usa en la presente, significa en términos cuantitativos más o menos 10 %. Por
10 ejemplo, «alrededor de 3 %» abarcaría 2,7-3,3 % y «alrededor de 10 %» abarcaría 9-11 %. Además, cuando «alrededor de» se utiliza en la presente en combinación con un término cuantitativo, se entiende que además del valor más o menos 10 %, también se contempla y se describe el valor exacto del
15 término cuantitativo. Por ejemplo, la expresión «alrededor de 3 %» contempla, describe e incluye, de forma expresa, exactamente el 3 %.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

La Figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína de AHAS de mandioca (*Manihot esculenta*) de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La posición de D376 se muestra en

cursiva y subrayado. Como se menciona en la presente, la convención de numeración de residuos se basa en la de *Arabidopsis*.

5 La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de AHAS de mandioca (*Manihot esculenta*) de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos de AHAS de
10 mandioca (*Manihot esculenta*) que comprende una mutación D376A (SEQ ID NO: 5).

La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos de AHAS I de
15 *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 4). La posición de D376 se muestra en cursiva y subrayado.

La Figura 5 muestra el crecimiento en placas de cultivo de células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS
20 de tipo silvestre y mutantes en presencia y ausencia del herbicida IM o TP, que incluyen el gen mutante D376A.

La Figura 6A muestra curvas de eliminación de herbicida IM

para células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS de tipo silvestre y mutantes, incluyendo el gen D376A mutante.

5 La Figura 6B muestra curvas de eliminación de herbicida TP para células bacterianas CHI que expresan varias proteínas de AHAS de tipo silvestre y mutantes, incluyendo el gen D376A mutante.

10 La Figura 7A muestra la estructura del plásmido pTD1315.

La Figura 7B muestra la estructura de los plásmidos pTD1541 y pTD1542.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15

Se proporcionan composiciones y métodos relacionados en parte con el direccionamiento satisfactorio de genes de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en Euphorbiaceae usando, por ejemplo, la tecnología Rapid Trait Development System (**RTDS**[™])

20 desarrollada por Cibus. Combinadas o solas, las plantas que contienen cualquiera de las mutaciones descritas en la presente pueden formar la base de nuevos productos resistentes a herbicidas. También se proporcionan semillas

producidas a partir de las plantas mutadas, donde los genes de AHAS son homocigotos o heterocigotos para las mutaciones. Las mutaciones descritas en la presente se pueden encontrar combinadas con cualquier otra mutación conocida o con
5 mutaciones que se descubran en el futuro.

RTDS se basa en la modificación de un gen diana mediante el uso del sistema de reparación génica propio de la célula para modificar específicamente la secuencia génica in situ y no
10 insertar ADN foráneo y secuencias de control de expresión génica. Este procedimiento realiza un cambio preciso en la secuencia genética, mientras que el resto del genoma permanece incambiado. Al contrario de las GMO transgénicas convencionales, no hay integración del material genético
15 foráneo y tampoco permanece ningún material genético foráneo en la planta. Los cambios en la secuencia genética introducidos por **RTDS** no se insertan de forma aleatoria. Dado que los genes afectados permanecen en su ubicación natural, no se produce un patrón de expresión aleatorio, incontrolado
20 o adverso.

El **RTDS** que realiza este cambio es un oligonucleótido sintetizado por medios químicos que puede estar compuesto

tanto por bases de ARN modificado como ADN, así como otros restos químicos, y se diseña para hibridarse en la ubicación del gen diana para crear un par de bases no emparejadas. Este par de bases no emparejadas actúa como una señal para atraer el sistema de reparación génica natural de la propia célula a ese sitio y corregir (reemplazar, insertar o eliminar) los nucleótidos designados dentro del gen. Una vez que se completa el proceso de corrección, la molécula de **RTDS** se degrada y el gen recién modificado o reparado se expresa con los mecanismos de control endógenos normales de dicho gen.

La introducción de genes mutantes exógenos en las plantas está bien documentada. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,545,060 se refiere al aumento de la resistencia de una planta a glifosato mediante la introducción en el genoma de la planta de un gen que codifica una variante de EPSPS que tiene al menos una mutación que vuelve a la enzima más resistente a su inhibidor competitivo, es decir, glifosato.

Los ejemplos de algunas de las mutaciones en los genes de AHAS son conocidos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,094,606.

Mediante la mutagénesis química, se encontró una mutación en el gen de AHAS I con menor expresión. Esta mutación es conocida como PM-1 (una mutación en una posición equivalente conocida como 653 en función de la secuencia de aminoácidos de acetolactato sintasa (ALS) de *Arabidopsis*, un cambio de aminoácidos de serina a asparagina, que se codifican respectivamente de la siguiente manera - AGT a AAT). Se encontró otra mutación en el gen de AHAS III con mayor expresión, conocido como PM-2 . Estas dos mutaciones, PM-1 y PM-2, se combinan en una variedad comercial de colza conocida como colza Clearfield (Tan et ál., 2005).

A efectos ilustrativos, las mutaciones en cuestión se ilustran en mandioca (*Manihot esculenta*). Las composiciones y métodos también comprenden genes de AHAS mutantes de otras especies de Euphorbiaceae (parálogos). Sin embargo, debido a las variaciones en los genes de AHAS de diferentes especies, la cantidad de residuo de aminoácidos que se cambiará en una especie puede ser diferente en otra especie. Sin embargo, los entendidos en la técnica pueden identificar fácilmente la posición análoga mediante homología de secuencia.

Las composiciones y métodos se refieren en parte a mutaciones

en un gen de AHAS que vuelven a una planta resistente o tolerante a un herbicida de la familia de herbicidas que inhiben AHAS o ALS. Las composiciones y métodos también se refieren al uso de una oligonucleobase de reparación génica para realizar una mutación deseada en las secuencias cromosómicas o episomales de una planta en el gen que codifica una proteína de AHAS. La proteína mutada, que mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, permite mayor resistencia o tolerancia de la planta a un herbicida de la familia que inhibe AHAS, y permite el crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células en comparación con la planta de tipo silvestre independientemente de la presencia o ausencia del herbicida.

Las composiciones y métodos también se refieren a una célula vegetal no transgénica en la cual se ha mutado un gen de AHAS, una planta no transgénica regenerada a partir de esta, así como una planta resultante de un cruce utilizando una planta no transgénica regenerada con una planta que tiene una mutación en un gen de AHAS diferente o con una planta que tiene un gen de EPSPS mutado, por ejemplo.

Las imidazolinonas se encuentran entre las cinco familias

químicas de herbicidas que inhiben AHAS. Las otras cuatro familias son sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos y sulfonilamino-carboniltriazolinonas (Tan et ál., 2005).

