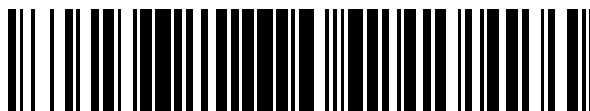


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 623**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/60** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 9/88** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02753967 .5**  
96 Fecha de presentación: **10.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1414976**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **PLANTAS DE TRIGO CON RESISTENCIA INCREMENTADA A HERBICIDAS DE  
IMIDAZOLINONA.**

30 Prioridad:  
**09.08.2001 US 311180 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.03.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN  
Office of Research Services Room 208 Kirk Hall  
117 Science Place  
Saskatoon, Saskatchewan S7N 5C8, CA**

72 Inventor/es:  
**HUCL, Pierre**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 377 623 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

Plantas de trigo con resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona

## 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en general, a plantas de trigo que tienen una resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona. Más específicamente, la presente invención se refiere a plantas de trigo obtenidas mediante mutagénesis y cruce y transformación, que tienen una resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS; EC 4.1.3.18) es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh B. K., 1999 Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine en: Singh B. K. (Comp.) Plant amino acids. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Nueva York, págs. 227-247). AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicidas estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (LaRossa RA y Falco SC, 1984 Trends Biotechnol. 2: 158-161), las imidazolinonas (Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian y Gerwick, 1989 Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines en (comp.) Whitaker JR. Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. págs. 277-288) y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al., 1990 Plant Physiol 94: 239-244). Herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea se utilizan ampliamente en la agricultura moderna debido a su eficacia a tasas de aplicación muy bajas y a su no toxicidad relativa en animales. Al inhibir la actividad de AHAS, estas familias de herbicidas evitan el crecimiento y desarrollo adicionales de plantas susceptibles que incluyen muchas especies de malas hierbas. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona comercialmente disponibles son PURSUIT® (imazethapyr), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapyr). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorosulfurona, metsulfurona-metilo, sulfometurona-metilo, clorimuron-etilo, tifensulfuron-metilo, tribenuron-metilo, bensulfuron-metilo, nicosulfurona, etametsulfuron-metilo, rimsulfurona, triflursulfuron-metilo, triasulfurona, primisulfuron-metilo, cinosulfurona, amidosulfurona, fluzasulfurona, imazosulfurona, pirazosulfuron-etilo y halosulfurona.

Debido a su elevada eficacia y/o baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona son aceptados para la aplicación mediante pulverización sobre la parte superior o copa de una amplia zona de vegetación. La capacidad de pulverizar un herbicida sobre la parte superior o copa de una amplia gama de vegetación disminuye los costes asociados con el establecimiento y mantenimiento de la plantación y disminuye la necesidad de una preparación del sitio antes del uso de productos químicos de este tipo. La pulverización por encima de la parte superior de una especie tolerante deseada también da como resultado la capacidad de conseguir un potencial de rendimiento máximo de la especie deseada debido a la ausencia de especies competitivas. Sin embargo, la capacidad de utilizar técnicas de pulverización de este tipo depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada en la zona de pulverización.

Entre las cosechas agrícolas principales, algunas especies de leguminosas tales como la soja son resistentes por naturaleza a herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad de metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner y Robinson, 1985 Weed. Sci. 33:469-471). Otras cosechas tales como maíz (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882-886) y arroz (Barrette et al., 1989 Crop Safeners for Herbicides, Academic Press Nueva York, págs. 195-220) son algo susceptibles a herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona depende de la naturaleza química del herbicida particular y del metabolismo diferencial del compuesto de una forma tóxica a una forma no tóxica en cada una de las plantas (Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:545-546; Brown et al., 1987 Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Otras diferencias fisiológicas de las plantas tales como la absorción y translocación juegan también un papel importante en la sensibilidad (Shaner y Robinson, 1985, Weed. Sci. 33:469-471).

Cultivares de cosechas resistentes a imidazolinona, sulfonilureas y triazolopirimidinas han sido producidos con éxito utilizando la mutagénesis en las semillas, microesporas, el polen y el callo en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (Sebastian et al., 1989 Crop Sci. 29:1403-1406; Swanson et al., 1989 Theor. Appl. Genet. 78:525-530; Newhouse et al., 1991 Theor. Appl. Genet. 83:65-70; Sathasivan et al., 1991

Plant Physiol. 97:1044-1050; Mourand et al., 1993 J. Heredity 84:91-96). En todos los casos, un único gen nuclear parcialmente dominante confería resistencia. Cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona fueron también previamente aisladas después de la mutagénesis en las semillas de *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882-886). Estudios de herencia confirmaron que un único gen, parcialmente dominante, confería resistencia. En base a estudios alélicos, los autores concluyeron que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas estaban situadas en el mismo locus. Uno de los genes de resistencia al cultivar Fidel se designó FS-4 (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882-886).

El modelado basado en ordenador de la conformación tridimensional del complejo AHAS-inhibidor predice varios aminoácidos en la bolsa de unión del inhibidor propuesta como sitios en los que mutaciones inducidas conferirían probablemente resistencia selectiva a imidazolinonas (Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368). Plantas de trigo, producidas con algunas de estas mutaciones racionalmente diseñadas en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS han exhibido, de hecho, resistencia específica a una sola clase de herbicidas (Ott et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:359-368).

La resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona también ha sido reseñada en un cierto número de patentes. Las patentes de EE.UU. nºs 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 y 6.222.100 describen en general el uso de un gen AHAS alterado para inducir una resistencia a herbicidas en plantas y, específicamente, describe determinadas líneas de maíz resistentes a imidazolinona. La patente de EE.UU. nº 5.013.659 describe plantas que exhiben una resistencia a herbicidas que poseen mutaciones en al menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas en esta memoria codifican la resistencia cruzada a imidazolinonas y sulfonilureas, o una resistencia específica a sulfonilureas, pero no se describe ninguna resistencia específica a imidazolinonas. Adicionalmente, la patente de EE.UU. nº 5.731.180 y la patente de EE.UU. nº 5.767.361 discuten un gen aislado con una sustitución en un sólo aminoácido en una secuencia de aminoácidos AHAS de monocotiledóneas de tipo salvaje que da como resultado una resistencia específica para imidazolinona.

Hasta la fecha, la técnica anterior no ha descrito plantas de trigo resistentes a imidazolinona que contengan más de un gen AHAS alterado. Tampoco la técnica anterior ha descrito plantas de trigo resistentes a imidazolinona que contengan mutaciones en genomas distintos que el genoma del que se deriva el gen FS-4. Por lo tanto, lo que se necesita en la técnica es la identificación de genes de resistencia a imidazolinona procedentes de genomas adicionales. Lo que también se necesita en la técnica son plantas de trigo que tengan una resistencia incrementada a herbicidas tales como imidazolinona y que contengan más de un gen AHAS alterado. También se necesitan métodos para reprimir el crecimiento de las malas hierbas en la vecindad de plantas de trigo de este tipo. Estas composiciones y métodos permitirían el uso de técnicas de pulverización cuando se aplican herbicidas a zonas que contienen plantas de trigo.

El documento EP-A-0 508 161 y Newhouse et al. (Tolerance to imidazolinone Herbicides in Wheat Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, EE.UU. vol. 100, nº 2, 16 de marzo de 1992 (16-03-1992), páginas 882-886) describen mutantes de AHAS procedentes de trigo que son resistentes a herbicidas de imidazolinona.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define por el juego de reivindicaciones adjunto. La presente invención proporciona plantas de trigo que comprenden ácidos nucleicos IMI de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Las plantas de trigo de acuerdo con la reivindicación 1 pueden contener uno, dos, tres o más ácidos nucleicos IMI. En una realización, la planta de trigo comprende múltiples ácidos nucleicos IMI situados en diferentes genomas. Preferiblemente, los ácidos nucleicos IMI codifican proteínas que comprenden una mutación en el Dominio E, a saber una sustitución de asparagina por serina. Se proporcionan también partes de la planta y semillas derivadas de las plantas de trigo descritas en esta memoria. La planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI que no es un ácido nucleico Imil.

Los ácidos nucleicos IMI de la presente invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de SEQ ID NO:1.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas. Ejemplos de plantas de trigo no transgénicas que tienen una resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona incluyen una planta de trigo con un Número de Designación de Depósito de Patente en ATCC PTA-4113; o un mutante, recombinante o derivado tratado mediante ingeniería genética de la planta con un Número de Designación de Depósito de Patente en ATCC PTA-4113; o cualquier progenie de la planta con un Número de Designación de Depósito de Patente en ATCC PAT-4113; o una planta que es una progenie de cualquiera de estas plantas.

Además de las composiciones de la presente invención, se proporcionan varios métodos. Se describen en esta memoria métodos para modificar una tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona, que comprende modificar la expresión de un ácido nucleico IMI en la planta de acuerdo con la reivindicación 26. Se describen también métodos para producir una planta transgénica con una tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona, que comprenden transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos IMI y generar la planta a partir de la célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 28. La invención incluye, además, un método para reprimir las malas hierbas dentro de la vecindad de una planta de trigo, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y a la planta de trigo, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada al herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo, y en donde la planta comprende uno o más ácidos nucleicos IMI de acuerdo con la reivindicación 31. En algunas realizaciones preferidas de estos métodos, las plantas comprenden múltiples ácidos nucleicos IMI que están situados en diferentes genomas del trigo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la secuencia parcial de ADNc de Einkorn IMI3 (SEQ ID NO:1).

La Figura 2 muestra la secuencia parcial de ADNc de Einkorn IMI3 en comparación con una secuencia Einkorn de tipo salvaje (SEQ ID NO:2) y una secuencia consenso (SEQ ID NO:3).

La Figura 3 es una representación esquemática de las secuencias de aminoácidos conservadas en los genes AHAS implicados en la resistencia a diversos inhibidores de AHAS. El sitio específico del aminoácido responsable de la resistencia se indica por un subrayado. (Modificado de Devine, M. D. y Eberlein, C. V., 1997, Physiological biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites in Herbicide Activity: Toxicity, Biochemistry, and Molecular Biology, IOS Press Amsterdam, págs. 159-185).

La Figura 4 es una tabla que muestra líneas parentales de trigo utilizadas para determinar las relaciones alélicas entre genes IMI.

La Figura 5 es una tabla que muestra datos de la segregación F2 que demuestran la localización de la mutación EM2 en el genoma A.

La Figura 6 es una tabla que muestra diversas características agronómicas que podrían verse afectadas por la lesión provocada por el herbicida tanto en plantas control Einkorn como en plantas con EM2.

