

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 971**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06746369 .5**

96 Fecha de presentación: **09.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1889902**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN QUE USA UN GEN DE UNA ACETOLACTATO-SINTASA MUTANTE.**

30 Prioridad:
09.05.2005 JP 2005136186

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
**KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.
4-26, IKENOHATA 1-CHOME
TAITO-KU TOKYO 110-8782, JP y
TOHOKU UNIVERSITY**

72 Inventor/es:
**TORIYAMA, Kinya;
OKUZAKI, Ayako;
KAKU, Koichiro;
KAWAI, Kiyoshi y
SHIMIZU, Tsutomu**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 372 971 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de transformación que usa un gen de una acetolactato-sintasa mutante

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de transformación y a un procedimiento para el cultivo de una planta que usa una acetolactato-sintasa mutante en la que se introduce una mutación en una posición predeterminada de una acetolactato-sintasa natural.

10

Antecedentes

[0002] La acetolactato-sintasa (denominada en adelante "ALS") es una enzima limitante de la velocidad en la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada, como leucina, valina e isoleucina y es conocida como una enzima esencial para el crecimiento de las plantas. También se sabe que la ALS está presente en una amplia diversidad de plantas superiores. Además, la ALS se ha descubierto en diversos microorganismos, como levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

15

[0003] Se conocen tres tipos de isoenzimas de la ALS presentes en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Cada una de estas isoenzimas es un heterooligómero que consta de subunidades catalíticas de alto peso molecular que rigen la actividad catalítica de la enzima y subunidades reguladoras de bajo peso molecular que funcionan como inhibidores de retroalimentación a través de la unión de aminoácidos de cadena ramificada (Chipman y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 401-419, 1998 [documento no correspondiente a patente 1]). Las subunidades catalíticas se localizan en los operones *ilvIH*, *ilvGM* y *e ilvBN*, respectivamente. Además, la ALS en levaduras es una enzima única que consta de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora, como en el caso de las bacterias (Pang y col., *Biochemistry* 38, 5222-5231, 1999 [documento no correspondiente a patente 2]). La subunidad catalítica de la proteína se localiza en el locus *ILV2*.

20

25

[0004] En las plantas, se sabe que la ALS consta de subunidades catalíticas y subunidades reguladoras, como en el caso de los microorganismos anteriores (Hershey y col., *Plant Molecular Biology* 40, 795-806, 1999 [documento no correspondiente a patente 3]). Por ejemplo, las subunidades catalíticas de la ALS en tabaco (dicotiledónea) están codificadas por dos loci génicos, *SuRA* y *SuRB* (Lee y col., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988 [documento no correspondiente a patente 4]), y las de maíz están codificadas por dos loci génicos, *als1* y *als2* (Burr y col., *Trends in Genetics* 7, 55-61, 1991 [documento no correspondiente a patente 5]; Lawrence y col., *Plant Mol. Biol.* 18, 1185-1187, 1992 [documento no correspondiente a patente 6]). Las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las subunidades catalíticas han sido determinadas en su totalidad para plantas dicotiledóneas, como tabaco, *Arabidopsis*, colza, algodón, *Xanthium*, *Amaranthus* y *Kochia* (véanse Chipman y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 401-419, 1998 [documento no correspondiente a patente 1] y la publicación internacional WO97/08327 [documento de patente 1]). Sin embargo, el maíz y el arroz son las únicas plantas monocotiledóneas para las que se han determinado las secuencias nucleotídicas en su totalidad.

30

35

40

[0005] Mientras tanto, se sabe que herbicidas como los herbicidas de sulfonilurea, los herbicidas de imidazolinona, los herbicidas de triazolopirimidina y los herbicidas de carboxipirimidinilo (denominados de ahora en adelante, "herbicidas de PC") suprimen el crecimiento de las plantas por inhibición de la ALS (Ray, *Plant Physiol.* 75, 827-831, 1984 [documento no correspondiente a patente 7]; Shaner y col., *Plant Physiol.* 76, 545-546, 1984 [documento no correspondiente a patente 8]; Subramanian y col., *Plant Physiol.* 96, 310-313, 1991 [documento no correspondiente a patente 9]; Shimizu y col., *J. Pestic. Sci.* 19, 59-67, 1994 [documento no correspondiente a patente 10]).

45

50

[0006] Se sabe que plantas con una o dos sustituciones de nucleótidos en un gen que codifica la ALS, que inducen una o dos sustituciones de aminoácidos en una región conservada entre diferentes especies, presentan resistencia a estos herbicidas. Algunos ejemplos de un gen semejante incluyen un gen que codifica una ALS con una fuerte resistencia a los herbicidas de sulfonilurea (véanse Kathleen y col., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988 [documento no correspondiente a patente 11]; Mourad y col., *Planta* 188, 491-497, 1992 [documento no correspondiente a patente 12]; Guttieri y col., *Weed Sci.* 43, 175-178, 1995 [documento no correspondiente a patente 13]; Bernasconi y col., *J. Biol. Chem.* 270, 17381-17385, 1995 [documento no correspondiente a patente 14], y la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 63-71184 A (1988) [documento de patente 2]; un gen que codifica una ALS con una fuerte resistencia a los herbicidas de imidazolinona (véanse Mourad y col., *Planta* 188, 491-497, 1992 [documento no correspondiente a patente 12]; Lee y col., *FEBS Lett.* 452, 341-345, 1999 [documento no correspondiente a patente 15]), y la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 5-227964 A (1993) [documento de patente 3]); un gen que codifica una ALS con una fuerte resistencia a los herbicidas de PC (véanse los documentos WO02/44385A1 [documento de patente 4] y WO03/083118A1 [documento de patente 5]), y un gen que codifica una ALS con resistencia a herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona y PC (véanse Kathleen y col., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988 [documento no correspondiente a patente 11]; Bernasconi y col., *J. Biol. Chem.* 270, 17381-17385 [documento no correspondiente a patente 14]; Hattori y col., *Mol. Gen. Genet.* 246, 419-425, 1995 [documento no

55

60

65

correspondiente a patente 16]; Alison y col., *Plant Physiol.* 111, 1353, 1996 [documento no correspondiente a patente 17]; Rajasekarau y col., *Plant Sci.* 119, 115-124, 1996 [documento no correspondiente a patente 18]; la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 63-71184 A (1988) [documento de patente 2]; la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 4-311392 A (1992) [documento de patente 6]; Bernasconi y col., patente de los EE. UU. 5 5633437, 1997 [documento de patente 7] y los documentos WO02/44385A1 [documento de patente 4] y WO03/083118A1 [documento de patente 5]).

[0007] Los documentos siguientes discuten también la mutación de la acetolactato-sintasa con el fin de conferir resistencia a herbicidas: Shimizu y col. (2005) *Environmental Fate and Safety Management of Agrochemicals*, vol. 899, páginas 255-271; Mazur y Falco (1989) *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, vol. 40, páginas 441-470, y Okuzaki y col. (2004) *Plant Cell Reports*, vol. 22, páginas 509-512.

[0008] Se ha intentado la producción de una planta que muestre resistencia tanto a los herbicidas de sulfonilurea y como de imidazolinona mediante el cruzamiento de una planta con una ALS que muestra resistencia específicamente a los herbicidas de sulfonilurea con una planta con una ALS que muestra resistencia específicamente a los herbicidas de imidazolinona (Mourad y col., *Mol. Gen. Genet.* 243, 178-184, 1994 [documento no correspondiente a patente 19]). Además se ha intentado la alteración artificial de un gen que codifica una ALS para obtener un gen de resistencia a herbicidas (Véanse Ott y col., *J. Mol. Biol.* 263, 359-368, 1996 [documento no correspondiente a patente 20]; la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 63-71184 A (1988) [documento de patente 2]; la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 5-227964 A (1993) [documento de patente 3], y la publicación de patente japonesa (Kohyo) n° 11-504213 A (1999) [documento de patente 8]). De este modo, se ha puesto de manifiesto que la delección de un solo aminoácido hace que la ALS muestre resistencia a los herbicidas tanto de sulfonilurea como de imidazolinona (véase la publicación de patente japonesa (Kokai) n° 5-227964 A (1993) [documento de patente 3]).

[0009] Tal como se describe anteriormente, las ALS con resistencia a herbicidas y los genes codificantes de ALS se han estudiado intensamente. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito casos relativos a un gen de una ALS mutante que presente resistencia específicamente a los herbicidas de PC solamente con el uso de la resistencia a herbicidas de PC como indicador. En caso de obtener un gen de una ALS mutante con resistencia específica a un herbicida específico, dicho gen de ALS mutante puede usarse para diversas aplicaciones. Hasta el momento no se han descrito casos relativos a un gen de una ALS mutante semejante que sea útil en cuanto a su especificidad para herbicidas de PC.

Documento no correspondiente a patente 1: Chipman y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 401-419, 1998
 Documento no correspondiente a patente 2: Pang y col., *Biochemistry* 38, 5222-5231, 1999
 Documento no correspondiente a patente 3: Hershey y col., *Plant Molecular Biology* 40, 795-806, 1999
 Documento no correspondiente a patente 4: Lee y col., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988
 Documento no correspondiente a patente 5: Burr y col., *Trends in Genetics* 7, 55-61, 1991
 Documento no correspondiente a patente 6: Lawrence y col., *Plant Mol. Biol.* 18, 1185-1187, 1992
 Documento no correspondiente a patente 7: Ray, *Plant Physiol.* 75, 827-831, 1984
 Documento no correspondiente a patente 8: Shaner y col., *Plant Physiol.* 76, 545-546, 1984
 Documento no correspondiente a patente 9: Subramanian y col., *Plant Physiol.* 96, 310-313, 1991
 Documento no correspondiente a patente 10: Shimizu y col., *J. Pestic. Sci.* 19, 59-67, 1994
 Documento no correspondiente a patente 11: Kathleen y col., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988
 Documento no correspondiente a patente 12: Mourad y col., *Planta* 188, 491-497, 1992
 Documento no correspondiente a patente 13: Guttieri y col., *Weed Sci.* 43, 175-178, 1995
 Documento no correspondiente a patente 14: Bernasconi y col., *J. Biol. Chem.* 270, 17381-17385, 1995
 Documento no correspondiente a patente 15: Lee y col., *FEBS Lett.* 452, 341-345, 1999
 Documento no correspondiente a patente 16: Hattori y col., *Mol. Gen. Genet.* 246, 419-425, 1995
 Documento no correspondiente a patente 17: Alison y col., *Plant Physiol.* 111, 1353, 1996
 Documento no correspondiente a patente 18: Rajasekarau y col., *Plant Sci.* 119, 115-124, 1996
 Documento no correspondiente a patente 19: Mourad y col., *Mol. Gen. Genet.* 243, 178-184, 1994
 Documento no correspondiente a patente 20: Ott y col., *J. Mol. Biol.* 263, 359-368, 1996
 Documento de patente 1: publicación internacional WO97/08327
 Documento de patente 2: publicación de patente japonesa (Kokai) n° 63-71184 A (1988)
 Documento de patente 3: publicación de patente japonesa (Kokai) n° 5-227964 A (1993)
 Documento de patente 4: publicación internacional WO02/44385
 Documento de patente 5: publicación internacional WO03/083118
 Documento de patente 6: publicación de patente japonesa (Kokai) n° 4-311392 A (1992)
 Documento de patente 7: Bernasconi y col., patente de los EE. UU. n° USP 5.633.437
 Documento de patente 8: publicación de patente japonesa (Kohyo) n° 11-504213 A (1999)

Descripción de la invención

[0010] En las circunstancias descritas anteriormente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un

procedimiento para seleccionar eficazmente una célula transformada con el uso de un gen de una ALS mutante con alta especificidad para herbicidas de PC.