5

También se proporciona una planta o célula vegetal transgénica o no transgénica que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS, por ejemplo, como se describe en la presente. En determinadas modalidades, la planta o célula

10 vegetal que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS tiene mayor resistencia o tolerancia a un miembro inhibidor de AHAS. En determinadas modalidades, la planta o célula vegetal que tiene una o más mutaciones en el gen de AHAS puede presentar un crecimiento o un desarrollo

15 sustancialmente normal de la planta, sus órganos, tejidos o células, en comparación con la célula o planta de tipo silvestre correspondiente. En aspectos y modalidades particulares, se proporcionan plantas no transgénicas con una mutación en un gen de AHAS, por ejemplo, como se describe en

20 la presente, que, en determinadas modalidades, presenta una mayor resistencia o tolerancia a un miembro de la familia de herbicidas que inhiben AHAS y puede presentar un crecimiento o desarrollo sustancialmente normal de la planta, sus

órganos, tejidos o células, en comparación con la planta o célula de tipo silvestre correspondiente, es decir, en presencia de uno o más herbicidas, tales como, por ejemplo, una imidazolinona y/o sulfonilurea, la proteína de AHAS
5 mutada tiene sustancialmente la misma actividad catalítica en comparación con la proteína de AHAS de tipo silvestre.

Además, se proporcionan métodos para producir una planta que tiene un gen de AHAS mutado, por ejemplo, que tiene una o más
10 mutaciones como se describe en la presente; preferentemente, la planta mantiene sustancialmente la actividad catalítica de la proteína de tipo silvestre, independientemente de la presencia o ausencia de un herbicida pertinente. En determinadas modalidades, los métodos incluyen introducir en
15 una célula vegetal una oligonucleobase de reparación génica con una o más mutaciones dirigidas en el gen de AHAS (por ejemplo, como se describe en la presente) e identificar una célula, semilla o planta que tenga un gen de AHAS mutado.

20 La oligonucleobase de reparación génica se puede introducir a una célula vegetal mediante cualquier método comúnmente utilizado en la técnica que incluye, de modo no taxativo, microportadores (administración biolística), microfibras,

absorción mediada por polietilenglicol (PEG), electroporación y microinyección.

También se proporcionan métodos y composiciones relacionadas con el cultivo de células mutadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente para obtener una planta que produzca semillas, en adelante una «planta fértil» y la producción de semillas y plantas adicionales a partir de dicha planta fértil.

10

También se proporcionan métodos para controlar de forma selectiva las malezas en un campo, donde el campo comprende plantas con modificaciones en el gen de AHAS descrito y malezas, donde el método comprende la aplicación al campo de un herbicida al cual las plantas se han vuelto resistentes.

15

También se proporcionan mutaciones en el gen de AHAS que otorgan resistencia o tolerancia a un miembro del herbicida pertinente a una planta o donde el gen de AHAS mutado tiene sustancialmente la misma actividad enzimática en comparación con AHAS de tipo silvestre.

20

Oligonucleobases de reparación génica

Los métodos y las composiciones que se describen en la presente se pueden poner en práctica o realizarse con las «oligonucleobases de reparación génica» que tienen las conformaciones y la química que se describen en detalle a continuación. Las «oligonucleobases de reparación génica» que se consideran en la presente también se han descrito en la bibliografía de patentes y científica publicada mediante el uso de otros nombres como «oligonucleobases recombinagénicas»; «oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN»; «oligonucleótidos quiméricos»; «oligonucleótidos dúplex mixtos» (MDON); «oligonucleótidos de ADN y ARN (RDO)»; «oligonucleótidos dirigidos a genes»; «genoplastos»; «oligonucleótidos modificados de cadena simple»; «vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos de cadena simple» (SSOMV); «vectores mutacionales dúplex»; y «vectores mutacionales heterodúplex».

Las oligonucleobases que tienen conformaciones y química descritas en la patente estadounidense n.º 5,565,350 de Kmiec (Kmiec I) y la patente estadounidense n.º 5,731,181 de Kmiec (Kmiec II), que se incorporan a la presente mediante esta referencia, son adecuadas para su uso como «oligonucleobases

de reparación génica» de la invención. Las oligonucleobases de reparación génica en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos cadenas complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos tipo ARN (un «segmento de ARN»),
5 que tienen las bases emparejadas con los nucleótidos tipo ADN de la otra cadena.

Kmiec II describe que los no nucleótidos que contienen bases de purina y pirimidina pueden sustituir a los nucleótidos.
10 Las moléculas de reparación génica adicionales que se pueden usar para la presente invención se describen en las patentes estadounidenses n.º 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
15 en las publicaciones de patentes internacionales n.º WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789, que se incorporan a la presente en su totalidad.

En una modalidad, la oligonucleobase de reparación génica es
20 un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) donde los nucleótidos tipo ARN del oligonucleótido dúplex mixto se vuelven resistentes a la ARNasa mediante el remplazo de 2'-hidroxilo con una funcionalidad fluoro, cloro o bromo o mediante la

colocación de un sustituyente en el 2'-O. Los sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes ilustrados por Kmiec II. Los sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes ilustrados en la patente estadounidense n.º 5.334.711 (Sproat) y los sustituyentes ilustrados en las publicaciones de patente EP 629 387 y EP 679 657 (en su conjunto, las solicitudes de Martin), que se incorporan a la presente mediante referencia. Según se utiliza en la presente, un derivado de 2'-fluoro, cloro o bromo de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido con un sustituyente descrito en las solicitudes de Martin o Sproat se denomina un «ribonucleótido 2'-sustituido». Según se utiliza en la presente, la expresión «nucleótido tipo ARN» significa un 2'-hidroxilo o nucleótido 2'-sustituido que está unido a otros nucleótidos de un oligonucleótido dúplex mixto por un enlace fosfodiéster insustituido o cualquiera de los enlaces no naturales presentados por Kmiec I o Kmiec II. Según se utiliza en la presente, la expresión «nucleótido tipo desoxirribo» significa un nucleótido que tiene un 2'-H que puede estar unido a otros nucleótidos de una oligonucleobase de reparación génica mediante un enlace fosfodiéster insustituido o cualquiera de los enlaces no naturales presentados por Kmiec I o Kmiec II.

En una modalidad particular de la presente invención, la oligonucleobase de reparación génica es un oligonucleótido dúplex mixto (MDON) que está unido solamente mediante enlaces fosfodiéster insustituídos. En modalidades alternativas, el enlace es mediante fosfodiésteres sustituidos, derivados de fosfodiéster y enlaces no basados en fósforo según lo presenta Kmiec II. En aun otra modalidad, cada nucleótido tipo ARN en el oligonucleótido dúplex mixto es un nucleótido 2'-sustituido. Algunas modalidades preferidas particulares de ribonucleótidos 2'-sustituidos son ribonucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxiletiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi. Algunas modalidades más preferidas de ribonucleótidos 2'-sustituidos son nucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi y 2'-aliloxi. En otra modalidad, el oligonucleótido dúplex mixto está unido por enlaces fosfodiéster insustituídos.