La Figura 7 es una tabla que muestra la evaluación de una planta control Einkorn y plantas con EM2 para la lesión global de la cosecha en tres concentraciones de imazamox.

La Figura 8 es una tabla que muestra resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona en cultivares de trigo tras el apilamiento de ácidos nucleicos IMI.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se dirige a plantas de trigo, partes de plantas de trigo y células vegetales de trigo con una resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona. La presente invención incluye también semillas producidas por las plantas de trigo descritas en esta memoria, y métodos para reprimir las malas hierbas en la vecindad de las plantas de trigo descritas en esta memoria. Ha de entenderse que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un" o "una" pueden significar uno o una o más, dependiendo del contexto en donde se utilice. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que se puede utilizar al

menos una célula.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “planta de trigo” se refiere a una planta que es un miembro del género *Triticum*. Las plantas de trigo de la presente invención pueden ser miembros de un género *Triticum* que incluye, pero no se limita a *T. aestivum*, *T. turgidum*, *T. timopheevii*, *T. monococcum*, *T. zhukovskyi* y *T. urartu*, e híbridos de las mismas. Ejemplos de subespecies de *T. aestivum* incluidas dentro de la presente invención son *aestivum* (trigo común), *compactum* (trigo club o racimoso), *macha* (trigo macha), *vavilovi* (trigo vavilovi), *spelta* y *sphaerococcum* (trigo de disparo). Ejemplos de subespecies de *T. turgidum* incluidas dentro de la presente invención, son *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*, *durum*, *paleocolchicum*, *polonicum*, *turanicum* y *dicoccoides*. Ejemplos de subespecies de *T. monococcum* incluidas dentro de la presente invención son *monococcum* (einkorn) y *aegilopoides*. En una realización de la presente invención, la planta de trigo es un miembro de la especie *Triticum monococcum* y, más particularmente, el acceso Einkorn.

La expresión “planta de trigo” pretende abarcar plantas de trigo en cualquier fase de madurez o desarrollo, así como cualesquiera tejidos u órganos (partes de planta) tomados o derivados de cualesquiera plantas de este tipo, a menos que se indique claramente otra cosa por el contexto. Partes de planta incluyen, pero no se limitan a tallos, raíces, flores, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, otros cultivos, gametofitos, esporofitos, polen, microesporas, protoplastos y similares. La presente invención incluye también semillas producidas por las plantas de trigo de la presente invención. En una realización, las semillas son puras para una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la semilla de la planta de trigo.

La presente invención describe una planta de trigo que comprende uno o más ácidos nucleicos IMI, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “ácido nucleico IMI” se refiere a un ácido nucleico que está mutado a partir de un ácido nucleico de AHAS en una planta de trigo de tipo salvaje que confiere resistencia incrementada a imidazolinona a una planta en la que se transcribe. En una realización, la planta de trigo comprende múltiples ácidos nucleicos IMI. Tal como se utiliza cuando se describen los ácidos nucleicos IMI, el término “múltiples” se refiere a ácidos nucleicos IMI que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y no se refiere a un mero incremento en el número del mismo ácido nucleico IMI. Por ejemplo, los ácidos nucleicos IMI pueden ser diferentes debido al hecho de que se derivan de o están localizados en diferentes genomas del trigo.

Es posible que las plantas de trigo de la presente invención tengan múltiples ácidos nucleicos IMI procedentes de diferentes genomas, ya que estas plantas pueden contener más de un genoma. Por ejemplo, una planta de trigo de *Triticum aestivum* contiene tres genomas, a los que, a veces, se les alude como los genomas A, B y D. Dado que AHAS es una enzima metabólica requerida, se asume que cada uno de los genomas tenga al menos un gen que codifique la enzima AHAS, lo que se observa habitualmente con otras enzimas metabólicas en trigo hexaploide que han sido representadas en mapa. El ácido nucleico de AHAS en cada uno de los genomas puede, y habitualmente lo hace, diferir en su secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico AHAS en otro genoma. Un experto en la técnica puede determinar el genoma de origen de cada uno de los ácidos nucleicos de AHAS a través de cruce genético y/o métodos de secuenciación o métodos de digestión con exonucleasas conocidos por los expertos en la técnica. Para los fines de esta invención, ácidos nucleicos IMI derivados de uno de los genomas A, B o D se distinguen y designan como ácidos nucleicos Imi1, Imi2 o Imi3. No se establece en esta memoria que cualquier clase particular de ácido nucleico IMI se correlacione con cualquier genoma particular A, B o D. Por ejemplo, no se establece en esta memoria que los ácidos nucleicos Imi1 se correlacionen con los ácidos nucleicos del genoma A, que los ácidos nucleicos Imi2 se correlacionen con los ácidos nucleicos del genoma B, etc. Las designaciones Imi1, Imi2 e Imi3 indican simplemente que los ácidos nucleicos IMI dentro de cada una de estas clases no se segrega independientemente, mientras que dos ácidos nucleicos IMI procedentes de diferentes clases se segregan independientemente y, por lo tanto, se pueden derivar de diferentes genomas de trigo.