5 **[0011]** Como resultado de estudios intensivos para alcanzar el objetivo anterior, hemos puesto de manifiesto que una ALS con una mutación específica muestra una resistencia extremadamente alta a herbicidas de PC. También hemos descubierto que un gen que codifica una ALS con dicha mutación puede usarse como marcador de selección. Por lo tanto, hemos llevado a término la presente invención.

10 **[0012]** La presente invención abarca lo siguiente.

(1) Un procedimiento de transformación que comprende las etapas de:

transformación de una célula hospedadora con un vector de recombinación que contiene un gen de interés y un gen que codifica una acetolactato-sintasa vegetal mutante con una mutación de glicina a alanina en un resto de glicina correspondiente a la posición 95 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

15 cultivo de la célula transformada obtenida en la primera etapa en presencia de un herbicida de carboxipirimidinilo, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante se usa como marcador de selección.

20 (2) El procedimiento de transformación según (1), en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante es un gen que codifica la proteína (a) o (b) siguiente:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

25 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a 14.

(3) El procedimiento de transformación según (1), en que la célula hospedadora es una célula vegetal.

30 (4) Un procedimiento para el cultivo de una planta que comprende las etapas de:

transformación de una célula vegetal con un vector de recombinación que contiene un gen de interés y un gen que codifica una acetolactato-sintasa vegetal mutante con una mutación de glicina a alanina en un resto de glicina correspondiente a la posición 95 de SEQ ID NO:2;

35 cultivo de la planta transformada obtenida en la primera etapa en presencia de un herbicida de carboxipirimidinilo, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante se usa como marcador de selección.

40 (5) El procedimiento para el cultivo de una planta según (4), en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante es un gen que codifica la proteína (a) o (b) siguiente:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

45 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a 14.

Breve descripción de los dibujos

[0013]

50 La figura 1 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos entre una proteína ALS mutante derivada de arroz y una proteína ALS natural derivada de arroz.

La figura 2-1 muestra una comparación de secuencias de nucleótidos entre un gen de una ALS mutante derivada de arroz y un gen que codifica una proteína ALS natural derivada de arroz.

La figura 2-2 muestra una comparación de secuencias de nucleótidos entre un gen de una ALS mutante derivada de arroz y un gen que codifica una proteína ALS natural derivada de arroz.

55 La figura 2-3 muestra una comparación de secuencias de nucleótidos entre un gen de una ALS mutante derivada de arroz y un gen que codifica una proteína ALS natural derivada de arroz.

La figura 3 muestra fotografías que muestran el enraizamiento de clones derivados de la línea G95A-1 y la línea G95A-2 en un medio de enraizamiento que contiene bispiribaco de sodio tal como se observa.

La figura 4 es un diagrama esquemático para explicar el procedimiento de construcción de un vector de expresión de la ALS mutante G95A.

60 La figura 5 es una figura característica que muestra la razón de resistencia del herbicida (razón RS) entre la ALS mutante G95A y la ALS natural, basada en la concentración inhibitoria del 50%.

Mejor modo de realización de la invención

65

[0014] A continuación se proporcionará una explicación más detallada de la presente invención.

[0015] La proteína acetolactato-sintasa de la presente invención (denominada de ahora en adelante “proteína ALS mutante”) puede obtenerse por mutación de un sitio predeterminado en una proteína ALS natural. En una
5 proteína ALS natural derivada de arroz, el aminoácido n° 95 desde la metionina N-terminal es glicina. En la proteína ALS mutante de la presente invención, la glicina 95 se ha sustituido con alanina. Específicamente dicha proteína ALS mutante derivada de arroz según la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos en la que la glicina 95 ha sido sustituida con alanina (denotada como G95A). La secuencia de nucleótidos de un gen (denominado de ahora en adelante “gen de la ALS mutante”) que codifica dicha proteína ALS mutante derivada de arroz y la
10 secuencia de aminoácidos de dicha proteína ALS mutante se muestran en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente.

[0016] La figura 1 muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos entre la proteína ALS mutante derivada de arroz y la proteína ALS natural derivada de arroz. Además, en la figura 1, la secuencia de aminoácidos en la primera línea representa la proteína ALS natural y la secuencia de aminoácidos en la segunda línea representa la proteína ALS mutante.

[0017] A diferencia del gen que codifica la proteína ALS natural derivada de arroz, el gen de la ALS mutante (SEQ ID NO:1) derivada de arroz se obtiene por sustitución de los codones que codifican la glicina 95 en la proteína
20 ALS natural con codones que codifican alanina. Las figuras 2-1 a 2-3 muestran una comparación de la secuencia de nucleótidos entre el gen de la ALS mutante derivada de arroz y el gen que codifica la proteína ALS natural derivada de arroz. Además, en las figuras 2-1 a 2-3, la secuencia de nucleótidos en la primera línea representa el gen de la ALS natural y la secuencia en la segunda línea representa el gen que codifica la proteína ALS mutante.

[0018] Dicho gen de la ALS mutante puede obtenerse mediante la introducción de la mutación descrita anteriormente en un gen que codifica una proteína ALS natural presente en el ADN genómico de la variedad Taichung 65 (variedad de arroz del tipo japonesa). Como técnica para introducir mutaciones puede emplearse cualquiera de las técnicas conocidas convencionalmente. Por ejemplo, puede emplearse la mutación dirigida. La mutación dirigida puede realizarse con un kit comercial, p. ej. Mutan-K (Takara Shuzo), Gene Editor (Promega) o
30 ExSite (Stratagene). Además, un gen que codifique la proteína ALS mutante puede obtenerse por cultivo de células naturales sensibles a un herbicida de PC en presencia del herbicida de PC y obtención posterior del gen a partir de las células mutantes que aparecen y muestran resistencia al herbicida de PC.

[0019] El gen de la ALS mutante según la presente invención puede obtenerse no solo a partir del gen derivado de arroz mostrado en SEQ ID NO:1, sino también a partir de los genes de ALS derivados de una amplia diversidad de plantas. Por ejemplo, el gen de la ALS mutante según la presente invención puede obtenerse mediante la introducción de una mutación similar en un gen de ALS derivado de maíz, trigo, cebada, soja, algodón, colza, remolacha, raigrás italiano, tabaco, *Arabidopsis thaliana* o similares. En este caso, “mutación similar” significa una mutación a alanina de la glicina correspondiente a la glicina de la posición 95 (este número puede diferir
40 dependiendo de las plantas en cuestión) en una proteína ALS natural derivada de arroz.

[0020] Las secuencias de aminoácidos de dos tipos de proteínas ALS mutantes derivadas de maíz se muestran en SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos parciales de dos tipos de proteínas ALS mutantes derivadas de trigo se muestran en SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente. Las
45 secuencias de aminoácidos de dos tipos de proteínas ALS mutantes derivadas de algodón se muestran en SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de dos tipos de proteínas ALS mutantes derivadas de colza se muestran en SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de dos tipos de proteínas ALS mutantes derivadas de tabaco se muestran en SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de una proteína ALS mutante derivada de raigrás italiano se muestra en SEQ ID NO:13. La secuencia de aminoácidos de una proteína ALS mutante derivada de *Arabidopsis thaliana* se muestra en SEQ ID NO:14.

[0021] La proteína ALS mutante según la presente invención muestra resistencia específicamente a herbicidas de PC, independientemente de su origen, siempre que la glicina correspondiente a la glicina 95 de una
55 proteína ALS natural derivada de arroz se haya sustituido con alanina.

[0022] En comparación con las proteínas ALS naturales, la proteína ALS mutante muestra gran resistencia a herbicidas de PC. Esto puede confirmarse mediante la incorporación de un gen que codifica la proteína ALS mutante en un vector de expresión en *Escherichia coli*, por ejemplo, y el examen posterior de la sensibilidad de la ALS mutante (obtenida a partir de *Escherichia coli* así transformada mediante el vector de expresión) a herbicidas de PC.
60

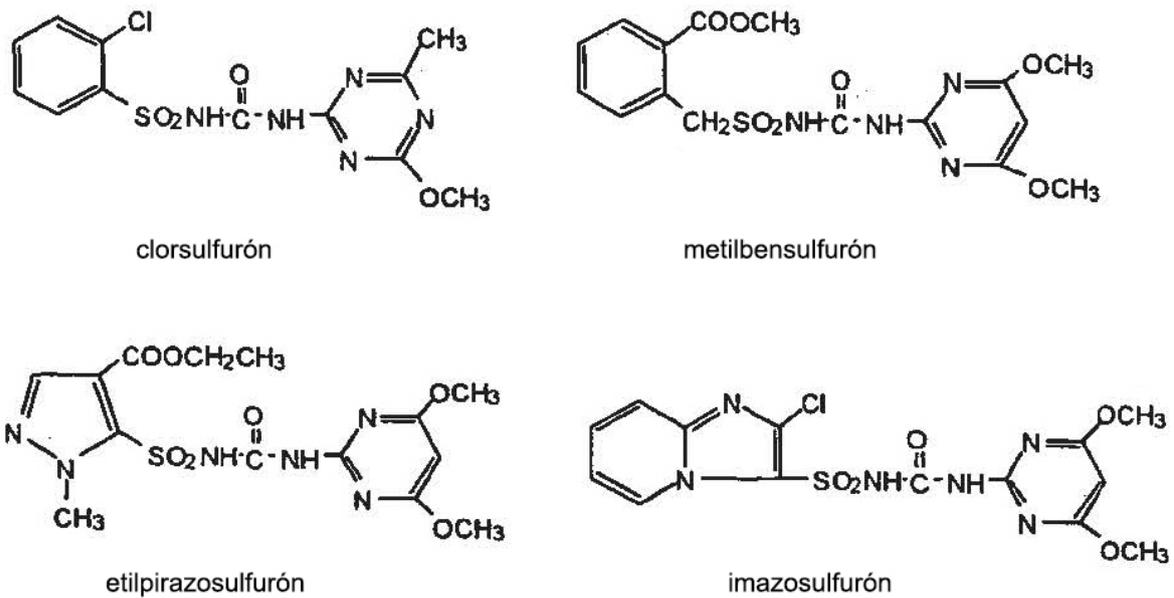
[0023] En este documento, los ejemplos de herbicidas de PC incluyen bispiribaco de sodio, piritiobaco de sodio y piriminoabaco, tal como se representan por las siguientes fórmulas químicas 1.

Fórmulas 1:



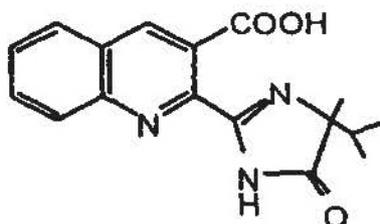
[0024] La expresión "...muestra resistencia específicamente a herbicidas de PC" significa que la resistencia a herbicidas de sulfonilurea o a herbicidas de imidazolinona distintos de los herbicidas de PC es significativamente menor que la resistencia a herbicidas de PC. Algunos ejemplos de dichos herbicidas de sulfonilurea incluyen, tal como se representan por las fórmulas químicas 2, clorsulfurón, metilbensulfurón, etilpirazosulfurón e imazosulfurón.

Fórmulas 2:



10 [0025] Algunos ejemplos de herbicidas de imidazolinona incluyen imazaquina e imazapir, tal como se representan por las fórmulas químicas 3.

Fórmulas 3:



imazaquina



imazapir

[0026] Según la presente invención, puede establecerse un procedimiento de transformación que permita la transformación eficiente con un gen de interés mediante el uso de un gen de una ALS mutante. Específicamente, dicho gen de una ALS mutante puede usarse como marcador de selección en un experimento de transformación de plantas. Por ejemplo, para transformar una célula vegetal con un gen de interés, se introduce un vector de recombinación con el gen de la ALS mutante y un gen de interés en la célula vegetal y después la célula vegetal se cultiva en presencia de un herbicida de PC. Si las células vegetales así obtenidas sobreviven en presencia del herbicida de PC, se confirma que son células vegetales en las que el gen de interés se ha introducido junto con el gen de la ALS mutante. Además, puede confirmarse si el gen de interés y el gen que codifica la proteína ALS mutante se han incorporado en los cromosomas de las células vegetales mediante observación del fenotipo de las plantas y examen posterior de la presencia de estos genes en el genoma por hibridación genómica de Southern o por PCR.