20

Si bien los oligonucleótidos dúplex mixtos (MDON) que tienen solo un tipo de nucleótido tipo ARN 2'-sustituido se sintetizan de forma más práctica, los métodos de la invención

se pueden realizar con los oligonucleótidos dúplex mixtos que tienen dos o más tipos de nucleótidos tipo ARN. La función de un segmento de ARN puede no verse afectada por una interrupción provocada por la introducción de un desoxinucleótido entre dos trinucleótidos tipo ARN, en consecuencia, el término segmento de ARN abarca términos como «segmento de ARN interrumpido». Un segmento de ARN ininterrumpido se denomina un segmento de ARN contiguo. En una modalidad alternativa, un segmento de ARN puede contener nucleótidos 2'-OH no sustituidos y resistentes a la ARNasa que alternan. Los oligonucleótidos dúplex mixtos tienen, preferentemente, menos de 100 nucleótidos y, más preferentemente, menos de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. La primera y la segunda cadena presentan emparejamiento de bases Watson-Crick. En una modalidad, las cadenas del oligonucleótido dúplex mixto están unidas mediante enlace covalente con un enlazador, como un hexa, penta o tetranucleótido de cadena simple, de modo que la primera y la segunda cadena sean segmentos de una única cadena de oligonucleótidos que tiene un extremo 3' único y un extremo 5' único. Los extremos 3' y 5' se pueden proteger mediante la adición de un «casquete de horquilla» mediante el cual los nucleótidos terminales 3' y 5' presentan

emparejamiento Watson-Crick con los nucleótidos adyacentes. Se puede colocar, además, un segundo casquete de horquilla en la unión entre la primera y la segunda cadena lejos de los extremos 3' y 5', de modo que se establezca el emparejamiento Watson-Crick entre la primera y la segunda cadena.

La primera y la segunda cadena contienen dos regiones que son homólogas con dos fragmentos del gen diana, es decir, tienen la misma secuencia que el gen diana. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y puede contener uno o más nucleótidos tipo ADN de segmento de ADN de conexión y también puede contener nucleótidos tipo ADN que no se encuentran dentro del segmento de ADN intermedio. Las dos regiones de homología están separadas y cada una es adyacente a una región que tiene una secuencia que difiere de la secuencia del gen diana, denominada «región heteróloga». La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos no emparejados. Los nucleótidos no emparejados pueden ser contiguos o, de manera alternativa, pueden estar separados por uno o dos nucleótidos que son homólogos al gen diana. De manera alternativa, la región heteróloga también puede contener una inserción o uno, dos, tres o cinco o menos nucleótidos. De manera alternativa, la secuencia del

oligonucleótido dúplex mixto puede diferir de la secuencia del gen diana solamente mediante la eliminación de uno, dos, tres o cinco o menos nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto. La longitud y posición de la región heteróloga, en este caso, se considera la longitud de la eliminación, aunque no haya nucleótidos del oligonucleótido dúplex mixto dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos del gen diana que son complementarios a las dos regiones homólogas es idéntica a la longitud de la región heteróloga donde se pretende realizar una o más sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas se separan así en el oligonucleótido dúplex mixto más que sus fragmentos homólogos complementarios en el gen, y lo opuesto se aplica cuando la región heteróloga codifica una eliminación.

Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos dúplex mixtos forman parte de una región homóloga, es decir, una región que es idéntica en secuencia a un fragmento del gen diana, cuyos segmentos juntos contienen, preferentemente, al menos 13 nucleótidos tipo ARN y, preferentemente, entre 16 y 25 nucleótidos tipo ARN o incluso, más preferentemente, 18-22 nucleótidos tipo ARN o, más preferentemente, 20 nucleótidos.

En una modalidad, los segmentos de ARN de las regiones de homología están separados por y adyacentes a, es decir, «conectados por» un segmento de ADN intermedio. En una modalidad, cada nucleótido de la región heteróloga es un
5 nucleótido del segmento de ADN intermedio. Un segmento de ADN intermedio que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido dúplex mixto se denomina un «segmento mutador».

10 En otra modalidad de la presente invención, la oligonucleobase de reparación génica (GRON) es un vector mutacional oligodesoxinucleótido de cadena simple (SSOMV), que se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US00/23457, patente estadounidense n.º 6,271,360,
15 6,479,292 y 7,060,500 que se incorporan en su totalidad mediante referencia. La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales descritos en las patentes estadounidenses n.º 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,888,983; 5,795,972; 5,780,296; 5,945,339;
20 6,004,804 y 6,010,907 y en la publicación internacional n.º WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789. La secuencia de los SSOMV contiene dos regiones que son homólogas a la secuencia diana separada por una región

que contiene la modificación genética deseada denominada región mutante. La región mutante puede tener una secuencia con la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia diana, pero con una
5 secuencia distinta. Dicha región mutante puede provocar una sustitución. De manera alternativa, las regiones homólogas en el 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. Dicho SSOMV
10 provoca una eliminación del gen diana de los nucleótidos del SSOMV que están ausentes. Por último, la secuencia del gen diana, que es idéntica a las regiones homólogas, puede ser adyacente en el gen diana, pero estar separada por uno, dos o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Dicho SSOMV
15 provoca una inserción en la secuencia del gen diana.

Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que se unen mediante enlaces fosfodiéster no modificados, salvo que la unión internucleotídica del extremo 3' y/o 5' o, de manera
20 alternativa, los dos enlaces internucleotídicos del extremo 3' y/o 5' puedan ser un fosforotioato o fosfoamidato. Según se utiliza en la presente, un enlace internucleótido es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace

entre el nucleótido de extremo 3' o el nucleótido de extremo 5' y un sustituyente de bloqueo. En una modalidad específica, la longitud del SSOMV es de entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología son, por
5 consiguiente, la longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deberían tener, cada una, longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

10 El SSOMV se puede diseñar para ser complementario de la cadena codificante o no codificante del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una base única, se prefiere que el nucleótido mutador y el nucleótido diana sean una pirimidina. En la medida en que sea compatible con el
15 logro del resultado funcional deseado, se prefiere que el nucleótido mutador y el nucleótido diana en la cadena complementaria sean pirimidinas. Se prefieren, en particular, SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido mutador C o T que no esté emparejado,
20 respectivamente, con un nucleótido C o T en la cadena complementaria.

Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un

sustituyente de bloqueo 5' que está unido a los carbonos de extremo 5' a través de un enlazador. La química del enlazador no es fundamental más allá de su longitud, que, preferentemente, debería ser de al menos 6 átomos de longitud y el enlazador debería ser flexible. Se pueden utilizar diversos sustituyentes no tóxicos como biotina, colesterol u otros esteroides o una tinta fluorescente catiónica no intercalante. Los reactivos particularmente preferidos para hacer SSOMV son los reactivos comercializados como Cy3TM y Cy5TM por Glen Research, Sterling Va. (ahora GE Healthcare), que son fosforamiditas bloqueadas que tras la incorporación en un oligonucleótido producen tintas de indomonocarbocianina e indodicarbocianina 3,3,3',3'-tetrametil N,N'-isopropil sustituidas, respectivamente. Se prefiere particularmente el Cy3. Cuando la indocarbocianina es N-oxialquilo sustituida, se puede unir de forma conveniente al extremo 5' del oligodesoxinucleótido como un fosfodiéster con un fosfato de extremo 5'. La química del enlazador de tinta entre la tinta y el oligodesoxinucleótido no es fundamental y se elige por practicidad de síntesis. Cuando se utiliza la fosforamidita de Cy3 disponible a nivel comercial como se indica, la modificación en 5' resultante consiste en un sustituyente de bloqueo y un enlazador juntos que son un N-hidroxipropilo,

N'-fosfatidilpropilo 3,3,3',3'-tetrametilo
indomonocarbocianina.