La clase Imi1 de ácidos nucleicos incluye el gen FS-4 según se describe por Newhouse et al. (1992, Plant Physiol. 100:882-886). La clase Imi3 de ácidos nucleicos incluye el gen IMI3 de Einkorn descrito más abajo. Cada una de las clases Imi puede incluir miembros procedentes de diferentes especies de trigo. Por lo tanto, cada una de las clases Imi incluye ácidos nucleicos IMI que difieren en su secuencia de nucleótidos, pero que, no obstante, se designan como procedentes de o situados en el mismo genoma de trigo utilizando estudios de herencia tal como

se conoce por los expertos ordinarios en la técnica.

Por consiguiente, la presente invención incluye una planta de trigo que comprende uno o más ácidos nucleicos IMI de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona, en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, y en donde el uno o más ácidos nucleicos IMI se seleccionan de un grupo que consiste en un ácido nucleico Imi1, Imi2 e Imi3, en donde la planta comprende un ácido nucleico Imi3. En una realización preferida, el ácido nucleico Imi3 comprende la secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. En otra realización, la planta comprende, además, un ácido nucleico Imi1 o un ácido nucleico Imi2.

Tal como se utiliza en esta memoria con respecto a los ácidos nucleicos, la expresión “procedente de” se refiere a un ácido nucleico “situado en” o “derivado de” un genoma particular. La expresión “situado en” se refiere a un ácido nucleico contenido dentro de ese genoma particular. Tal como se utiliza en esta memoria con respecto a un genoma, la expresión “derivado de” se refiere a un ácido nucleico que ha sido separado o aislado de ese genoma. El término “aislado” se define con mayor detalle más abajo.

En otra realización, la planta de trigo de acuerdo con la reivindicación 1 comprende un ácido nucleico IMI, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico no Imi1. La expresión “no Imi1” se refiere a un ácido nucleico IMI que no es un miembro de la clase Imi1 según se describe arriba. Un ejemplo de un ácido nucleico no Imi1 es la secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. Por consiguiente, en una realización preferida, la planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI que comprende la secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1.

La presente invención incluye plantas de trigo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprenden uno, dos, tres o más ácidos nucleicos IMI, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Los ácidos nucleicos IMI pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de SEQ ID NO:1. Se describe también un polinucleótido que comprende al menos 60 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:1, y un polinucleótido complementario a SEQ ID NO:1.

El herbicida de imidazolinona se puede seleccionar, pero no se limita a PURSUIT® (imazethapyr), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), un derivado de cualquiera de los herbicidas antes mencionados o una mezcla de dos o más de los herbicidas antes mencionados, por ejemplo imazapyr/imazamox (ODYSSEY®). Más específicamente, el herbicida de imidazolinona se puede seleccionar de, pero no se limita a ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolina-carboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-tolueno de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-tolueno de metilo. Se prefiere el uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico. Se prefiere particularmente el uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

En una realización, la planta de trigo comprende dos ácidos nucleicos IMI, en donde los ácidos nucleicos se derivan de o están situados en diferentes genomas del trigo, en donde uno de los dos ácidos nucleicos es un ácido nucleico Imi3 según se define en la reivindicación 1. Más preferiblemente, el ácido nucleico Imi3 comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:1. En otra realización, la planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:1. Todavía en otra realización, la planta de trigo de acuerdo con la reivindicación 1 comprende tres o más ácidos nucleicos IMI, en donde cada uno de los ácidos nucleicos procede de un genoma diferente. Preferiblemente, al menos uno de los tres ácidos nucleicos IMI comprende una secuencia de polinucleótidos según se muestra en SEQ ID NO:1.

Se describe también que uno o más ácidos nucleicos IMI contenidos dentro de la planta codifican una secuencia de aminoácidos que comprende una mutación en un dominio que se conserva entre varias proteínas AHAS. A estos dominios conservados se les alude en esta memoria como Dominio A, Dominio B, Dominio C, Dominio D y Dominio E. La Figura 2 muestra la localización general de cada uno de los dominios en una proteína AHAS. El

Dominio A contiene la secuencia de aminoácidos AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO: 4). El Dominio B contiene la secuencia de aminoácidos QWED (SEQ ID NO: 5). El Dominio C contiene la secuencia de aminoácidos VFAYPGGASMEIHQLATRS (SEQ ID NO: 6); El Dominio D contiene la secuencia de aminoácidos AFQETP (SEQ ID NO: 7). El Dominio E contiene la secuencia de aminoácidos IPSGG (SEQ ID NO: 8).

5 Se describe también que pueden existir ligeras variaciones en los dominios conservados, por ejemplo en plantas de neguilla, el residuo serina en el dominio E está reemplazado por un residuo alanina.

10 Se describe también una planta de trigo que comprende un ácido nucleico IMI que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación en un dominio conservado, seleccionado del grupo que consiste en un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E. La planta de trigo puede comprender un ácido nucleico IMI que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación en un Dominio E. Las mutaciones en los dominios conservados pueden producirse en las localizaciones indicadas por los siguientes subrayados. AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO: 4), QWED (SEQ ID NO: 5); VFAYPGGASMEIHQALTRS (SEQ ID NO: 6); AFAQETP (SEQ ID NO: 7) e IPSGG (SEQ ID NO: 8). Una sustitución comprendida por la presente invención es serina por asparagina en el Dominio E (SEQ ID NO: 8).