[0027] Como técnicas para la transformación de plantas pueden usarse las técnicas conocidas convencionalmente. Un ejemplo de una de estas técnicas es una técnica que supone la introducción de un gen foráneo en una célula vegetal diana por medio de *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*).

[0028] Más específicamente, el gen de la ALS mutante y un gen de interés se insertan en un vector binario que contiene la secuencia de ADN-T de un plásmido Ti de *Agrobacterium*. El plásmido Ti se transforma en *Escherichia coli* o similar. Después, los vectores binarios que retienen el gen de la ALS mutante y el gen de interés replicados, p. ej., en *Escherichia coli*, se transforman en una bacteria *Agrobacterium sp.* que contiene plásmidos auxiliares. Las plantas diana se infectan con la bacteria *Agrobacterium sp.* y después se identifican las plantas transformadas. Cuando las plantas transformadas identificadas están en forma de cultivos celulares, las células vegetales pueden regenerarse para obtener plantas completas por una técnica conocida convencionalmente.

[0029] Para transformar una planta diana con dicho vector de recombinación que contiene el gen de la ALS mutante y un gen de interés, el vector puede introducirse directamente en la planta mediante una técnica conocida convencionalmente. Además, algunos ejemplos de procedimientos de transformación con dicho vector de recombinación que contiene el gen de la ALS mutante y un gen de interés incluyen el procedimiento del polietilenglicol, el procedimiento de electroporación, el procedimiento de la pistola de genes y similares.

[0030] Mientras tanto, el gen de la ALS mutante y un gen de interés pueden transformarse en cualquier tipo de plantas, como plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Algunos ejemplos de cultivos diana para transformar con un gen semejante que codifica la proteína ALS mutante incluyen arroz, maíz, cebada, soja, algodón, colza, remolacha, tabaco y similares. Además, césped, arboles y similares también pueden transformarse mediante la introducción de dicho gen mutante y un gen de interés.

[0031] En cualquiera de los casos anteriores, la transformación de una planta mediante un gen de una ALS mutante puede conferir a la planta resistencia específicamente a herbicidas de PC. En particular, los herbicidas de PC son solubles en agua, a diferencia de los herbicidas de sulfonilurea o los herbicidas de imidazolinona, de modo que son fáciles de manejar. Además, el uso de un herbicida de PC semejante hace posible eliminar los efectos de un disolvente orgánico en las células del hospedador. Por lo tanto, un herbicida de PC semejante se usa preferentemente como herbicida en la transformación. Además, un herbicida de PC semejante muestra una actividad inhibitoria de la ALS que es aproximadamente 100 veces superior a la de un herbicida de imidazolinona. Por lo tanto, los transformantes pueden seleccionarse con el uso de una cantidad extremadamente baja del herbicida de PC.

[0032] La presente invención se describirá a continuación por los ejemplos siguientes, pero el alcance técnico de la invención no se limita por estos ejemplos.

[Ejemplo 1] Inducción de callo (derivado de un cultivo de anteras)

[0033] Se recogieron panículas jóvenes, con una longitud de aurícula a aurícula de 6 cm a 8 cm, de la variedad "Taichung 65" (un cultivar de arroz del tipo japónica) en la etapa de embuchamiento, de modo que pudiera obtenerse el número máximo de anteras en la fase mononucleada. En dicho momento se cortaron en agua porciones de los tallos por debajo de los nudos de los profilos o los cotiledones. Se eliminaron las hojas distintas de estos dos tipos de hoja (un cotiledón y un perfilo) que envuelven directamente cada panícula joven.

[0034] Las porciones de la base de los tallos se envolvieron con toallas de papel empapadas con agua y después se cubrieron con bolsas de vinilo, de modo que se realizó un tratamiento a baja temperatura durante 5 a 10 días en condiciones de oscuridad y a 10°C. Posteriormente, las panículas se separaron en una cámara de flujo laminar, se esterilizaron con etanol al 70% durante 10 minutos y después se secaron en toallas Kimtowel esterilizadas (Crecia, Tokio). Las flores glumáceas semitransparentes que contenían anteras en la fase mononucleada se abrieron mediante pinzas esterilizadas. Se extirparon solamente las anteras, que se colocaron en medio de inducción de callo (medio N6Cl, tabla 1). Las anteras se cultivaron en condiciones de luz continua a 30°C. Se subcultivaron en medio nuevo cada tres semanas.

Tabla 1
Medio de inducción de callo (N6Cl), pH 5,8

Sales inorgánicas N6	
Vitaminas N6	
Sacarosa	30 g/l
2,4-D	2 mg/l
L(-)-prolina	2,878 g/l
Gelrita	3 g/l
Casaminoácidos	0,3 g/l

[Ejemplo 2] Selección de callo (derivado del cultivo de anteras) mediante bispiribaco de sodio

[0035] A las cinco semanas después de la inducción de callo, los callos (derivados del cultivo de anteras) se cultivaron en medio de inducción de callo con bispiribaco de sodio 0,25 µM durante cuatro semanas. A continuación, los callos crecidos se cultivaron en medio de rediferenciación (tabla 2) con bispiribaco de sodio 0,5 µM durante cuatro semanas. De este modo se obtuvieron plantas rediferenciadas albinas. En todos los casos se realizó un subcultivo cada dos semanas.

Tabla 2
Medio de rediferenciación (pH 5,8)

Sales inorgánicas MS	
Vitaminas N6	
Sacarosa	30 g/l
Sorbitol	50 g/l
2,4-D	2 mg/l
NAA	1 mg/l
BAP	2 mg/l
Casaminoácidos	2 g/l
L(-)-prolina	2,878 g/l
Gelrita	4 g/l

El medio se ajustó a un volumen total de 1 litro, se autoclavó y después se le añadió bispiribaco de sodio.

[Ejemplo 3] Prueba de resistencia a bispiribaco de sodio

[0036] Las dos líneas de plantas seleccionadas por el procedimiento anterior se designaron línea G95A-1 y línea G95A-2. Dado que eran plantas albinas se cultivaron en el medio MS y después se multiplicaron por división. Para evaluar el grado de resistencia a bispiribaco de sodio, los clones de las plantas obtenidas por división de la línea G95A-1 se trasplantaron a un medio de enraizamiento (tabla 3) que contenía bispiribaco de sodio 0 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM o 20 µM (figura 3A: a la izquierda en cada placa de Petri, de color blanco por ser albinos). Los clones de las plantas de la línea G95A-2 (estos clones son pocos en número) se evaluaron solo con bispiribaco de sodio 5 µM. Se usaron plantas de la variedad Taichung 65 de tipo natural a las dos semanas después de la siembra como miembros de un grupo de control (figura 3, a la derecha en cada placa de Petri). Las plantas se observaron una semana después del trasplante (figura 3B) y dos semanas después del trasplante (figura 3C). Como resultado, las plantas de las dos líneas G95A-1 y G95A-2 mostraron resistencia, observándose nuevo enraizamiento en las plantas de las dos líneas para todas las concentraciones de bispiribaco de sodio en el medio. Sin embargo, todas las plantas de tipo natural del grupo de control se marchitaron en el medio con bispiribaco de sodio.

Tabla 3

Medio de la prueba de enraizamiento (pH 5,8)	
Sales inorgánicas MS	
Vitaminas N6	
Sacarosa	30 g/l
Agar	8 g/l

El medio se ajustó a un volumen total de 1 litro, se autoclavó y después se le añadió bispiribaco de sodio.

5

[Ejemplo 4] Análisis de las secuencias de los genes de ALS de líneas albinas resistentes a bispiribaco de sodio.

[0037] Se colocaron hojas (aproximadamente 0,5 x 1 cm) de las dos líneas anteriores en tubos de 1,5 ml y luego se secaron a 50°C durante dos o más horas. Dentro de cada tubo se colocaron cuatro perlas de vidrio BZ-3 (Iuchiseieido), cada una con un diámetro de 3 mm. Las hojas se pulverizaron mediante un molino mezclador MM300 (Retsch). Después de la pulverización, se añadieron 300 µl de un tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM (pH 7,5), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0,5%) para suspender el producto pulverizado. La suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Un volumen de 200 µl del sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y después se añadieron 200 µl de isopropanol. El producto resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y, después, el precipitado así obtenido se secó al vacío durante 3 minutos. Se añadieron 50 µl de 1/5 x TE al precipitado. El producto resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto y de este modo se preparó una disolución de ADN genómico.

[0038] Las secuencias de todas las regiones de los genes de ALS se analizaron por secuenciación directa por PCR, usando el ADN genómico así preparado como molde y los cebadores siguientes. Para la PCR se usó ExTaq (TAKARA BIO INC.). Después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, se realizaron 40 ciclos de reacción, cada uno de ellos compuesto de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 40 segundos. Con la combinación de los cebadores ALSF2 y ALS2R, se añadió la disolución potenciadora PCRx (Invitrogen), la desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 1 minuto y después se realizaron 40 ciclos de reacción, cada uno de ellos compuesto de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto. Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y después se purificaron mediante un kit de extracción en gel Mini Elute (QUIAGEN).

[0039] Las reacciones de secuenciación se realizaron con los productos de PCR como moldes, un kit de secuenciación ABI y los cebadores siguientes. Cuando se usaron los cebadores ALSF2 y ALS2R se añadió la disolución potenciadora Sequence Rx A (Invitrogen). Se llevaron a cabo 35 ciclos de reacción de secuenciación en las condiciones siguientes, 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos. Después de la reacción de secuenciación, se determinaron las secuencias de nucleótidos mediante el analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, EE. UU.).

35

ALSF2 (5'-CCACCACCCACCATGGCTACG-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos -12 a 9 del gen de ALS y SEQ ID NO:15)

ALS2R (5'-GAAGAGGTGGTTGGTGATGA-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 326 a 345 del gen de ALS y SEQ ID NO:16)

40 ALS12 (5'-GCAACCAACCTCGTGTCCGC-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 436 a 455 del gen de ALS y SEQ ID NO:17)

ALS22 (5'-GAAGGCTTCCTGTATGACGC-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 620 a 639 del gen de ALS y SEQ ID NO:18)

45 ALS13 (5'-GAATTGCGCTGGTTTGTGA-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 868 a 887 del gen de ALS y SEQ ID NO:19)

ALS23 (5'-CTCAATTTCCCTGTACACAG-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1051 a 1071 del gen de ALS y SEQ ID NO:20)

ALS24F (5'-GGTAGCTTCCTCATGAACAT-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 1537 a 1556 del gen de ALS y SEQ ID NO:21)

50 ALS24R (5'-AATGTTTCATGAGGAAGCTAC-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1538 a 1557 del gen de ALS y SEQ ID NO:22)

ALS25 (5'-CATTGAGTCAAACATAGGCC-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1919 a 1989 del gen de ALS y SEQ ID NO:23)

55 **[0040]** Las secuencias de los genes de ALS de las dos líneas anteriores se examinaron tan como se describe anteriormente. En ambas líneas, el aminoácido 95 (glicina (GGC)) de la ALS había sido sustituido por alanina (GCC) mediante la sustitución de un solo nucleótido.

[Ejemplo 5] Construcción de un vector para la expresión de la ALS mutante G95A fusionada a GST

60

[0041] Se realizó una amplificación con un mutante de la ALS con dos mutaciones puntuales W548L/S627I

(véase el documento WO02/44385A1) derivado de arroz, incorporado en un vector pUC18, como molde, un cebador de sentido directo ALS-M5 (5'-TACCCGGGCNNNGCGTCCATGGAGATCCA-3': correspondiente a los aminoácidos 92 a 101 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24), preparado por degeneración de los codones correspondientes a la glicina 95 y un cebador antisentido ALS-RspA (5'-TGTGCTTGGTGATGGA-3'; SEQ ID NO:25) correspondiente a los aminoácidos 191 a 196 de la secuencia de aminoácidos. El producto de PCR así amplificado se clonó en un vector pT7Blue-T. Con el vector se transformó *Escherichia coli* (cepa HB-101) según un procedimiento convencional.