En una modalidad preferida, la tinta de indocarbocianina se
5 encuentra tetra sustituida en las posiciones 3 y 3' de los
anillos de indol. Sin limitarse a ninguna teoría, estas
sustituciones evitan que la tinta sea una tinta intercalante.
La identidad de los sustituyentes en estas posiciones no es
fundamental. El SSOMV puede tener, además, un sustituyente de
10 bloqueo en 3'. Nuevamente, la química del sustituyente de
bloqueo en 3' no es fundamental.

Las mutaciones descritas en la presente también se pueden
obtener por mutagénesis (aleatoria, somática o dirigida) y
15 otras tecnologías de edición o recombinación de ADN que
incluyen, de modo no taxativo, direccionamiento génico
utilizando recombinación homóloga específica del sitio
mediante nucleasas de dedos de cinc.

20 Aumento de la eficacia de la modificación génica dirigida

Los ácidos nucleicos que dirigen cambios específicos al
genoma se pueden combinar con diversos enfoques para

potenciar la disponibilidad de los componentes de los sistemas de reparación naturales presentes en las células a las que se dirige la modificación. Estos enfoques incluyen, de modo no taxativo, el uso de nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés) o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés). Véanse, por ejemplo, WO2014/144951 y WO2014/144951, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Las TALEN son nucleasas que se pueden dirigir, que se utilizan para inducir interrupciones de cadena simple y doble en sitios de ADN específicos, que luego se reparan mediante mecanismos que se pueden aprovechar para crear alteraciones en la secuencia en el sitio de escisión. El bloque de construcción fundamental que se utiliza para modificar genéticamente la región de unión al ADN de TALEN es un dominio de repetición muy conservado derivado de TALE de origen natural codificadas por proteobacteria *Xanthomonas* spp. La unión al ADN mediante TALEN es mediada por matrices de repeticiones de 33-35 aminoácidos muy conservadas flanqueadas por dominios derivados de TALE adicionales en los extremos amino y carboxi de las repeticiones. Estas

repeticiones de TALE se unen específicamente a una única base de ADN, cuya identidad se determina mediante dos residuos hipervariables que se encuentran comúnmente en las posiciones 12 y 13 de la repetición, con correspondencia de la cantidad de repeticiones en una matriz a la longitud del ácido nucleico diana deseado, y elección de la identidad de la repetición para que coincida con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El ácido nucleico diana tiene preferentemente entre 15 y 20 pares de bases para maximizar la selectividad del sitio diana. La escisión del ácido nucleico diana se produce comúnmente a 50 pares de bases de la unión a TALEN. En la técnica se han descrito programas informáticos para el diseño de sitios de reconocimiento de TALEN. Véase, por ejemplo, Cermak et ál., *Nucleic Acids Res.* julio de 2011; 39(12): e82. Una vez que se ha diseñado para que coincida con la secuencia diana deseada, las TALEN se pueden expresar de forma recombinante e introducirse en protoplastos como proteínas exógenas, o expresarse a partir de un plásmido dentro del protoplasto.

20

De manera similar, el sistema CRISPR/Cas se puede usar para la edición génica. Al suministrar Cas9 u otra proteína asociada a CRISPR y ARN de guía apropiados (ARNg) a una

célula, el genoma del organismo puede cortarse en cualquier lugar deseado. El complejo ARNg/Cas9 se recluta a la secuencia diana mediante emparejamiento de bases entre la secuencia de ARNg y el complemento con la secuencia diana en el ADN genómico. Para la unión satisfactoria de Cas9, la secuencia diana genómica también debe contener la secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) correcto inmediatamente después de la secuencia diana. La unión del complejo gRNA/Cas9 localiza la Cas9 a la secuencia diana genómica de manera que la Cas9 de tipo silvestre pueda cortar ambas cadenas de ADN para provocar una ruptura de cadena doble (DSB, por sus siglas en inglés). Cas9 cortará 3-4 nucleótidos corriente arriba de la secuencia de PAM. Una DSB se puede reparar mediante una de dos vías de reparación generales: (1) la vía de reparación de ADN de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o (2) la vía de reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés). La vía de HDR utiliza una plantilla de reparación para fijar la DSB. La HDR copia fielmente la secuencia de la plantilla de reparación a la secuencia diana cortada. Se pueden introducir cambios de nucleótidos específicos en un gen dirigido mediante el uso de HDR con una plantilla de reparación para editar un gen.

Otra clase de endonucleasas artificiales son las meganucleasas modificadas genéticamente. Las endonucleasas homing modificadas genéticamente se generan mediante la
5 modificación de la especificidad de las endonucleasas homing existentes. En un enfoque, se introducen variaciones en la secuencia de aminoácidos de las endonucleasas homing de origen natural y luego se evalúan las endonucleasas homing modificadas genéticamente resultantes para seleccionar
10 proteínas funcionales que escinden un sitio de unión diana. En otro enfoque, las endonucleasas homing quiméricas se modifican genéticamente mediante la combinación de los sitios de reconocimiento de dos endonucleasas homing distintas para crear un nuevo sitio de reconocimiento compuesto por un medio
15 sitio de cada endonucleasa homing.

Administración de oligonucleobases de reparación génica en células vegetales

20 Se puede utilizar cualquier método comúnmente conocido utilizado para transformar una célula vegetal para administrar las oligonucleobases de reparación génica. A continuación, se enumeran métodos ilustrativos.

Microportadores y microfibras

El uso de microportadores metálicos (microesferas) para
5 introducir fragmentos grandes de ADN en las células vegetales
con paredes celulares de celulosa mediante penetración de
proyectiles es conocido por los expertos en la técnica
pertinente (de ahora en adelante, administración biolística).
Las Patentes estadounidenses n.º 4,945,050; 5,100,792 y
10 5,204,253 describen técnicas generales para seleccionar
microportadores y dispositivos para proyectarlos.

Las condiciones específicas para el uso de microportadores en
los métodos de la presente invención se describen en la
15 publicación internacional WO 99/07865. En una técnica
ilustrativa, se agregan microportadores helados (60 mg/mL),
oligonucleótidos dúplex mixtos (60 mg/mL), CaCl_2 2,5 M y
espermidina 0,1 M en ese orden; la mezcla se agita
suavemente, por ejemplo, con vórtex, durante 10 minutos y
20 luego se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos,
luego de lo cual los microportadores se diluyen en 5
volúmenes de etanol, se centrifugan y resuspenden en etanol
al 100 %. Se pueden obtener buenos resultados con una

concentración en la solución adherente de 8-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de microportadores, 14-17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligonucleótido dúplex mixto, CaCl_2 1,1-1,4 M y 18-22 mM de espermidina. Se observaron resultados óptimos en las condiciones de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de microportadores, 16,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligonucleótido dúplex mixto, CaCl_2 1,3 M y 21 mM de espermidina.

También se pueden introducir oligonucleobases de reparación génica en las células vegetales para la práctica de la presente invención utilizando microfibras para penetrar la pared celular y la membrana celular. La patente estadounidense n.º 5.302.523 de Coffee *et ál.* describe el uso de 30 veces 0.5 μm y 10 veces 0.3 μm de fibras de carburo de silicio para facilitar la transformación de los cultivos de maíz en suspensión de Black Mexican Sweet. Se puede utilizar cualquier técnica mecánica que se pueda utilizar para introducir ADN para la transformación de una célula vegetal mediante el uso de microfibras para administrar las oligonucleobases de reparación génica para la transmutación.