20 Las plantas de trigo descritas en esta memoria pueden ser plantas de trigo transgénicas o plantas de trigo no transgénicas. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula vegetal, callo, tejido de la planta o parte de planta que contenga la totalidad o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, la totalidad o parte del polinucleótido recombinante está establemente integrada en un cromosoma o elemento extracromosómico estable, de modo que es pasado a generaciones sucesivas. Para los fines de la invención, la expresión "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que ha sido alterado, re-ordenado o modificado mediante ingeniería genética. Ejemplos incluyen cualquier polinucleótido o polinucleótidos clonados que están enlazados o unidos a secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones que resultan de fenómenos que se producen de forma natural tal como mutaciones espontáneas, o de mutagénesis no espontánea seguida por cultivo selectivo. A plantas que contienen mutaciones que surgen debido a mutagénesis no espontánea y a cultivos selectivos se les alude en esta memoria como plantas no transgénicas y están incluidas en la presente invención. En realizaciones en las que la planta de trigo es transgénica y comprende múltiples ácidos nucleicos IMI, los ácidos nucleicos se pueden derivar de diferentes genomas o del mismo genoma. Alternativamente, en realizaciones en donde la planta de trigo no es transgénica y comprende múltiples ácidos nucleicos IMI, los ácidos nucleicos están situados en diferentes genomas o en el mismo genoma.

35 Un ejemplo de un cultivar de plantas de trigo no transgénico que comprende un ácido nucleico IMI es el cultivar de planta depositado ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113 y se designa en esta memoria como el cultivar de trigo Einkorn IMI. El cultivar de trigo Einkorn IMI contiene un ácido nucleico Imi3. La secuencia de nucleótidos parcial correspondiente al gen Einkorn IMI se muestra en SEQ ID NO: 1.

40 Un depósito de 2500 semillas de los cultivares de trigo Einkorn IMI se realizó ante la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, el 4 de marzo de 2002. El depósito se realizó de acuerdo con los términos y provisiones del Tratado de Budapest relacionado con el depósito de microorganismos. El depósito se hizo para un plazo de al menos treinta años y al menos cinco años después de haber sido recibida por la ATCC la petición más reciente para la provisión de una muestra del depósito. A las semillas depositadas se les asignó el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.

50 La presente invención incluye la planta de trigo que tiene el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; un mutante, recombinante o derivado tratado mediante ingeniería genética de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; cualquier progenie de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; y una planta que es la progenie de cualquiera de estas plantas. En una realización preferida, la planta de trigo de la presente invención tiene adicionalmente las características de resistencia a herbicidas de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.

55 También se incluyen en la presente invención híbridos de los cultivares de trigo Einkorn IMI descritos en esta memoria y otro cultivar de trigo. El otro cultivar de trigo incluye, pero no se limita a *T. aestivum* L. cv Fidel y cualquier cultivar de trigo que albergue a un gen mutante FS-1, FS-2, FS-3 o FS-4, y otro cultivar de trigo que

incluye, pero no se limita a *T. aestivum* cv Fidel y, más particularmente, a los cultivares Fidel que albergan genes mutantes FS1, FS2, FS3 o FS4 (véase, la patente de EE.UU. nº 6.339.184 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 08/474.832).

5 Los términos “cultivar” y “variedad” se refieren a un grupo de plantas dentro de una especie definida por compartir un conjunto común de características o rasgos aceptados por los expertos en la técnica como suficientes para distinguir un cultivar o variedad de otro cultivar o variedad. No existe implicación alguna en ningún término de que todas las plantas de cualquier cultivar o variedad dado sean genéticamente idénticas, ya sea en el gen completo o en el nivel molecular, o de que cualquier planta dada será homocigótica en todos los loci. Un cultivar o variedad se  
10 considera “puro” para un rasgo particular, si cuando el cultivar o variedad puro se auto-poliniza, la totalidad de la progenie contiene el rasgo. En la presente invención, el rasgo surge de una mutación en un gen AHAS de la planta o semilla de trigo.

Además de plantas de trigo, la presente invención comprende proteínas y ácidos nucleicos IMI aislados. Los  
15 ácidos nucleicos comprenden un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1. En una realización preferida, el ácido nucleico IMI comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1.

La expresión “proteína AHAS” se refiere a una proteína acetohidroxiácido sintasa, y la expresión “proteína IMI” se refiere a cualquier proteína AHAS que está mutada a partir de una proteína AHAS de tipo salvaje y que confiere  
20 una resistencia a imidazolinona incrementada a una planta, célula vegetal, parte de planta, semilla de planta o tejido de planta cuando se expresa en el mismo. En una realización preferida, la proteína IMI comprende un polipéptido codificado por el polinucleótido de SEQ ID NO: 1. Tal como se utiliza también en esta memoria, las expresiones “ácido nucleico” y “polinucleótido” se refieren a ARN o a ADN que es lineal o ramificado, de cadena sencilla o doble, o a un híbrido del mismo. La expresión también comprende híbridos de ARN/ADN. Esos términos  
25 comprenden también la secuencia no traducida situada tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' de la región codificadora del gen: al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de la secuencia situados más arriba del extremo 5' de la región codificadora, y al menos aproximadamente 200 nucleótidos de la secuencia situados más abajo del extremo 3' de la región codificadora del gen. Bases menos comunes tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras también pueden utilizarse para el apareamiento de antisentido, ARNds y de ribozima. Por ejemplo, polinucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y citidina han demostrado  
30 unirse a ARN con una alta afinidad y ser potentes inhibidores antisentido de la expresión de los genes. También se pueden realizar otras modificaciones tales como la modificación en la cadena principal del fosfodiéster, o el 2'-hidroxi en el grupo azúcar ribosa del ARN. Los polinucleótidos antisentido y las ribozimas pueden consistir en su totalidad en ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos mixtos. Los  
35 polinucleótidos de la invención se pueden producir por cualquier medio, incluidas preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, RT-PCR y transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una que está esencialmente separada de otras moléculas de ácidos nucleicos que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está exento de algunas de las secuencias que flanquean de modo natural al ácido nucleico (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón que se produce de forma natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En  
40 diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico IMI aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de modo natural a la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico (p. ej. una célula de *Triticum monococcum*). Un ácido nucleico se considera también aislado si ha sido alterado mediante intervención humana o ha sido colocado en un lugar o localización que no es su sitio natural, o ha sido introducido en una célula mediante agroinfección o biolística. Además de ello, una molécula de ácido nucleico “aislada” tal como una molécula de  
45 ADNc, que puede estar exenta de algo del otro material celular con el que se asocia de modo natural, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Excluidos específicamente de la definición de “ácidos nucleicos aislados” están: cromosomas que se producen de forma natural (tales como dispersiones de cromosomas), bancos de cromosomas artificiales, bancos genómicos y  
50 bancos de ADNc que existen en forma de un preparado de ácido nucleico *in vitro* o en forma de un preparado de célula hospedante transfectada/transformada, en donde las células hospedantes son una preparación heterogénea