[0042] Con el mismo juego de cebadores se realizó PCR de colonias y análisis de secuencias. De este modo, se obtuvieron colonias en las que la glicina (GGC) 95 había mutado a serina (AGC), cisteína (TGC), tirosina (TAT), alanina (GCA), valina (GTG), leucina (CTG), isoleucina (ATA), metionina (ATG), triptófano (TGG), fenilalanina (TTT), ácido aspártico (GAT), ácido glutámico (GAG) o arginina (CGG). En el caso del mutante de alanina, se extrajo el plásmido de un cultivo líquido de *Escherichia coli* y se digirió con *Sma*I. Después de la electroforesis, se purificó un fragmento del gen de la ALS mutante a partir del gel de agarosa. El fragmento del gen se ligó a un vector pUC18 en el que se había incorporado el gen de la ALS mutante con dos mutaciones puntuales W548L/S627I derivado de arroz (que había sido digerido con *Sma*I y tratado después con BAP para su purificación). Un fragmento *Nco*I que contenía la porción de G95A se escindió del vector pUC18 así obtenido que contenía el gen de la ALS mutante con tres mutaciones puntuales G95A/W548L/S627I. El fragmento *Nco*I escindido se ligó a un vector de expresión de proteínas (pGEX-2T) para *Escherichia coli* en el que se había incorporado un gen de la ALS natural (que había sido tratado con *Nco*I y después con BAP). Por lo tanto, se obtuvo un vector de expresión pGEX-2T que contenía un gen de una ALS mutante con una única mutación puntual G95A (figura 4).

[Ejemplo 6] Confirmación de la secuencia de nucleótidos del vector pGEX-2T en el que se había incorporado el gen de la ALS mutante G95A

[0043] Las células de *Escherichia coli* (cepa JM109) transformadas con el vector se cultivaron en diez tubos (2 ml, respectivamente) a 37°C durante 12 horas. El plásmido (500 µl) se extrajo mediante un aparato de extracción de plásmidos (TOMY DP-480) y se concentró por centrifugación a aproximadamente 200 µl. El producto se desaló mediante un kit GFX para la purificación de ADN de PCR y de bandas de gel (Amersham Bioscience) y finalmente se eluyó con 200 µl de agua esterilizada. El plásmido se sometió a una reacción de secuenciación con un kit de secuenciación en ciclos BigDye Terminator, versión 1.1.

[Volumen total: 20 µl (ADN molde 13 µl, cebador (3,2 µmol/µl) 1 µl, mezcla previa 4 µl y tampón de dilución 2 µl), condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 96°C (5 minutos) y 40 ciclos, cada uno de ellos compuesto de una desnaturalización a 96°C (5 segundos), un alineamiento a 50°C (5 segundos) y una elongación a 60°C (4 minutos), seguida de una elongación en el ciclo final a 60°C (9 minutos)]

Después de la reacción de secuenciación, los nucleótidos fluorescentes en la disolución de reacción se eliminaron por filtración en gel con una columna AutoSeq G-50 (Amersham Bioscience). La muestra de reacción se midió con un analizador genético ABI PRIZM 310 y después se confirmó la secuencia. Como cebadores para la secuenciación se usaron las siguientes secuencias.

PGEX-5 (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3', cebador de sentido directo en el lado 5' del gen de ALS y SEQ ID NO:26)

ALS-RspC (5'-CAGCGACGTGTTTCGCTA-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 258 a 275 del gen de ALS y SEQ ID NO:27)

ALS-M1 (5'-CCCCAGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTT-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 510 a 539 del gen de ALS y SEQ ID NO:28)

ALS-Rsp3 (5'-CTGGGACACCTCGATGAAT-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 720 a 738 del gen de ALS y SEQ ID NO:29)

ALS-Rsp7 (5'-AACTGGGATACCAGTCAGCTC-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 886 a 906 del gen de ALS y SEQ ID NO:30)

ALS-Rsp1 (5'-GCTCTGCTACAACAGAGCAC-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 1192 a 1212 del gen de ALS y SEQ ID NO:31)

3-1-3 (5'-GATTGCCTCACCTTTCG-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1346 a 1362 del gen de ALS y SEQ ID NO:32)

4-83-10 (5'-CAGCCCAAATCCCATTTG-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1457 a 1473 del gen de ALS y SEQ ID NO:33)

3-1-4 (5'-AGGTGTCACAGTTGTTG-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 1506 a 1522 del gen de ALS y SEQ ID NO:34)

ALS-RspB (5'-TCAAGGACATGATCCTGGATGG-3', cebador de sentido directo correspondiente a los nucleótidos 1892 a 1913 del gen de ALS y SEQ ID NO:35)

ALS-Rsp2 (5'-AGTCCTGCCATCACCATCCAG-3', cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos 1906 a 1926 del gen de ALS y SEQ ID NO:36)

PGEX-3 (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG-3', cebador antisentido en el lado 3' del gen de ALS y SEQ ID NO:37)

[Ejemplo 7] Expresión del gen de la ALS mutante G95A y preparación de la ALS

[0044] Las células de *Escherichia coli* transformadas con pGEX-2T con un gen de una ALS mutante G95A preparadas en el ejemplo 6 y las mismas transformadas con pGEX-2T (véase el documento WO02/44385A1) con un gen de una ALS natural se cultivaron respectivamente con agitación (precultivo) a 27°C en 2 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina. Después se cultivaron respectivamente en 250 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina usando 1 ml del precultivo. Después del cultivo durante la noche se añadió IPTG 1 mM y se cultivaron durante 3 a 4 horas más. De este modo se indujo la expresión de la proteína de fusión con GST. Además, las células microbianas se lavaron con un tampón de extracción de ALS (tampón de fosfato de potasio (pH 7,5) con glicerol al 30% y MgCl₂ 0,5 mM) y después se almacenaron a -80°C.

[0045] La preparación y la purificación de la ALS a partir de *Escherichia coli* se llevaron a cabo por el procedimiento siguiente: primeramente, un precipitado de *Escherichia coli* almacenado a -80°C se suspendió en el tampón de extracción de ALS (2,5 ml del tampón de extracción de ALS se añadieron al precipitado obtenido de 50 ml de cultivo). La suspensión se sometió a ultrasonidos (sonicador W-225R, Heat Systems-Ultrasonics, microchip, control de salida de 8, intervalos de aproximadamente 1 segundo y dos veces cada 40 segundos) y después se centrifugó a 15.000 x g y 4°C durante 20 minutos, de modo que se obtuvo el sobrenadante como una disolución enzimática cruda. Por lo tanto, se prepararon una disolución enzimática cruda de la proteína ALS mutante G95A fusionada a GST y una disolución enzimática cruda de la proteína ALS natural fusionada a GST.

20 [Ejemplo 8] Determinación de la actividad de la ALS expresada

[0046] Se preparó una disolución de reacción para usarla en la reacción para la determinación de la actividad mediante la mezcla de la proteína de fusión GST-ALS que había de someterse a la determinación de actividad con una disolución que comprendía piruvato de sodio 20 mM, pirofosfato de tiamina 0,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, flavinadeninucleótido 10 µM, valina (añadida para la inhibición de la actividad de la ALS derivada de *Escherichia coli*) 10 mM y tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,5) Se usaron 0,5 ml de la disolución de reacción. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos después de la adición de la proteína de fusión GST-ALS que había de someterse a la determinación de actividad. La reacción se detuvo por adición de 0,05 ml de ácido sulfúrico 6 N. Después de finalizar la reacción, la disolución de reacción se sometió a una incubación a 37°C durante 60 minutos, de modo que el ácido acetoláctico presente en la disolución de reacción se transformó en acetoína. Posteriormente, para cuantificar la acetoína presente en la disolución de reacción se añadieron 0,05 ml de creatina al 0,5% (p/v) y 0,05 ml de α-naftol al 5% (p/v) disueltos en hidróxido de sodio 2,5 N, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 10 minutos. La acetoína se cuantificó después por comparación de color de la absorbancia a 525 nm de la disolución de reacción, evaluando así la actividad de la ALS. El valor en el momento 0 (horas) de la reacción se usó como valor de control. Para examinar la actividad inhibitoria del herbicida, se prepararon disoluciones acusas de bispiribaco de sodio y de piritiobaco de sodio, cada una 100 veces concentrada, y después se añadieron a la disolución de reacción. En el caso de piriminobaco, clorsulfurón, metilbensulfurón, imazaquina e imazapir, que presentan baja solubilidad en agua, se preparó una disolución 100 veces concentrada de cada uno en acetona, que después se añadió a la disolución de reacción.

40 [Ejemplo 9] Sensibilidad de la ALS mutante G95A frente a herbicidas

[0047] Se examinó la actividad inhibitoria de diversos inhibidores de la ALS frente a la ALS mutante G95A así expresada. De este modo se puso de manifiesto que la actividad inhibitoria de bispiribaco de sodio, de piritiobaco de sodio y de piriminobaco fueron extremadamente débiles (actividad inhibitoria del 50% o inferior a 100 µM), pero la inhibición por clorsulfurón fue intensa, y metilbensulfurón, imazaquina e imazapir también mostraron actividad inhibitoria (tabla 4).

Tabla 4

Sensibilidad de la ALS mutante G95A frente a herbicidas							
	BS	PS	PM	CS	BM	IQ	IP
Primero	17,9%	12,1%	22,9%	0,0023	0,268	1,653	46,041
Segundo	16,8%	12,8%	23,3%	0,0030	0,294	1,886	44,612
Tercero	18,4%	18,1%	29,2%	0,0027	0,271	1,848	49,705
Cuarto	-	-	-	0,0028	-	-	-
Quinto	-	-	-	0,0021	-	-	-
Sexto	-	-	-	0,0019	-	-	-
Media	17,7%	14,3%	25,1%	0,0025	0,278	1,80	46,8
EE	0,47%	1,9%	2,0%	0,0002	0,008	0,07	1,52
BS: bispiribaco de sodio, PS: piritiobaco de sodio, PM: piriminobaco, CS: clorsulfurón, BM: metilbensulfurón, IQ: imazaquina, IP: imazapir							

[0048] Además, en la tabla 4, la unidad de todas las cifras numéricas en las que no se indica unidad es µM (concentración inhibitoria del 50%). Las cifras numéricas indicadas con % denotan el porcentaje de inhibición a 100 µM. EE denota el error estándar.

[0049] La concentración inhibitoria del 50% de cada herbicida para la ALS mutante G95A se comparó con la concentración inhibitoria del 50% del herbicida para la ALS natural (ALS natural fusionada a GST), de modo que se calculó la razón de resistencia (razón RS) de la concentración inhibitoria del 50% para la ALS mutante G95A frente a aquella para la ALS natural. Las razones RS en los casos de piribaco de sodio, piritiobaco de sodio y piriminobaco fueron de 16.000:1 o más, 9.100:1 o más y 13.000:1 o más, respectivamente. En contraste, las razones RS en los casos de clorsulfurón, metilbensulfurón, imazaquina e imazapir fueron de 0,19:1, 40:1, 0,82:1 y 4,9:1, respectivamente. Por consiguiente, se demostró que la ALS mutante G95A muestra específicamente una fuerte resistencia a los herbicidas de PC (tabla 5 y figura 5). Además, en la figura 5, BS denota bispiribaco de sodio, PS denota piritiobaco de sodio, PM denota piriminobaco, CS denota clorsulfurón, BM denota metilbensulfurón, IQ denota imazaquina e IP denota imazapir.