20

A continuación, se describe una técnica ilustrativa para la administración de microfibras de una oligonucleobase de reparación génica: Se suspenden microfibras estériles (2 μg)

en 150 μ L de medio de cultivo vegetal con alrededor de 10 μ g de un oligonucleótido dúplex mixto. Se deja asentar un cultivo de suspensión y se agitan en vórtex en volúmenes iguales de células concentradas y la suspensión de
5 nucleótidos/fibras estériles durante 10 minutos y se colocan en placas. Los medios selectivos se aplican de inmediato o con un retraso de hasta alrededor de 120 h según sea apropiado para el rasgo particular.

10 Electroporación de protoplastos

En una modalidad alternativa, las oligonucleobases de reparación génica se pueden administrar a la célula vegetal mediante electroporación de un protoplasto derivado de una parte de planta. Los protoplastos se forman mediante
15 tratamiento enzimático de una parte de la planta, particularmente una hoja, de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gallois et ál, 1996, en Methods in Molecular Biology 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp et ál., 1999, en
20 Methods in Molecular Biology 133:213-221, Humana Press, Totowa, N.J. No es necesario cultivar los protoplastos en medio de crecimiento antes de la electroporación. Las condiciones ilustrativas para la electroporación son

3.veces.10.sup.5 protoplastos en un volumen total de 0.3 mL con una concentración de oligonucleobase de reparación génica de entre 0.6-4 µg/mL.

5 Absorción de ADN mediada por PEG de protoplastos

En una modalidad alternativa, los ácidos nucleicos son absorbidos por protoplastos vegetales en presencia del agente modificador de la membrana polietilenglicol, de acuerdo con técnicas conocidas por los entendidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gharti-Chhetri et ál., 1992; Datta et ál., 1992).

Microinyección

15

En una modalidad alternativa, las oligonucleobases de reparación génica se pueden suministrar mediante inyección con un microcapilar en las células vegetales o en los protoplastos (véase, por ejemplo, Miki B. et ál., 1989; Schnorf M., et ál., 1991).

20

Selección de plantas resistentes a herbicidas y aplicación de herbicidas

- Se pueden analizar las plantas y células vegetales para determinar la resistencia o la tolerancia a un herbicida mediante el uso de métodos comúnmente conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo de la planta o célula vegetal en presencia de un herbicida y mediante la medición de la tasa de crecimiento en comparación con la tasa de crecimiento en ausencia del herbicida.
- 10 Como se usa en la presente, crecimiento básicamente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal se define como una tasa de crecimiento o velocidad de división celular de la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal que es de al menos 35 %, al menos 50 %, al menos 60 % o al menos 75 % de la tasa de crecimiento o velocidad de división celular en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína de AHAS de tipo silvestre.
- 20 Tal como se usa en la presente, el desarrollo básicamente normal de una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal se define como la aparición de uno o más eventos de desarrollo en la planta, órgano vegetal, tejido vegetal o

célula vegetal que son básicamente iguales a los que ocurren en una planta, órgano vegetal, tejido vegetal o célula vegetal correspondiente que expresa la proteína de AHAS de tipo silvestre.

5

En determinadas modalidades, los órganos vegetales proporcionados en la presente incluyen, entre otros, hojas, tallos, raíces, brotes vegetativos, brotes florales, meristemos, embriones, cotiledones, endosperma, sépalos, pétalos, pistilos, estambres, carpelos, anteras, microsporas, polen, tubos de polen, óvulos, ovarios y frutas, o secciones, rodajas o discos de estos. Los tejidos vegetales incluyen, entre otros, tejidos de callos, tejidos de tierra, tejidos vasculares, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos foliares, tejidos de brotes, tejidos de raíz, tejidos de agallas, tejidos tumorales de las plantas y tejidos reproductivos. Las células vegetales incluyen, entre otros, células aisladas con paredes celulares, agregados de diversos tamaños de estos y protoplastos.

20

Las plantas son sustancialmente «tolerantes» a un herbicida relevante cuando se someten a este y proporcionan una curva de dosis/respuesta que se desplaza a la derecha cuando se

compara con la que proporciona una planta no tolerante que se somete de forma similar. Dichas curvas de dosis/respuesta tienen una «dosis» trazada en el eje X y un «porcentaje de eliminación», «efecto herbicida», etc. trazado en el eje y.

5 Las plantas tolerantes requerirán más herbicida que las plantas no tolerantes para producir un efecto herbicida determinado. Las plantas que son sustancialmente «resistentes» al herbicida presentan menos, si es que presentan, lesiones necróticas, líticas, cloróticas u otras
10 cuando se someten al herbicida en concentraciones y a tasas que comúnmente son empleadas por la comunidad agroquímica para eliminar malezas en el campo. Las plantas que son resistentes a un herbicida también son tolerantes al herbicida.

15

EJEMPLOS

A continuación, se presentan ejemplos que ilustran los procedimientos para llevar a la práctica la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse en sentido restrictivo. Todos
20 los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla en disolventes son en volumen, a menos que se indique algo diferente.

Ejemplo 1: Preparación de muestras de Euphorbiaceae resistentes a herbicidas

A menos que se indique de otro modo, como se usa en la presente, la numeración del o los genes se basa en la secuencia de aminoácidos de acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Arabidopsis* At3g48560 (SEQ ID NO:4). En las referencias anteriores a octubre de 2005, la posición S653 (basada en la secuencia de aminoácidos de *Arabidopsis*) se denomina S621 en función de las secuencias de aminoácidos de maíz ZmAHAS108 y ZmAHAS109 (Fang et ál., 1992).

Preparación de muestras de Euphorbiaceae resistentes a herbicidas

15

Las mutaciones se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio (SDM, por sus siglas en inglés) del gen de AHAS de mandioca de tipo silvestre 1 y se transformaron en las células bacterianas CHI que carecen del homólogo de AHAS endógeno. Las células diluidas en serie se colocaron en placas con concentraciones crecientes de imazamox (IM) o flumetsulam (TP). Se usaron AHAS de mandioca wt y mutante de ALS de colza conocidos por ser muy tolerantes a herbicidas

como controles negativos y positivos, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 7. Conjuntos representativos de pruebas de manchas bacterianas que muestran los controles positivos y negativos, algunos otros
5 mutantes analizados y el mutante D376A. Las concentraciones de herbicida enumeradas en la columna izquierda corresponden a la fila completa y las columnas separan distintas líneas. Cada prueba de mancha consiste en cuatro diluciones de 1:10 en serie (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶) después de la
10 normalización en función de OD600 de cada cultivo líquido de M9.

Las células con el gen de AHAS de mandioca wt de control negativo se desarrollaron en placas sin herbicida, pero no se
15 desarrollaron en las placas que contenían el herbicida IM o TP. Las células de control positivo con el mutante de ALS de colza se desarrollaron en todas las concentraciones de IM y TP, hasta que cesó todo crecimiento con IM o TP 5 mM.

20 D376A, y su tolerancia importante a IM, es sorprendente ya que esto no se ha descrito en la mandioca hasta la fecha. W574L también presenta tolerancia importante tanto a TP como a IM, si bien el crecimiento es inconsistente.