*in vitro* o están extendidas en placas en forma de una población heterogénea de colonias sencillas. También específicamente excluidos se encuentran los bancos anteriores en donde un ácido nucleico especificado constituye menos del 5% del número de insertos de ácido nucleico en las moléculas del vector. Excluidos específicamente de manera adicional se encuentran preparados de ADN genómico de células enteras o de ARN de células enteras (incluidos preparados de células enteras que son cortados mecánicamente o digeridos enzimáticamente). Excluidos específicamente incluso de manera adicional se encuentran los preparados de células enteras encontrados como un preparado *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis, en donde el ácido nucleico de la invención no ha sido adicionalmente separado de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (p. ej. separación ulterior mediante escisión de una banda sencilla procedente de una población de banda heterogénea en un gel de agarosa o borrón de nilón).

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, p. ej. una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 o una porción de la misma, se puede aislar utilizando técnicas de biología molecular convencionales y la información de la secuencia proporcionada en esta memoria. Por ejemplo, un ADNc IMI de *T. monococcum* se puede aislar de un banco de *T. monococcum* utilizando la totalidad o una porción de la secuencia de SEQ ID NO: 1. Además de ello, una molécula de ácido nucleico que comprende la totalidad o una porción de SEQ ID NO: 1 se puede aislar mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótidos diseñados en base a esta secuencia. Por ejemplo, ARNm se puede aislar de células vegetales (p. ej. mediante el proceso de extracción con tiocianato de guanidinio de Chirgwin et al., 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299) y el ADNc se puede preparar utilizando transcriptasa inversa (p. ej. transcriptasa inversa de Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa de AMV, disponible de Seikagaku America, Inc. St. Petesburg, FL). Cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa se pueden diseñar en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Una molécula de ácido nucleico de la invención se puede amplificar utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como un molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR convencionales. La molécula de ácido nucleico, así amplificada, se puede clonar en un vector apropiado y se puede caracterizar mediante análisis de la secuencia de ADN. Además, oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos IMI se pueden preparar por técnicas de síntesis convencionales, p. ej. utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

Los ácidos nucleicos IMI descritos pueden comprender secuencias que codifican una proteína IMI (es decir, "regiones codificadoras así como secuencias 5' no traducidas y secuencias 3' no traducidas. Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos descritas pueden comprender sólo las regiones codificadoras de un gen IMI, o pueden contener fragmentos genómicos completos, aislados a partir de ADN genómico. Una región codificadora de estas secuencias se indica como una "posición de ORF". Además de ello, la molécula de ácido nucleico descrita puede comprender una porción de una región codificadora de un gen IMI, por ejemplo un fragmento que se puede utilizar como una sonda o cebador. Las secuencias de nucleótidos determinadas a partir de la clonación de los genes IMI procedentes de *T. monococcum* permiten la generación de sondas y cebadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de homólogos de IMI en otros tipos de células y organismos, así como homólogos de IMI procedentes de otras plantas de trigo y especies relacionadas. La porción de la región codificadora también puede codificar un fragmento biológicamente activo de una proteína IMI.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "porción biológicamente activa de" una proteína IMI pretende incluir una porción, p. ej. un dominio/motivo, de una proteína IMI que, cuando se produce en una planta, aumenta la resistencia de la planta a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Métodos para cuantificar la resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona se proporcionan en los Ejemplos que figuran más abajo. Porciones biológicamente activas de una proteína IMI incluyen péptidos codificados por secuencias de polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 que incluyen menos aminoácidos que una proteína IMI de longitud completa y que imparten una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona tras la expresión en una planta. Típicamente, porciones biológicamente activas (p. ej. péptidos que tienen, por ejemplo, una longitud de 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 o más aminoácidos) comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de una proteína IMI. Además de ello, otras porciones biológicamente activas en las que están suprimidas otras regiones del polipéptido se pueden preparar por técnicas recombinantes y evaluar para una o más de las actividades descritas en esta memoria. Las porciones biológicamente activas de una proteína IMI pueden incluir uno o más dominios conservados, seleccionados del grupo que consiste en un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E, en donde el

dominio conservado contiene una mutación.