Tabla 5

Razón de la resistencia contra herbicidas: ALS mutante G95A frente al tipo natural			
Herbicida	Concentración inhibitoria del 50% (μM)		Razón de resistencia (razón RS)
	Tipo natural	Mutante G95A	
Bispiribaco de sodio	0,0063	> 100	> 16.000
Piritiobaco de sodio	0,011	> 100	> 9.100
Piriminobaco	0,0080	> 100	> 13.000
Clorsulfurón	0,013	0,0025	0,19
Metilbensulfurón	0,0070	0,28	40
Imazaquina	2,2	1,8	0,82
Imazapir	9,6	47	4,9

15 [Conclusión]

[0050] Según los ejemplos anteriores, se puso de manifiesto que la proteína ALS mutante preparada mediante la introducción de una mutación G95A en la proteína natural derivada de arroz muestra resistencia específicamente a herbicidas de carboxipirimidinilo. Por lo tanto, se demostró que mediante el uso de las propiedades de la proteína ALS mutante que muestra una especificidad tan excelente, las células que expresan la proteína ALS mutante pueden seleccionarse eficazmente con certeza de las células que no expresan dicha proteína en presencia de herbicidas de PC.

[0051] Además, en los ejemplos anteriores se usó un gen de ALS derivado de arroz. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no se limita al procedimiento de transformación con el gen de la ALS mutante derivado de arroz. En general, se sabe que los genes de ALS presentan gran homología entre diferentes plantas. Además, se sabe también que una mutación específica en un gen de ALS tiene efectos similares en varias especies de plantas. Por lo tanto, según los ejemplos, se puso de manifiesto que las proteínas ALS mutantes derivadas de maíz, trigo, cebada, soja, algodón, colza, remolacha, tabaco y similares que contenían una mutación igual a la mutación G95A mostraban de manera similar resistencia específica a herbicidas de carboxipirimidinilo.

Aplicabilidad industrial

[0052] Tal como se describe en detalle anteriormente, según la presente invención, puede proporcionarse un procedimiento de transformación de una eficiencia excelente mediante el uso de una acetolactato-sintasa mutante que muestra una resistencia extremadamente alta a los herbicidas de PC como marcador de selección.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0053]

- 5 <110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD,
 UNIVERSIDAD DE TOHOKU
 <120> Procedimiento de transformación que usa un gen de una acetolactato-sintasa mutante
 <130> PH-2806-PCT
 <150> JP 2005-136186
 10 <151> 09-05-2005
 <160> 37
 <170> PatentIn, versión 2.1
 <210> 1
 15 <211> 1935
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*
 <220>
 <221> Secuencia codificante
 20 <222> (1)..(1935)
 <400> 1

```

atg gct acg acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc gcc ctg tcc gcc gcc gcg 48
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala
  1                               5                               10                               15

acg gcc aag acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc 96
Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro
                20                               25                               30

gct cga ggc cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg gtg tcc 144
Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
                35                               40                               45

ccg gtc acc ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg 192
Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
                50                               55                               60

tgg ggg ccg gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg 240
Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
  65                               70                               75                               80

ctg gag ccg tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc gcc gcg 288
Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala
                85                               90                               95

tcc atg gag atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac 336
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
                100                               105                               110

cac ctc ttc cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac 384
His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
                115                               120                               125
    
```

ES 2 372 971 T3

gcg cgc gcg tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc	432
Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro	
130 135 140	
ggg gca acc aac ctc gtc tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc	480
Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser	
145 150 155 160	
gtc ccg atg gtc gcc atc acg ggc cag gtc ccc cgc cgc atg atc ggc	528
Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly	
165 170 175	
acc gac gcc ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc	576
Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile	
180 185 190	
acc aag cac aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc	624
Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val	
195 200 205	
ata cag gaa gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg gcc cgt cct ggc ccg gtg	672
Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val	
210 215 220	
ctg gtc gac atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc	720
Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val	
225 230 235 240	
tgg gac acc tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag	768
Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys	
245 250 255	
cca ccc gcg aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag	816
Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu	
260 265 270	
tca cgg cgc ccg att ctc tat gtc ggt ggt gcc tgc tct gca tct ggt	864
Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly	
275 280 285	
gac gaa ttg cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc	912
Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr	
290 295 300	
act ctg atg ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg	960
Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu	
305 310 315 320	
cgc atg ctt ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat	1008
Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp	
325 330 335	
aag gct gac ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg	1056
Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val	
340 345 350	
aca ggg aaa att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg cac att	1104
Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile	
355 360 365	

ES 2 372 971 T3

gac att gat cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca	1152
Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser	
370 375 380	
att tgc gca gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta	1200
Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu	
385 390 395 400	
caa cag agc aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat	1248
Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn	
405 410 415	
gag ttg gac cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt	1296
Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe	
420 425 430	
ggt gaa gag atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg	1344
Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu	
435 440 445	
acg aaa ggt gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg	1392
Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met	
450 455 460	
tgg gcg gca caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct	1440
Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser	
465 470 475 480	
tcg gct ggt ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt	1488
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly	
485 490 495	
gct tct gtg gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat	1536
Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp	
500 505 510	
ggt agc ttc ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag	1584
Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu	
515 520 525	
aac ctc cct gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg	1632
Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met	
530 535 540	
gtg gtg caa tgg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca	1680
Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr	
545 550 555 560	
tac ttg ggc aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg	1728
Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val	
565 570 575	
act att gct aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag	1776
Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys	
580 585 590	
agt gaa gtc cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca	1824
Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro	

ES 2 372 971 T3

```

          595                600                605
tac ttg ttg gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg 1872
Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met
    610                615                620

atc cca agt ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc 1920
Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
    625                630                635                640

agg act gtg tat taa 1935
Arg Thr Val Tyr
    645

```

<210> 2
 <211> 644
 <212> Proteína
 5 <213> *Oryza sativa*
 <400> 2

```

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

```

ES 2 372 971 T3

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
 325 330 335
 Lys Ala Asp Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
 340 345 350
 Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
 355 360 365
 Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser
 370 375 380
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 385 390 395 400
 Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
 405 410 415
 Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
 420 425 430
 Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
 435 440 445
 Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
 450 455 460
 Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser
 465 470 475 480
 Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
 485 490 495
 Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
 500 505 510
 Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
 515 520 525
 Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
 530 535 540
 Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
 545 550 555 560
 Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
 565 570 575
 Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro
 595 600 605
 Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met
 610 615 620
 Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Val Tyr

<210> 3

<211> 638

<212> Proteína

5 <213> *Zea mays*

<400> 3

Met Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Leu Thr Gly Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Ala Thr Pro Lys Ser Arg Arg Arg Ala His His Leu Ala Thr Arg Arg
 20 25 30
 Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Leu Ser Arg Ala Thr Pro

ES 2 372 971 T3

Phe Ala Gly Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 355 360 365

Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys
 370 375 380

Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Thr Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp His Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys
 405 410 415

Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Ile Phe Asn Glu Glu Ile Gln Pro
 420 425 430

Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile
 435 440 445

Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr
 450 455 460

Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala
 465 470 475 480

Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Ala Asn Pro
 485 490 495

Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn
 500 505 510

Ile Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
 515 520 525

Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 530 535 540

Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asn Pro Glu
 545 550 555 560

Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Ala Ile Ala Lys Gly Phe
 565 570 575

Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val His Ala Ala
 580 585 590

Ile Lys Lys Met Leu Glu Ala Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile
 595 600 605

Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala
 610 615 620

Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
 625 630 635

<210> 4
 <211> 638
 <212> Proteína
 5 <213> Zea mays
 <400> 4

ES 2 372 971 T3

Met Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ser Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Thr
1 5 10 15

Ala Ala Pro Lys Ala Arg Arg Arg Ala His Leu Leu Ala Thr Arg Arg
20 25 30

Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Ala Ser Pro Ala Met Pro
35 40 45

Met Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Thr Asp Pro
50 55 60

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ser Leu Glu Arg Cys Gly Val
65 70 75 80

Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln
85 90 95

Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Ala Asn His Leu Phe Arg His Glu
100 105 110

Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Arg
115 120 125

Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
130 135 140

Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
145 150 155 160

Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
165 170 175

Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
180 185 190

Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe Phe
195 200 205

Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys
210 215 220

Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Lys Pro Met Ser
225 230 235 240

Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu
245 250 255

Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val Leu
260 265 270

Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe
275 280 285

Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly
290 295 300

ES 2 372 971 T3

Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His
 305 310 315 320
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu
 325 330 335
 Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala
 340 345 350
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 355 360 365
 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys
 370 375 380
 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys
 385 390 395 400
 Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys
 405 410 415
 Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro
 420 425 430
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile
 435 440 445
 Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr
 450 455 460
 Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala
 465 470 475 480
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 485 490 495
 Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn
 500 505 510
 Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
 515 520 525
 Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 530 535 540
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu
 545 550 555 560
 Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe
 565 570 575
 Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala
 580 585 590
 Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile
 595 600 605
 Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala
 610 615 620
 Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
 625 630 635

ES 2 372 971 T3

<210> 5
 <211> 598
 <212> Proteína
 <213> *Triticum aestivum*
 5 <400> 5

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

ES 2 372 971 T3

Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu
 260 265 270
 Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala
 275 280 285
 Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp
 290 295 300
 Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ser Lys Ile Val
 305 310 315 320
 His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His
 325 330 335
 Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Asp
 340 345 350
 Leu Leu Asn Gly Ser Lys Ala Gln Gln Gly Leu Asp Phe Gly Pro Trp
 355 360 365
 His Lys Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Phe Lys
 370 375 380
 Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His
 405 410 415
 Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp
 420 425 430
 Leu Ser Ser Ser Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala
 435 440 445
 Ala Gly Ala Ala Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp
 450 455 460
 Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg
 465 470 475 480
 Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Met Ile Leu Asn Asn Gln His Leu
 485 490 495
 Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala
 500 505 510
 His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp
 515 520 525
 Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Val Pro Ala Val Arg Val Thr
 530 535 540
 Lys Lys Ser Glu Val Thr Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro
 545 550 555 560
 Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu
 565 570 575

ES 2 372 971 T3

Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Met Glu Gly
 580 585 590

Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
 595

<210> 6
 <211> 598
 <212> Proteína
 5 <213> *Triticum aestivum*
 <400> 6

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Thr Ser Val Ala Pro Pro Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Arg Pro Trp Gly Pro Ser Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val
 20 25 30
 Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Ile Val Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly
 35 40 45
 Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile
 50 55 60
 Thr Asn His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu
 100 105 110
 Asp Ser Ile Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met
 115 120 125
 Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg
 130 135 140
 Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro
 145 150 155 160
 Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly
 165 170 175
 Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val
 180 185 190
 Pro Val Trp Asp Thr Pro Met Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu
 195 200 205
 Pro Lys Pro Pro Ser Thr Glu Ser Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val
 210 215 220
 Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala Ala
 225 230 235 240

ES 2 372 971 T3

Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val
 245 250 255

Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu
 260 265 270

Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala
 275 280 285

Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp
 290 295 300

Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ser Lys Ile Val
 305 310 315 320

His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His
 325 330 335

Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala
 340 345 350

Leu Leu Asn Gly Ser Lys Ala Gln Gln Gly Leu Asp Phe Gly Pro Trp
 355 360 365

His Lys Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Phe Lys
 370 375 380

Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His
 405 410 415

Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp
 420 425 430 435

Leu Ser Ser Ser Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala
 435 440 445

Ala Gly Ala Ala Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp
 450 455 460

Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg
 465 470 475 480

Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Met Ile Leu Asn Asn Gln His Leu
 485 490 495

Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala
 500 505 510

His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp
 515 520 525

Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Val Pro Ala Val Arg Val Thr
 530 535 540

Lys Lys Ser Glu Val Thr Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro
 545 550 555 560

ES 2 372 971 T3

Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu
 565 570 575
 Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Met Glu Gly
 580 585 590
 Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
 595