Los mutantes también se analizaron usando un ensayo de «curva de eliminación» donde se colocaron en placas cantidades iguales de células que contenían el mutante de interés con
5 concentraciones crecientes de herbicida y se contabilizó la cantidad de colonias resultantes. Se promediaron los resultados de la curva de eliminación entre tres experimentos, cada uno con un promedio de tres replicaciones técnicas. Las barras de error representan $\pm$ una desviación
10 estándar de los datos promediados. Los resultados se ilustran en la Figura 6A y 6B. D376A, y su tolerancia importante a IM, es sorprendente ya que esto no se ha descrito en la mandioca hasta la fecha. W574L también presenta tolerancia importante tanto a TP como a IM, si bien el crecimiento es inconsistente.

15

Ejemplo 2: Producción de tejidos vegetales de mandioca del cultivo

Las plántulas *in vitro* se mantienen mediante subcultivos mensuales como recortes de brotes luego del procedimiento
20 descrito por Hankoua et ál., Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledon of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. Plant Cell, Tiss. Org.

81(2):200-211, 2005. Se recogen meristemos apicales de brotes y lóbulos de la hoja inmadura (0.1-0.9 mm de longitud) de las plántulas 10-14 días después del subcultivo previo y se cultivan en medio de inducción de embriones basado en picloram (P-CIM, por sus siglas en inglés) para la inducción de embriones somáticos primarios y estructura embriogénica organizada (OES, por sus siglas en inglés). OES se dividen en agrupaciones pequeñas de 5-10 embriones cada uno y se transfieren a medio de maduración de embriones de mandioca (CMML, por sus siglas en inglés) (Tabla 1), como lo describen Hankoua et ál. (2005) para potenciar su desarrollo hacia embriones en etapa cotiledónea verde. Se colocan partes de cotiledón verdes (alrededor de 5 mm² cada una), obtenidas de embriones de etapa cotiledónea de 14-15 días de edad usando un bisturí, en P-CIM para la producción de embriones somáticos secundarios. Las agrupaciones de embriones somáticos secundarios inducidas por P-CIM se transfieren a CMML para la maduración. Las partes de cotiledón somáticas verdes obtenidas de embriones de etapa secundaria de 14-15 días de edad se colocan en P-CIM para la inducción de embriogénesis somática cíclica. OES inducida de todos los genotipos de mandioca se fragmentan en pequeñas partes de alrededor de 5 mm² cada una y se subcultivan en medio de

inducción de callo friable y medio de mantenimiento (FEC-IM, por sus siglas en inglés) para la inducción de callo embriogénico friable (FEC, por sus siglas en inglés), como lo describen Taylor et ál., Development of friable embryogenic
5 callus and embryogenic suspension systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Nature Biotechnol. 14(6):726-730, 1996. FEC-IM es modificado mediante la inclusión de 25- mg/l- de hidrolisado de caseína y 2 μ M de sulfato de cobre. Los callos con potencial para desarrollarse en FEC y FEC inducidos se
10 subcultivan en el mismo medio para la selección y proliferación de callo de embriogénesis friable de calidad alta. Se inician las suspensiones embriogénicas mediante la transferencia de aproximadamente 35 mg de FEC puro a 50 ml de medio de suspensión de embriogénesis (EMS) y cultivo como lo
15 describen Taylor et ál. (1996). Todos los cultivos se incuban en la habitación de desarrollo a temperaturas que oscilan entre 25 °C y 28 °C en oscuridad total (una semana) para la inducción de los embriones a partir de explantos de meristemo apicales y lóbulo de la hoja o con un fotoperíodo de 16 h
20 (40-100 μ m de fotón $s^{-1}m^{-2}$ PAR) para la multiplicación y el mantenimiento de todos los otros tejidos. A menos que se indique de otro modo, todos los medios de cultivo se complementan con agar al 0.6 %.

Ejemplo 3. Aislamiento de protoplastos de mandioca

Dos gramos de FEC se colocan en placas Petri que contienen 10
5 ml de solución de digestión de pared celular. La solución de
digestión de la pared celular consistió en una mezcla de
enzimas que degradan la pared celular; 10 mg/l de Pectolyase,
10 g/l de celulosa, 200 mg/l de reguladores del crecimiento
Macerozyme (NAA 1 mg/l, 2,4-D 1 mg/l, de Zeatin 1 mg/l),
10 sales mayores (368 mg/l de CaCl_2 ; 34 mg/l de KH_2PO_4 ; 740
mg/ KNO_3 ; 492 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); sales menores (19.2 mg/l de
NA-EDTA; 14 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y osmoticum (91 g/l de D-
manitol) y 0.5 g/l de MES. Las enzimas celulasa que degradan
la pared celular (1-10 g/l) más Macerozyme (200 mg/l) son
15 satisfactorias para el aislamiento de protoplastos. La
adición extra de Pectolyase (0.001-0.01 g/l) y/o Driselase
(0.02 g/l) aumentó la producción de protoplastos. Después de
18 h de incubación, se agregan 10 ml de medio de lavado a la
solución. El medio de lavado con una osmolaridad de 0.530
20 mOsm/kg consistió en sales mayores (ver la solución de
digestión de la pared celular), 45.5 g/l de manitol y 7.3 g/l
de NaCl. El tejido digerido se filtra a través de un filtro
de 73 μM de tamaño de poro (PA 55/34 Nybolt-Suiza) en un vaso

de vidrio de 250 ml. El filtrado se divide en partes iguales en dos tubos cónicos de tapa roscada de 12 ml y se centrifuga a 600 rpm durante 3 min. (Mistral 2000). Se repite el procedimiento de lavado una vez más después de retirar el sobrenadante. La solución de protoplastos se vuelve a suspender mediante flotación en 9.5 ml de solución que contiene sales mayores y menores (ver la solución de digestión de la pared celular) y 105 g/l de sacarosa. El pH es de 5.8 y la osmolaridad de 0.650 mOsm. La solución con protoplastos se deja equilibrar durante 5 minutos antes de agregar suavemente 0.5 ml de medio de lavado en la parte superior. Después de la centrifugación a 700 rpm durante 15 min. (Mistral 2000), se concentraron los protoplastos en una banda entre la sacarosa y el medio de lavado. La capa de protoplastos se recoge con una pipeta de Pasteur y la producción se contabiliza en una cámara de hemocitómetro estándar.