Se describen también polipéptidos IMI quiméricos o de fusión. Tal como se utiliza en esta memoria, un “polipéptido quimérico” o “polipéptido de fusión” IMI comprende un polipéptido IMI enlazado operativamente a un polipéptido no IMI. Un “polipéptido no IMI” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que no es esencialmente idéntica a un polipéptido IMI, p. ej. un polipéptido que no es una isoenzima IMI, péptido que realiza una función diferente que un polipéptido IMI. Dentro del polipéptido de fusión, la expresión “operativamente enlazado” pretende indicar que el polipéptido IMI y el polipéptido no IMI se fusionan uno con otro de modo que ambas secuencias cumplen la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El polipéptido no IMI se puede fusionar al extremo N o al extremo C del polipéptido IMI. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión GST-IMI, en el que la secuencia IMI está condensada al extremo C de la secuencia GST. Polipéptidos de fusión de este tipo pueden facilitar la purificación de polipéptidos IMI recombinantes.

El polipéptido de fusión también puede ser un polipéptido IMI que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células hospedantes (p. ej. células hospedantes de mamíferos) la expresión y/o secreción de un polipéptido IMI se puede aumentar a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido IMI con una identidad de la secuencia con un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1 introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, de modo que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en el polipéptido codificado. Se pueden introducir mutaciones en una secuencia de SEQ ID NO: 1 mediante técnicas convencionales tales como mutagénesis dirigida al lugar y mutagénesis mediada por PCR. Se pueden realizar sustituciones conservativas de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

Una “sustitución de aminoácido conservativa” es una en la que el residuo aminoácido está reemplazado por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo aminoácido no esencial predicho en un polipéptido IMI es reemplazado preferiblemente por otro residuo aminoácido procedente de la misma familia de la cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificadora de IMI, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden rastrear en cuanto a una actividad IMI descrita en esta memoria para identificar mutantes que conserven una actividad IMI. Después de la mutagénesis de la secuencia de SEQ ID NO: 1, el polipéptido codificado puede expresarse de manera recombinante, y la actividad del polipéptido se puede determinar analizando la resistencia a imidazolidinona de una planta que exprese el polipéptido según se describe en los Ejemplos que figuran más abajo.

Para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines comparativos óptimos (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de un polipéptido para un alineamiento óptimo con el otro polipéptido). Después se separan los residuos aminoácidos en las correspondientes posiciones de los aminoácidos. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El mismo tipo de comparación se puede realizar entre dos secuencias de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad de la secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de la secuencia = número de posiciones idénticas/números totales de posiciones x 100). Para los fines de la invención, el porcentaje de identidad de la secuencia entre dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se determina utilizando el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600, Wisconsin, Ave. MD 20814). Una penalización de apertura por hueco de 15 y una penalización de extensión por hueco de 6,66 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Una penalización de apertura por hueco de 10 y una penalización de extensión por hueco de 0,1 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los

otros parámetros se establecen en las estipulaciones por defecto.

Ha de entenderse que para los fines de determinar la identidad de la secuencia, cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido timidina es equivalente a un nucleótido uracilo. Preferiblemente, los polipéptidos IMI aislados incluidos en la presente invención tienen una identidad de al menos 90-95% y, lo más preferiblemente, de al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más con una secuencia de aminoácidos completa codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. En otra realización, los polipéptidos IMI aislados incluidos en la presente invención tienen una identidad de al menos 90-95% y, lo más preferiblemente, de al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más con una secuencia de aminoácidos completa codificada por un ácido nucleico que comprende el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente, se pueden crear ácidos nucleicos IMI optimizados. Preferiblemente, un ácido nucleico IMI optimizado codifica un polipéptido IMI que modula una tolerancia de las plantas a herbicidas de imidazolinona y, más preferiblemente, aumenta una tolerancia de las plantas a un herbicida de imidazolinona tras su sobre-exposición en la planta. Tal como se utiliza en esta memoria, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que es tratado mediante ingeniería genética para aumentar la expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos IMI optimizados de plantas, la secuencia de ADN del gen se puede modificar 1) para que comprenda codones preferidos por genes de plantas muy expresados; 2) para que comprenda un contenido de A+T en una composición base de nucleótidos a la esencialmente encontrada en plantas; 3) para formar una secuencia de iniciación en la planta; 4) para eliminar secuencias que provoquen una desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de corte y empalme de ARN. La expresión incrementada de ácidos nucleicos IMI en plantas se puede conseguir utilizando la frecuencia de distribución del uso de codones en plantas en general o en una planta particular. Métodos para optimizar la expresión de ácidos nucleicos en plantas se pueden encontrar en los documentos EPA 0359472; EPA 0385962; la solicitud PCT n° WO 91/16432; la patente de EE.UU. n° 5.380.831; la patente de EE.UU. n° 5.436.391; Perlack et al., 991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; y Murray et al., 1989 Nucleic Acids Res. 17:477-498.