<210> 7
 <211> 659
 <212> Proteína
 5 <213> *Gossypium hirsutum*
 <400> 7

Met Ala Ala Ala Thr Ser Asn Ser Ala Leu Pro Lys Leu Ser Thr Leu
 1 5 10 15
 Thr Ser Ser Phe Lys Ser Ser Ile Pro Ile Ser Lys Ser Ser Leu Pro
 20 25 30
 Phe Ser Thr Thr Pro Gln Lys Pro Thr Pro Tyr Arg Ser Phe Asp Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Leu Ser His Ala Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ala Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Thr Gln Lys Thr Ala Pro Pro His Tyr Phe Ile Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Ala Asp Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu
 85 90 95
 Glu Arg Glu Gly Val Lys Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala Ser
 100 105 110
 Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Ile Ile Arg Asn Val
 115 120 125
 Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala
 130 135 140
 Arg Ser Ser Gly Ile Ser Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly
 145 150 155 160
 Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Met Leu Asp Ser Ile
 165 170 175
 Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr
 180 185 190
 Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr
 195 200 205
 Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Ile Val
 210 215 220

ES 2 372 971 T3

Ser Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu
 225 230 235 240

Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Val Pro Lys Trp
 245 250 255

Asn His Ser Leu Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Leu Pro Lys Ala
 260 265 270

Pro Ala Glu Ala His Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Ser Glu Ser
 275 280 285

Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Glu
 290 295 300

Glu Leu Lys Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr
 305 310 315 320

Leu Met Gly Leu Gly Ala Phe Pro Ile Ser Asp Glu Leu Ser Leu Gln
 325 330 335

Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys
 340 345 350

Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr
 355 360 365

Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp
 370 375 380

Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Met Ser Val
 385 390 395 400

Cys Ser Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Ile Asn Lys Ile Leu Glu
 405 410 415

Thr Thr Gly Ala Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Trp Arg Gln Glu
 420 425 430

Leu Asn Glu Gln Lys Leu Lys Phe Pro Leu Ser Tyr Lys Thr Phe Gly
 435 440 445

Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr
 450 455 460

Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp
 465 470 475 480

Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser
 485 490 495

Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala
 500 505 510

Ala Val Ala Asn Pro Glu Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly
 515 520 525

Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Met Arg Val Glu Asn
 530 535 540

ES 2 372 971 T3

Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val
 545 550 555 560

Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr
 565 570 575

Leu Gly Asp Pro Ser Asn Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys
 580 585 590

Phe Ala Glu Ala Cys Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Glu
 595 600 605

Asp Leu Lys Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr
 610 615 620

Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile
 625 630 635 640

Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg
 645 650 655

Thr Gln Tyr

- <210> 8
- <211> 659
- <212> Proteína
- 5 <213> *Gossypium hirsutum*
- <400> 8

Met Ala Ala Ala Thr Ala Asn Ser Ala Leu Pro Lys Leu Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Phe Lys Ser Ser Ile Pro Ile Ser Lys Ser Ser Leu Pro
 20 25 30

Phe Ser Thr Thr Pro Gln Lys Pro Thr Pro Tyr Arg Ser Phe Asp Val
 35 40 45

Ser Cys Ser Leu Ser His Ala Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ala Ala Thr
 50 55 60

Ser Val Thr Pro Lys Asn Ala Pro Pro His Asp Phe Ile Ser Arg Tyr
 65 70 75 80

Ala Asp Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu
 85 90 95

Val Arg Glu Gly Val Lys Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala Ser
 100 105 110

Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Ile Ile Arg Asn Val
 115 120 125

Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala
 130 135 140

ES 2 372 971 T3

Arg Ser Ser Gly Ile Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly
 145 150 155 160
 Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Met Leu Asp Ser Ile
 165 170 175
 Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr
 180 185 190
 Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr
 195 200 205
 Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Ile Val
 210 215 220
 Ser Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu
 225 230 235 240
 Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Val Pro Lys Trp
 245 250 255
 Asn His Ser Leu Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Leu Pro Lys Ala
 260 265 270
 Pro Gly Glu Ala His Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Ser Glu Ser
 275 280 285
 Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Glu
 290 295 300
 Glu Leu Lys Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr
 305 310 315 320
 Leu Met Gly Leu Gly Ala Phe Pro Ile Ser Asp Asp Leu Ser Leu Gln
 325 330 335
 Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys
 340 345 350
 Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr
 355 360 365
 Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp
 370 375 380
 Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Val
 385 390 395 400
 Cys Ser Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Ile Asn Lys Ile Leu Glu
 405 410 415
 Thr Lys Val Ala Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Trp Arg Gln Glu
 420 425 430
 Leu Asn Glu Gln Lys Leu Lys Phe Pro Leu Ser Tyr Lys Thr Phe Gly
 435 440 445
 Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr
 450 455 460

ES 2 372 971 T3

Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp
 465 470 475 480

Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser
 485 490 495

Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala
 500 505 510

Ala Val Ala Asn Pro Glu Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly
 515 520 525

Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn
 530 535 540

Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val
 545 550 555 560

Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr
 565 570 575

Leu Gly Asp Pro Ser Asn Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys
 580 585 590

Phe Ala Glu Ala Cys Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Glu
 595 600 605

Asp Leu Lys Ala Ala Met Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr
 610 615 620

Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile
 625 630 635 640

Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg
 645 650 655

Thr Gln Tyr

<210> 9
 <211> 637
 <212> Proteína
 5 <213> *Brassica napus*
 <400> 9

Met Ala Ser Phe Ser Phe Phe Gly Thr Ile Pro Ser Ser Pro Thr Lys
 1 5 10 15

Ala Ser Val Phe Ser Leu Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Pro Ser Phe
 20 25 30

Pro Arg Arg Arg Ala Thr Arg Val Ser Val Ser Ala Asn Ser Lys Lys
 35 40 45

Asp Gln Asp Arg Thr Ala Ser Arg Arg Glu Asn Pro Ser Thr Phe Ser
 50 55 60

ES 2 372 971 T3

Ser Lys Tyr Ala Pro Asn Val Pro Arg Ser Gly Ala Asp Ile Leu Val
65 70 75 80

Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val Asp Val Val Phe Ala Tyr Pro Gly
85 90 95

Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Asn Thr Ile
100 105 110

Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Ile Phe Ala Ala Glu
115 120 125

Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser
130 135 140

Gly Pro Gly Ala Met Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Phe
145 150 155 160

Asp Ser Val Pro Leu Ile Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met
165 170 175

Ile Gly Thr Met Ala Phe Gln Glu Thr Pro Val Val Glu Val Thr Arg
180 185 190

Thr Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Glu Val Asp Asp Ile Pro
195 200 205

Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Phe Leu Ala Thr Ser Val Arg Pro Gly
210 215 220

Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Val Gln Gln Gln Phe Ala Ile
225 230 235 240

Pro Asn Trp Glu Gln Pro Met Arg Leu Pro Leu Tyr Met Ser Thr Met
245 250 255

Pro Lys Pro Pro Lys Val Ser His Leu Glu Gln Ile Leu Arg Leu Val
260 265 270

Ser Glu Ser Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn
275 280 285

Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val
290 295 300

Ala Ser Thr Phe Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Glu
305 310 315 320

Phe Ser Leu Gln Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr
325 330 335

Ala Val Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp
340 345 350

Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile
355 360 365

Val His Ile Asp Ile Asp Ser Thr Glu Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro
370 375 380

ES 2 372 971 T3

His Val Ser Val Cys Cys Asp Val Gln Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn
 385 390 395 400
 Glu Val Leu Glu Asn Arg Arg Asp Val Leu Asp Phe Gly Glu Trp Arg
 405 410 415
 Cys Glu Leu Asn Glu Gln Arg Leu Lys Phe Pro Leu Arg Tyr Lys Thr
 420 425 430
 Phe Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Leu Leu Asp Glu
 435 440 445
 Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile Ile Thr Thr Gly Val Gly Gln His Gln
 450 455 460
 Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Arg Phe Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu
 465 470 475 480
 Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Met
 485 490 495
 Gly Ala Ala Ile Ala Asn Pro Gly Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly
 500 505 510
 Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val
 515 520 525
 Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Leu Leu Ile Asn Asn Gln His Leu Gly
 530 535 540
 Met Val Leu Gln Trp Glu Asp His Phe Tyr Ala Ala Asn Arg Ala Asp
 545 550 555 560
 Ser Phe Leu Gly Asp Pro Ala Asn Pro Glu Ala Val Phe Pro Asp Met
 565 570 575
 Leu Leu Phe Ala Ala Ser Cys Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Arg
 580 585 590
 Arg Glu Asp Leu Arg Glu Ala Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly
 595 600 605
 Pro Phe Leu Leu Asp Val Val Cys Pro His Gln Asp His Val Leu Pro
 610 615 620
 Leu Ile Pro Ser Gly Gly Thr Phe Lys Asp Ile Ile Val
 625 630 635

<210> 10

<211> 599

<212> Proteína

5 <213> *Brassica napus*

<400> 10

Met Ser His Leu Leu Pro Leu Lys Lys Pro Thr Arg Thr Arg Leu Ser
 1 5 10 15

ES 2 372 971 T3

Ser Pro Ala Thr Leu Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu
 20 25 30

Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro
 35 40 45

Gly Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Ser Thr
 50 55 60

Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala
 65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr
 85 90 95

Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Met
 100 105 110

Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg
 115 120 125

Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr
 130 135 140

Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Asp Val Asp Asp Ile
 145 150 155 160

Pro Arg Ile Val Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro
 165 170 175

Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala
 180 185 190

Ile Pro Asn Trp Asp Gln Pro Met Arg Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg
 195 200 205

Leu Pro Gln Pro Pro Glu Val Ser Gln Leu Gly Gln Ile Val Arg Leu
 210 215 220

Ile Ser Glu Ser Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Ser Leu
 225 230 235 240

Asn Ser Ser Glu Glu Leu Gly Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro
 245 250 255

Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn Asp Glu
 260 265 270

Leu Ser Leu Gln Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr
 275 280 285

Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp
 290 295 300

Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile
 305 310 315 320

Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro
 325 330 335

ES 2 372 971 T3

His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val
 355 360 365
 Trp Arg Ser Glu Leu Ser Glu Gln Lys Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe
 370 375 380
 Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Ile Leu
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln
 405 410 415
 His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Arg Lys Pro Arg Gln
 420 425 430
 Trp Leu Ser Ser Ser Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala
 435 440 445
 Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Asp Ala Ile Val Val Asp Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile
 465 470 475 480
 Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His
 485 490 495
 Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg
 500 505 510
 Ala His Thr Tyr Leu Gly Asp Pro Ala Arg Glu Asn Glu Ile Phe Pro
 515 520 525
 Asn Met Leu Gln Phe Ala Gly Ala Cys Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val
 530 535 540
 Thr Lys Lys Glu Glu Leu Arg Glu Ala Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr
 545 550 555 560
 Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Cys Pro His Gln Glu His Val
 565 570 575
 Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr Phe Lys Asp Val Ile Thr Glu
 580 585 590
 Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
 595

<210> 11
 <211> 667
 <212> Proteína
 5 <213> *Nicotiana tabacum*
 <400> 11

ES 2 372 971 T3

Met Ala Ala Ala Ala Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ala Phe Ser Lys Thr
1 5 10 15

Leu Ser Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Thr Leu Leu Pro Arg Ser Thr
20 25 30

Phe Pro Phe Pro His His Pro His Lys Thr Thr Pro Pro Pro Leu His
35 40 45

Leu Thr His Thr His Ile His Ile His Ser Gln Arg Arg Arg Phe Thr
50 55 60

Ile Ser Asn Val Ile Ser Thr Asn Gln Lys Val Ser Gln Thr Glu Lys
65 70 75 80

Thr Glu Thr Phe Val Ser Arg Phe Ala Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly
85 90 95

Ser Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val
100 105 110

Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr
115 120 125

Arg Ser Ser Ile Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly
130 135 140

Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Phe Pro Gly Val
145 150 155 160

Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu
165 170 175

Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Ile Val Ala Ile Thr Gly Gln
180 185 190

Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile
195 200 205

Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Asp
210 215 220

Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Val Arg Glu Ala Phe Phe Leu Ala Arg
225 230 235 240

Ser Gly Arg Pro Gly Pro Ile Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln
245 250 255

Gln Gln Leu Val Ile Pro Asp Trp Asp Gln Pro Met Arg Leu Pro Gly
260 265 270

Tyr Met Ser Arg Leu Pro Lys Leu Pro Asn Glu Met Leu Leu Glu Gln
275 280 285

Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly
290 295 300

Gly Gly Cys Ser Gln Ser Ser Glu Asp Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu
305 310 315 320