Ejemplo 4: Cultivo de protoplastos

Se cultivaron protoplastos en medio solidificado con agarosa 0.2 % p/v en placas petri que contenían 10 ml del mismo medio líquido. Los siguientes medios generaron la formación de microcallos:

- Medio TM2G (Wolters et ál., 1991) complementado solamente con auxinas (0.1-10 mg/l de NAA o 0.1-10 mg/l de Picloram, o 0.1-10 mg/l de IAA, o 0.1-10 mg/l de 2,4-D, o 0.1-10 mg/l de Dicamba, o 0.1-10 mg/l, o 0.1-10 mg/l) o auxinas más citocininas (0.01-1 mg/l de zeatina, 0.01-1 mg/l de 2-iP, 0.01-1 mg/l de BA, 0.01-1 mg/l de TDZ, 0.01-1 mg/l de cinetina).
- 10 Sales y vitaminas de medio A (Murashige y Skoog (1962), 4.5 g/l de mio-inositol, 4.55 g/l de manitol, 3.8 g/l de xilitol, 4.55 g/l de sorbitol, 0.098 g/l de MES, 40 mg/l de adeninsulfato y 150 mg/l de caseinhidrolisato, 0.5 mg/l de d-calcio-pantotenato, 0.1 mg/l de colina-cloruro, 0.5 mg/l de
- 15 ácido ascórbico, 2.5 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 10 mg/l de tiamina-HCl, 0.5 mg/l de ácido fólico, 0.05 mg/l de biotina, 0.5 mg/l de glicina, 0.1 mg/l de L-cisteína y 0.25 mg/l de riboflavina y 59.40 g/l de glucosa) complementado solamente con auxinas (0.1-10 mg/l de
- 20 NAA o 0.1-10 mg/l de Picloram, o 0.1-10 mg/l de IAA, o 0.1-10 mg/l de 2,4-D, o 0.1-10 mg/l de Dicamba más citocininas (0.01-1 mg/l de zeatina, 0.01-1 mg/l de 2-iP, 0.01-1 mg/l de BA, 0.01-1 mg/l de TDZ, 0.01-1 mg/l de cinetina).

Los medios se renuevan cada 10 días, reemplazando 9 ml con medio nuevo. Después de dos meses de cultivo en el primer medio, se selecciona FEC de calidad alta y cualquiera de los
5 cultivos para proliferación adicional o para maduración. Para la proliferación, se transfiere FEC a medio Gresshoff y Doy complementado con 40 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar Daichin y 2 mg/l de picloram (GD4). Después de 3 semanas, se transfiere FEC a medio Gresshoff y Doy complementado con 20 g/l de
10 sacarosa, 7 g/l de agar y 10 mg/l de Picloram (GD2). Se iniciaron los cultivos de suspensión mediante la transferencia de 1.0 g de FEC a medio SH6% líquido complementado con 10 mg/l de Picloram. Dos semanas después, la suspensión se divide en nuevos matraces con un volumen de
15 concentrado celular inicial de 1.0 ml.

Después de 2 meses de cultivo, 10^4 protoplastos cultivados en TM2G complementado con 0.5 mg/l de NAA y 1 mg/l de Zeatina a una densidad de 10^5 /ml pueden producir >1000 micro-callos,
20 mientras que 10^4 protoplastos cultivados a una densidad de 10^6 /ml pueden producir 64 microcallos. Reemplazar medio TM2G con medio A redujo en ambas densidades la cantidad de microcallos de manera significativa. En esta etapa, se pueden

distinguir al menos tres tipos de callos. Un tipo consiste en embriones con forma globular que se observan mayormente en protoplastos cultivados a una densidad de 10^6 . Algunos de ellos desarrollan estructuras tipo cotiledón, de color verde claro. Sin embargo, estos embriones pueden no germinar de forma apropiada. Otro tipo crece rápidamente y consiste en un callo compacto grande. Este callo nunca desarrolla embriones. El tercer tipo es un callo muy friable y se observa en ambas densidades. A una densidad de $2-5 \times 10^5$ (medio TM2G) alrededor de 60 % de los callos son friables y embriogénicos. El FEC se puede subcultivar para la proliferación adicional o para la maduración.

Ejemplo 5: Proliferación de FEC derivado de protoplastos

Luego de la selección de FEC, 0.1 g de este cultivado durante tres semanas en GD4 más 2 mg/l de Picloram aumentó hasta 0.7 g de tejido. Más del 95 % del tejido consiste en FEC de calidad alta. Posteriormente, este tejido se mantiene mediante subcultivos de tres semanas en medio GD2 complementado con 10 mg/l de Picloram. Para iniciar los cultivos de suspensión, se transfiere FEC a medio líquido.

Ejemplo 6: Maduración de FEC derivado de protoplastos

El FEC aislado después de 2 meses de cultivo en TM2G se cultiva en medio de maduración. El medio de maduración consistió en sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 10 g/l de agar Daichin, 0.1 g/l de mio-inositol, 20 g/l de sacarosa, 18.2 g/l de manitol, 0.48 g/l de MES, 0.1 g/l de hidrolisado de caseína, 0.08 g/l de sulfato de adenina, 0.5 mg/l de d-calcio-pantotenato, 0.1 mg/l de cloruro de colina, 0.5 mg/l de ácido ascórbico, 2. Mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 10 mg/l de tiamina HCl, 0.5 mg/l de ácido fólico, 0.05 mg/l de biotina, 0.5 mg/l de glicina, 0.1 mg/l de L-cisteína, 0.25 mg/l de riboflavina y 1 mg/l de picloram. Este medio de maduración se renueva cada 3 semanas.

15

En este medio hay un cambio gradual de proliferación a maduración. Como resultado, el volumen de concentrado celular aumenta en un factor de 4 después de dos semanas de cultivo en medio de maduración líquido. Además, después de la transferencia al medio de maduración sólido, hay proliferación. Después de dos semanas en medio sólido, la mayoría de los embriones alcanzan una forma globular y solamente unos pocos de estos embriones globulares continúan

20

desarrollándose. Los primeros embriones en forma de torpedo se vuelven visibles después de un mes de cultivo en medio de maduración sólido. La cantidad de embriones maduros y en forma de torpedo no se correlaciona con la eficacia de colocación en placas sino con la densidad de los protoplastos inicialmente cultivados. No se obtienen dichos embriones si los protoplastos se cultivan en TM2G sin reguladores de crecimiento. La mayor cantidad de embriones maduros y en forma de torpedo se forma a partir de protoplastos cultivados en TM2G complementado con 0.5 mg/l de NAA y 1 mg/l de Zeatina. Después de 3 meses de cultivo, se aíslan entre 60 y 200 embriones en forma de torpedo y maduros por gota de agarosa. Los embriones en forma de torpedo se vuelven maduros a frecuencia alta si se cultivan en medio de maduración nuevo o en MS2 más 0.1 mg/l de BAP.

Ejemplo 7: Embriogénesis somática secundaria y germinación de embriones maduros derivados de protoplastos

Tanto en medio líquido como sólido, 2,4-D es superior para la inducción de embriogénesis secundaria en comparación con NAA. Si los embriones maduros se cultivan en primer lugar en 2,4-D y luego en NAA líquido, la respuesta es comparable al cultivo

en 2,4-D solo. Además, los embriones que se sometieron en primer lugar a un ciclo de embriogénesis somática secundaria en medio con 2,4-D produjeron embriones secundarios muy eficaces en MS20 complementado con 10 mg/l de NAA. El
5 desecado estimuló la germinación normal de embriones inducidos por NAA. Sin embargo, los embriones desecados requieren un medio complementado con citocininas, tal como bencitaminopurina (BAP) para la germinación a frecuencia alta. Con 1 mg/l de BAP, se forman plantas con raíces
10 centrales gruesas y cortas y brotes ramificados con internodos cortos. Con 0.1 mg/l de BAP, las raíces centrales son delgadas y espigadas. Además, los embriones desecados que se cultivan en la oscuridad requieren una menor concentración de BAP y, además, estos embriones, germinan más rápido que
15 los embriones cultivados en la luz. Las plantas completas se obtienen cuatro semanas después del inicio de la inducción de embriones somáticos. Los embriones inducidos con 2,4-D muestran una respuesta distinta. En todos los genotipos, la desecación estimula la formación de raíces. Los embriones
20 cultivados en la oscuridad forman raíces predominantemente inesperadas, mientras que los embriones cultivados en la luz forman predominantemente raíces centrales.