ES 2 372 971 T3

Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Phe Pro
 325 330 335

Thr Gly Asp Glu Leu Ser Leu Ser Met Leu Gly Met His Gly Thr Val
 340 345 350

Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Ser Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly
 355 360 365

Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser
 370 375 380

Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys
 385 390 395 400

Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Ile Lys Leu Ala Leu
 405 410 415

Gln Gly Leu Asn Ser Ile Leu Glu Ser Lys Glu Gly Lys Leu Lys Leu
 420 425 430

Asp Phe Ser Ala Trp Arg Gln Glu Leu Thr Glu Gln Lys Val Lys His
 435 440 445

Pro Leu Asn Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala
 450 455 460

Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr
 465 470 475 480

Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Lys Tyr Arg
 485 490 495

Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe
 500 505 510

Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Gly Arg Pro Asp Glu Val
 515 520 525

Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu
 530 535 540

Leu Ala Thr Ile Lys Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu
 545 550 555 560

Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr
 565 570 575

Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Asn Glu Ala
 580 585 590

Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Gly Val Pro
 595 600 605

Ala Ala Arg Val Thr His Arg Asp Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys
 610 615 620

Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His

ES 2 372 971 T3

Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu
 245 250 255
 Val Ile Pro Asp Trp Asp Gln Pro Met Arg Leu Pro Gly Tyr Met Ser
 260 265 270
 Arg Leu Pro Lys Leu Pro Asn Glu Met Leu Leu Glu Gln Ile Val Arg
 275 280 285
 Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys
 290 295 300
 Ser Gln Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile
 305 310 315 320
 Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Phe Pro Thr Gly Asp
 325 330 335
 Glu Leu Ser Leu Ser Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn
 340 345 350
 Tyr Ala Val Asp Ser Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
 355 360 365
 Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
 370 375 380
 Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
 385 390 395 400
 Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Ile Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu
 405 410 415
 Asn Ser Ile Leu Glu Ser Lys Glu Gly Lys Leu Lys Leu Asp Phe Ser
 420 425 430
 Ala Trp Arg Gln Glu Leu Thr Val Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Asn
 435 440 445
 Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
 450 455 460
 Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Ser Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
 465 470 475 480
 Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Lys Tyr Arg Lys Pro Arg
 485 490 495
 Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro
 500 505 510
 Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Gly Arg Pro Asp Glu Val Val Val Asp
 515 520 525
 Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr
 530 535 540
 Ile Lys Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn Gln

ES 2 372 971 T3

Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe
165 170 175

Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn
180 185 190

Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala
195 200 205

Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile
210 215 220

Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Ala Pro
225 230 235 240

Met Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr
245 250 255

Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Glu Arg Arg Pro
260 265 270

Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Glu Asp Val Arg
275 280 285

Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly
290 295 300

Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly
305 310 315 320

Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu
325 330 335

Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile
340 345 350

Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ser Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro
355 360 365

Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp
370 375 380

Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Val Leu Thr Gly Ser Lys
385 390 395 400

Cys Asp Lys Ser Phe Asp Phe Ala Ser Trp His Asp Glu Leu Glu Gln
405 410 415

Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile
420 425 430

Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu
435 440 445

Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln
450 455 460

Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Val Leu Ser Ser Ala Gly Leu

ES 2 372 971 T3

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
100 105 110

Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Ala Ala Ser Met Glu Ile His Gln
115 120 125

Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
130 135 140

Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
145 150 155 160

Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
165 170 175

Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
180 185 190

Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
195 200 205

Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
210 215 220

Val Met Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
225 230 235 240

Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys
245 250 255

Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg
260 265 270

Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
275 280 285

Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu
290 295 300

Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe
305 310 315 320

Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
325 330 335

Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
340 345 350

Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu
355 360 365

Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
370 375 380

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 17
 gcaaccaacc tcgtgtccgc 20
 10
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 18
 gaaggcttc tgtatgacgc 20
 20 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 19
 gaattgcgct ggttgttga 20
 <210> 20
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 35 <400> 20
 ctcaatttc cctgtcacac g 21
 <210> 21
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 21
 45 ggtagcttc tcatgaacat 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 22
 aatgtcatg aggaagctac 20
 55
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 23
 cattcaggtc aaacataggc c 21
 65 <210> 24

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <220>
 <221> Elemento mixto
 <222> 10
 <223> n es a, g, c o t
 10 <220>
 <221> Elemento mixto
 <222> 11
 <223> n es a, g, c o t
 <220>
 15 <221> Elemento mixto
 <222> 12
 <223> n es a, g, c o t
 <400> 24
 tacccgggcn nngcgtccat ggagatcca 29
 20
 <210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 25
 tgtgcttgt gatgga 16
 30 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 26
 ggctggcaa gccagtttg gtg 23
 <210> 27
 40 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 45 <400> 27
 cagcgactg ttcgcta 18
 <210> 28
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 28
 55 cccagccgc atgatcggca ccgagcctt 30
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 29
 ctgggacacc tcgatgat 19
 65

<210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 30
 aactgggata ccagtcagct c 21

10 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 31
 gctctgctac aacagagcac a 21

<210> 32
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 25 <400> 32
 gattgcctca ccttcg 17

<210> 33
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 33
 35 cagcccaaat ccattg 17

<210> 34
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 34
 aggtgtcaca gttgtg 17

45 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 35
 tcaaggacat gatcctggat gg 22

55 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 36
 agtctgcca tcaccatcca g 21

<210> 37
 65 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

5 <400> 37

ccgggagctg catgtgtcag agg

23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de transformación que comprende las etapas de:

5 transformación de una célula hospedadora con un vector de recombinación que contiene un gen de interés y un gen que codifica una acetolactato-sintasa vegetal mutante con una mutación de glicina a alanina en un resto de glicina correspondiente a la posición 95 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

10 cultivo de la célula transformada obtenida en la primera etapa en presencia de un herbicida de carboxipirimidinilo, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante se usa como marcador de selección.

2. El procedimiento de transformación según la reivindicación 1, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante es un gen que codifica la proteína (a) o (b) siguiente:

15 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a 14.

20 3. El procedimiento de transformación según las reivindicaciones 1 ó 2, en que la célula hospedadora es una célula vegetal.

4. El procedimiento de transformación según la reivindicación 3, en el que dicha célula hospedadora es una célula de arroz, maíz, trigo, cebada, soja, algodón, colza, remolacha, raigrás italiano, tabaco o *Arabidopsis thaliana*.

25 5. Un procedimiento para el cultivo de una planta, que comprende las etapas de:

transformación de una célula vegetal con un vector de recombinación que contiene un gen de interés y un gen que codifica una acetolactato-sintasa vegetal mutante con una mutación de glicina a alanina en un resto de glicina correspondiente a la posición 95 de SEQ ID NO:2;

30 cultivo de la planta transformada obtenida en la etapa anterior en presencia de un herbicida de carboxipirimidinilo, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante se usa como marcador de selección.

35 6. El procedimiento para el cultivo de una planta según la reivindicación 5, en que el gen que codifica la acetolactato-sintasa mutante es un gen que codifica la proteína (a) o (b) siguiente:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a 14.

40 7. El procedimiento según las reivindicaciones 5 ó 6, en que dicha planta es arroz, maíz, trigo, cebada, soja, algodón, colza, remolacha, raigrás italiano, tabaco o *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 1

ALS natural	1	MATTA	60
ALS mutante G95A	1	60
ALS natural	61	PLR	120
ALS mutante G95A	61A.....	120
ALS natural	121	EAF	180
ALS mutante G95A	121	180
ALS natural	181	QET	240
ALS mutante G95A	181	240
ALS natural	241	WDT	300
ALS mutante G95A	241	300
ALS natural	301	PVT	360
ALS mutante G95A	301	360
ALS natural	361	SRA	420
ALS mutante G95A	361	420
ALS natural	421	QKR	480
ALS mutante G95A	421	480
ALS natural	481	SAG	540
ALS mutante G95A	481	540
ALS natural	541	HLM	600
ALS mutante G95A	541	600
ALS natural	601	KML	644
ALS mutante G95A	601	644

Fig. 2-1

ALS natural	1	ATGGCTAGCACCGCGCGCGCGCCCTGTC	60
ALS mutante G95A	1	60
ALS natural	61	GGCCGTAAAGAACACCAGGACACACCGT	120
ALS mutante G95A	61	120
ALS natural	121	GGGTCAGGTGCTCGGCGGTTC	180
ALS mutante G95A	121	180
ALS natural	181	CCGCTCGGGCGGTGGGGCGGGCGGAGCC	240
ALS mutante G95A	181	240
ALS natural	241	CTGGAGCGGTGCGGGCTCAGCGACGTG	300
ALS mutante G95A	241	300
ALS natural	301	CACCAGCGCTGACGGCTCCCGGT	360
ALS mutante G95A	301	360
ALS natural	361	GAGGGTTGGGCGGTCCGGTACGGGGG	420
ALS mutante G95A	361	420
ALS natural	421	ACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCT	480
ALS mutante G95A	421	480
ALS natural	481	GTCCCGATGGTCCGCATCAGGGCCAGG	540
ALS mutante G95A	481	540
ALS natural	541	CAGGAGAGCCCCATAGTCAGGTACCC	600
ALS mutante G95A	541	600
ALS natural	601	GATGTGGAGGACATCCCCCGGT	660
ALS mutante G95A	601	660

Fig. 2-2

ALS natural	661	CCTGGCCCGG	TGCTGGTGGACATCC	CCCAAGGACATCC	AGCAGAGATGG	CGCGTCCCGGTC	720
ALS mutante G95A	661	720
		*****	*****	*****	*****	*****	
ALS natural	721	TGGGACACCTGGATGAAT	CTACCAGGGTACA	TGCAGCCCTGCCCAAG	CCACCCCGGACA		780
ALS mutante G95A	721		780
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	781	GAATTGCTTGACAGG	TCTTGGCTGGT	TGGGAGTCA	CGGGCCCGGATTC	TCTATGTC	840
ALS mutante G95A	781		840
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	841	GGTGGTGGCTGCTCTGCAT	CTGGTACGAA	TTGGGCTGGTTG	TGAGCTGACTGGTATC		900
ALS mutante G95A	841		900
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	901	CCAGTTACAACC	ACTCTGATGGGCTGG	CAATTC	CCCCAGTACGAC	CCCGTTGTCCCTG	960
ALS mutante G95A	901		960
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	961	CGCATGCTTGGATG	CATGGCAGCGGT	TACCCAA	TTATCCCGTGG	ATAAGGCTGACCTG	1020
ALS mutante G95A	961		1020
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	1021	TTGCTTGGCTTGGT	GCGGTTGATG	TGATCGTGC	ACAGGAAAT	TGAGGCTTTTGCA	1080
ALS mutante G95A	1021		1080
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	1081	AGCAGGCCA	AGATTGTCACAT	TGACATTC	ATCCACAGAGAT	TGGAAGACAAACCAA	1140
ALS mutante G95A	1081		1140
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	1141	CCACATGTGCA	ATTTGGCCAGATG	TAAAGCTTGC	TTACAGGGCT	TGAATGCTCTGCTA	1200
ALS mutante G95A	1141		1200
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	1201	CAACAGAGCA	CAACAAGACAAG	TCTGATTT	AGTGCATGG	CACAATGAGTTGGACCAG	1260
ALS mutante G95A	1201		1260
		*****	*****	*****	*****		
ALS natural	1261	CAGAAGAGG	AGATTCCCTCTGG	GTACAAA	CTTTTGGTGA	AGAGATCC	1320
ALS mutante G95A	1261		1320
		*****	*****	*****	*****		

Fig. 2-3

ALS natural	1321	GCCATTCAGGTCGTGGATGAGCTACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGCTGTTGGG	1380
ALS mutante G95A	1321	1380

ALS natural	1381	CAGCACCAGATGTGGGGCCACAATATTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCT	1440
ALS mutante G95A	1381	1440