Ejemplo 10: CRISPR y GRON en mandioca.

Este ejemplo demuestra conversión de W574S de AHAS en *Manihot esculenta* a las 4 semanas después del suministro de PEG de
5 plásmidos de CRISPR-Cas9 y GRON a protoplastos. Las CRISPR-Cas9 utilizadas en este experimento se dirigen a los genes de AHAS en el genoma de la mandioca mediante la introducción en los protoplastos de uno o más plásmidos que codifican el gen Cas9 y ARNsg. El ARNsg es una fusión del ARN de CRISPR
10 (ARNcr) y el ARNcr transactivador (ARNtracr). El ARNcr guía a Cas9 hacia los genes diana, donde Cas9 crea una interrupción de cadena doble en los genes de AHAS y los GRON se utilizan como una plantilla para la conversión de los genes de AHAS de forma dirigida al sitio.

15

Métodos

Se aislaron protoplastos de mandioca de las suspensiones celulares de raíces. El plásmido que codifica CRISPR-Cas9
20 (pTD1315, Figura 7A) contiene el promotor MAS que conduce la secuencia codificante de Cas9 con un terminador rbcSE9. Se usaron plásmidos de ARNsg individuales (pTD1541 y pTD1542, Figura 7B) con el promotor U6 del arroz que conduce los ARNsg

con un terminador rbcSE9. Los plásmidos se introdujeron en los protoplastos mediante administración mediada por PEG a una concentración final de 0.08 µg/µl. Se usaron GRON (AHAS1-2-C y AHAS2-2-C, ver más adelante) a una concentración final de 0.5 µM. Los protoplastos se cultivaron en medio líquido, y se incubaron en la oscuridad a 28 °C durante dos semanas, luego de lo cual se movieron a un agitador giratorio a 50 rpm a 28 °C en luz baja indirecta. Las muestras individuales de microcallos de 30k se analizaron mediante NGS 4 semanas después del suministro de plásmidos de CRISPR-Cas9 y/o GRON, para determinar el porcentaje de células (lecturas de ADN) que transportan la conversión de AHAS y que tienen indels en el gen de AHAS.

La CRISPR consiste en dos componentes: La Cas9 de *Streptococcus pyogenes* optimizada por codón vegetal (SpCas9) y el ARNsg, que se expresan a partir del mismo plásmido. El ARNsg es una fusión del ARN de CRISPR (ARNcr) y el ARNcr transactivador (ARNtracr). La región de ARNcr contiene la secuencia espaciadora 5'-ACGAGGAGGGGCTTGGGTTGTGG-3' (SEQ ID NO: 6) usada para guiar a la nucleasa de Cas9 al gen diana. En este experimento, las CRISPR se dirigen a los genes de AHAS. Se utilizaron las siguientes secuencias en estos

métodos:

ARNsg de AHAS1 (SEQ ID NO: 7):

ATTTGGGAATGGTGGTACAATGGGAGG

ARNsg de AHAS2 (SEQ ID NO: 8):

5 GAACAATCAACATCTGGGTATGGTTGTTCAATGG

GRON de AHAS1-2-C (SEQ ID NO: 9):

TCTGCCAATTAAAATAATGCTTTTGAATAATCAGCATTTGGGAATGGTGGTACAATCGGAA

GACCGATTCTACAAGGCTAATAGAGCTCATACTTATTTGGGGGATCCATCAA

GRON de AHAS2-2-C (SEQ ID NO: 10):

10 ACCTGCCTGTGAAGATCTTGTTACTGAACAATCAACATCTGGGTATGGTTGTTTCAGTCGGA

GGACAGATTCTATCATTCCAACAGAGCACATACATATTTAGGGAACCCATCA

Resultados

15 A las 4 semanas, los protoplastos del arroz presentan 0.024%
de conversión del gen de AHAS1 y 0.007 % de AHAS2, según se
determina mediante NGS. Los controles únicamente con GRON sin
CRISPR-Cas9 y los controles sin tratamiento no demostraron
conversión. Además, estos datos demuestran que la CRISPR-Cas9
20 está activa y es capaz de escindir los genes diana de AHAS y
formar indels con un índice de hasta 52.1 %.

REFERENCIAS

- Datta SK, Datta K, Soltanifar N, Donn G, Potrykus I (1992) Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Molec. Biol.* 20:619-629
- 5 Dovzhenko A (2001) Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). PhD Dissertation, LMU Munich, Faculty of Biology
- 10 Duggleby, R.G. McCourt, J.A.; Guddat L.W. *Plant Physiology and Biochemistry.* 46, (2008) 309-324.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR
- 15 analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**:1349.
- Frigerio L, Vitale A, Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM (1998) Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J Biol*
- 20 Chem 273:14194-14199
- Fang LY, Gross PR, Chen CH, Lillis M (1992) Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Mol*

Biol. **18**(6):1185-7

Gharti-Chhetri GB, Cherdshewasart W, Dewulf J, Jacobs M,
Negrutiu I (1992) Polyethylene glycol-mediated direct gene
5 transfer in *Nicotiana* spp. *Physiol. Plant.* 85:345-351

Klaus S (2003) Markerfreie transplastome Tabakpflanzen
(Marker-free transplastomic tobacco plants). PhD
Dissertation, LMU Munich, Faculty of Biology

10 Miki B, Huang B, Bird S, Kemble R, Simmonds D, Keller W
(1989) A procedure for the microinjection of plant cells and
protoplasts. *Meth. Cell Science* **12**:139-144

Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rouselle
15 P, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasm hybridization in
Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 244-
250

Schnorf M, Neuhaus-Url G, Galli A, Iida S, Potrykus I,
Neuhaus G (1991) An improved approach for transformation of
20 plant cells by microinjection: molecular and genetic
analysis. *Transgen. Res.* **1**:23- 30

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL (2005)

Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Manag Sci. **61**(3):246-57.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos
5 técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

La invención descrita de manera ilustrativa en la presente se
10 puede poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se describen específicamente en la presente. Por lo tanto, por ejemplo, los términos «que comprende», «que incluye», «que contiene», etc., se deberán leer en sentido
15 amplio y de modo no taxativo. Además, los términos y expresiones utilizados en la presente han sido usados como términos de descripción y no de limitación y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún
20 equivalente de las características que se muestran y describen o partes de estas. Se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

Por lo tanto, se debería entender que, pese a que la presente invención fue descrita específicamente mediante modalidades preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación, mejora y variación de la invención descrita, y que se considera que dichas modificaciones, mejoras y variaciones se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos que se proporcionan en la presente son representativos de las modalidades preferidas, son ejemplos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

La invención se ha descrito de forma amplia y genérica en la presente. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos comprendidos dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si el material eliminado se menciona o no específicamente en la presente.

20

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describan en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se describe también

en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y
5 otras referencias mencionadas en la presente se incorporan
expresamente en su totalidad mediante referencia, con el
mismo alcance que si cada una de estas se incorporara
mediante referencia de forma individual. En caso de
conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva,
10 incluidas las definiciones.

Se presentan otras modalidades dentro de las siguientes
reivindicaciones.