ALS natural	1441	TGGGCTGGCTGGGGCGCAATGGGATTTGGGGTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTGTGGCT	1500
ALS mutante G95A	1441	1500

ALS natural	1501	AAGCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATGATGGGGATGGTAGCTTCCCTCATGAACATTGAG	1560
ALS mutante G95A	1501	1560

ALS natural	1561	GAGCTGGCATTGATCCGCAATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAA	1620
ALS mutante G95A	1561	1620

ALS natural	1621	CATTTGGGTATGGTGGTCAAATGGGAGGATAGGTTTTACAGGCCGAA TAGGGGGCATAACA	1680
ALS mutante G95A	1621	1680

ALS natural	1681	TACTTGGGCAACCCGGAAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAG	1740
ALS mutante G95A	1681	1740

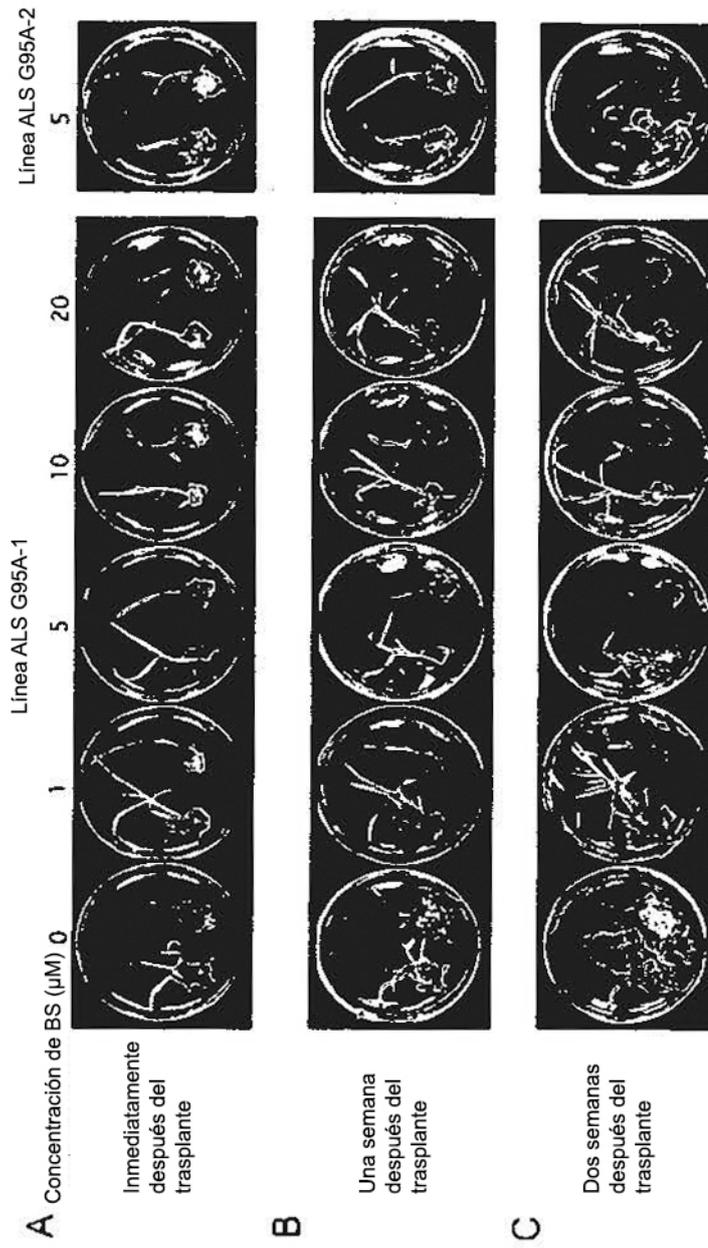
ALS natural	1741	GGGTTCAATATTCCTGAGTCCGTGTAAACAAGACAGTGAAGTCCGTCCCGCCATCAAG	1800
ALS mutante G95A	1741	1800

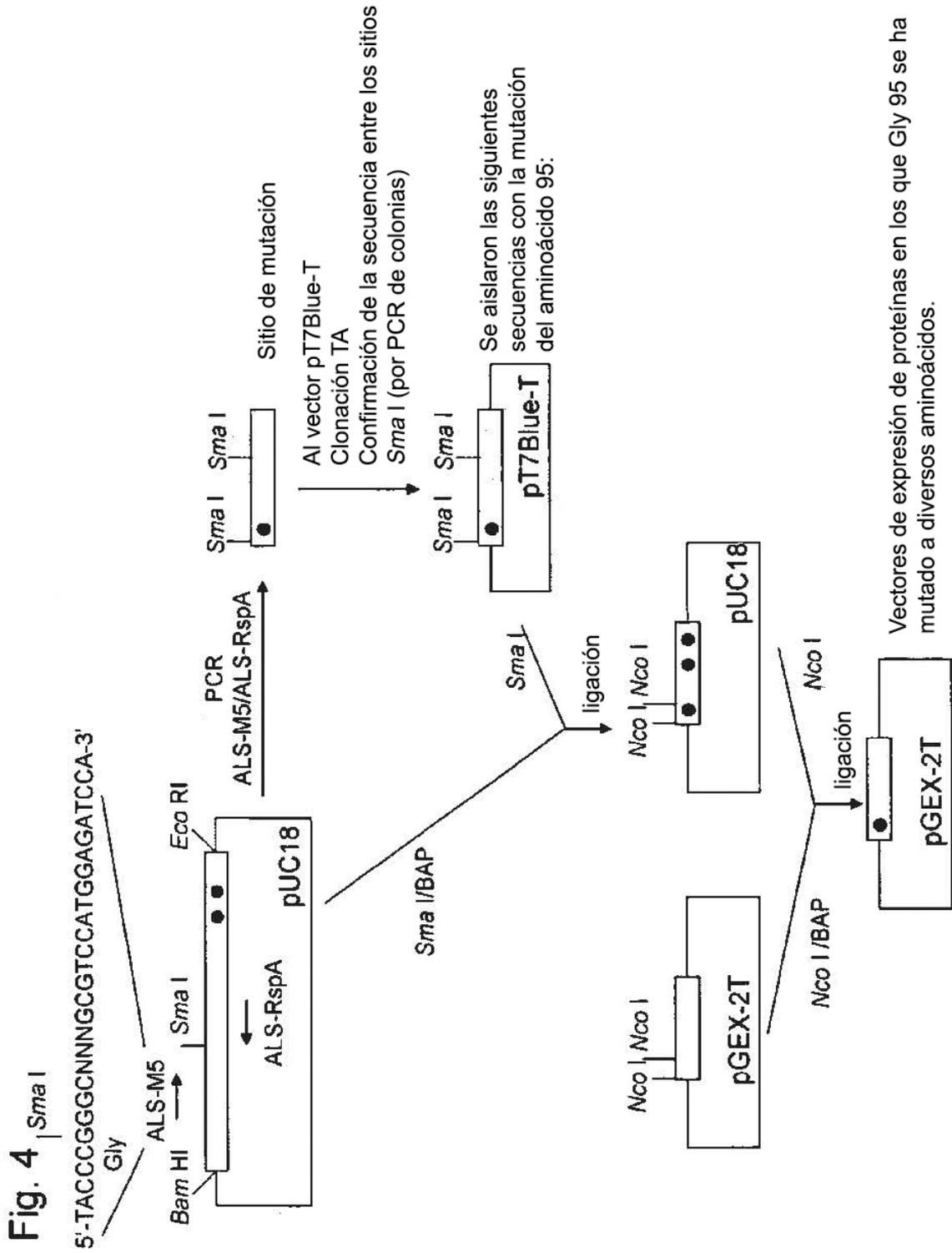
ALS natural	1801	AAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCCAGGAGCAT	1860
ALS mutante G95A	1801	1860

ALS natural	1861	GTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGCCGATTAAGGACATGATCCTGGATGGTGTGATGGC	1920
ALS mutante G95A	1861	1920

ALS natural	1921	AGGACTGTGTATTAA	1935
ALS mutante G95A	1921	1935

Fig. 3





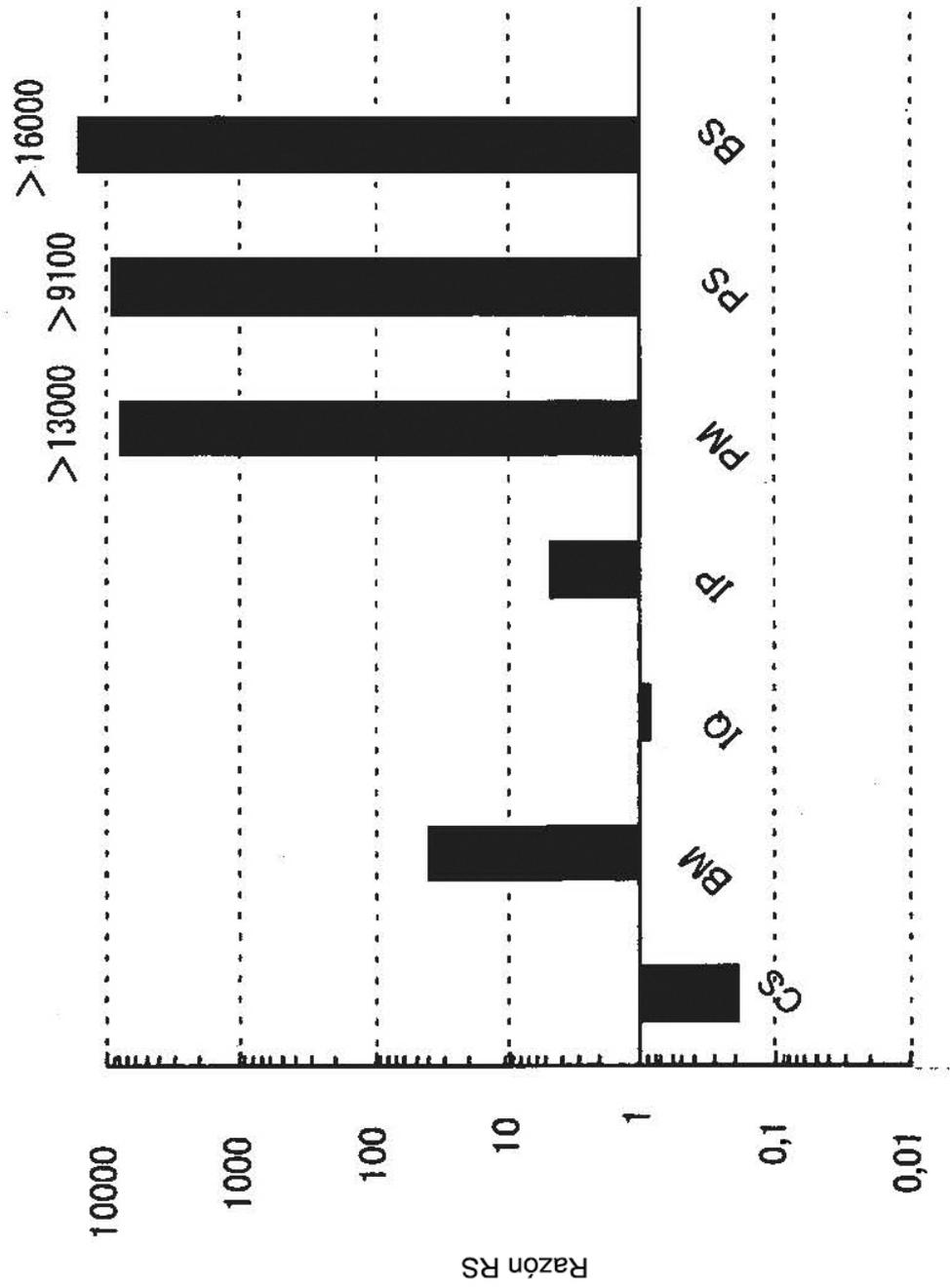


Fig. 5