Tal como se utiliza en esta memoria, "frecuencia de uso preferido de codones" se refiere a la preferencia exhibida por una célula hospedante específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, el número de apariciones de ese codón en el gen se divide por el número total de apariciones de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. De manera similar, la frecuencia de uso de un codón preferido exhibido por una célula hospedante se puede calcular promediando la frecuencia del uso del codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula hospedante. Es preferible que este análisis se limite a genes que son altamente expresados por la célula hospedante. El porcentaje de desviación de la frecuencia de un uso preferido de codones para un gen sintético de la empleada por una célula hospedante se calcula primero determinando el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un codón sencillo procedente de la célula hospedante, seguido de la obtención de la desviación media frente a todos los codones. Según se define en esta memoria, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATG y TGG). En términos generales, la desviación media global del uso de codones de un gen optimizado del de una célula hospedante se calcula utilizando la ecuación  $1A = n = 1Z(X_n - Y_n)X_n$  veces 100 Z, en que  $X_n$  = frecuencia de uso para el codón n en la célula hospedante;  $Y_n$  = frecuencia de uso para el codón n en el gen sintético, n representa un codón individual que especifica un aminoácido y el número total de codones es Z. La desviación global de la frecuencia del uso de codones, A, para todos los aminoácidos debería ser preferiblemente menor que aproximadamente 25% y, de manera más preferible, menor que aproximadamente 10%.

Por tanto, un ácido nucleico IMI se puede optimizar de modo que su frecuencia de distribución del uso de codones se desvíe, preferiblemente, no más de 25% de la de genes de plantas muy expresados y, más preferiblemente, no más de aproximadamente 10%. Adicionalmente, se otorga una consideración al porcentaje de contenido de G+C de la tercera base degenerada (las monocotiledóneas parecen favorecer G+C en esta posición, mientras que las dicotiledóneas no lo hacen). Se reconoce también que el nucleótido XCG (en que X es A, T, C o G) es el codón menos preferido en dicotiledóneas, mientras que el codón XTA es evitado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Ácidos nucleicos IMI optimizados de esta invención también tienen preferiblemente índices de evitación de dobletes CG y TA que se aproximan estrechamente a los de la planta hospedante elegida (es decir, *Triticum monococcum*). Más preferiblemente, estos índices se desvían de los del hospedante en no más de

aproximadamente 10-15%.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IMI, descritas anteriormente, también se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que se encuentran en posición antisentido con las anteriores. Se piensa que los polipéptidos antisentido inhiben la expresión del gen de un polinucleótido diana al unirse específicamente al polipéptido diana e interferir en la transcripción, corte y empalme, transporte, traducción y/o estabilidad del polipéptido diana. En la técnica anterior se describen métodos para fijar como objetivo el polipéptido antisentido al ADN cromosómico, a un transcrito de ARN primario o a un ARNm procesado. Las regiones diana pueden incluir sitios de corte y empalme, codones de iniciación de la traducción, codones de terminación de la traducción y otras secuencias dentro del marco de lectura abierto.

El término "antisentido" para los fines de la invención, se refiere a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es lo suficientemente complementario a la totalidad o a una porción de un gen, transcrito primario o ARNm procesado, con el fin de interferir con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de un apareamiento de bases de acuerdo con las reglas de complementariedad convencionales de Watson-Crick. Específicamente, las purinas se aparearán en bases de pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada con timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. Ha de entenderse que dos polinucleótidos se pueden hibridar uno con otro, incluso aunque no sean completamente complementarios uno con otro, con la condición de que cada uno tenga al menos una región que sea esencialmente complementaria con el otro. La expresión "ácido nucleico antisentido" incluye casetes de expresión de ARN de cadena sencilla así como casetes de expresión de ADN de doble cadena que se pueden transcribir para producir un ARN antisentido. Ácidos nucleicos antisentido "activos" son moléculas de ARN antisentido que son capaces de hibridarse selectivamente con un transcrito primario o con ARNm que codifica un polipéptido que tiene una identidad de la secuencia de al menos 80% con el polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1.

Además de los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos anteriormente, la presente invención comprende estos ácidos nucleicos y polipéptidos fijados a un resto. Estos restos incluyen, pero no se limitan a restos de detección, restos de hibridación, restos de purificación, restos de suministro, restos de reacción, restos de unión, y similares. Un grupo típico de ácidos nucleicos que tienen restos fijados son sondas y cebadores. Sondas y cebadores comprenden, típicamente, un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido comprende, típicamente, una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 12, de preferencia aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una cadena sentido de la secuencia recogida en SEQ ID NO: 1, una secuencia anti-sentido de la secuencia recogida en SEQ ID NO: 1, o mutantes que se producen de forma natural de las mismas. Cebadores basados en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 se pueden utilizar en reacciones de PCR para clonar homólogos de IMI. Sondas basadas en las secuencias de nucleótidos IMI se pueden utilizar para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican a los mismos polipéptidos o a polipéptidos homólogos. En realizaciones preferidas, la sonda comprende, además, un grupo marcador fijado a la misma, p. ej. el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima. Sondas de este tipo se pueden utilizar como parte de un kit de ensayo de un marcador genómico para identificar células que expresan un polipéptido IMI, tal como midiendo un nivel de un ácido nucleico codificador de IMI en una muestra de células, p. ej. detectando los niveles de ARNm de IMI o determinando si un gen IMI genómico ha sido mutado o suprimido.

Se describe también un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico IMI según se describe arriba, en donde la expresión del vector en una célula hospedante resulta en una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedante. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a la que ha sido enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedante en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos con un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (p. ej. vectores de mamíferos no episomales) son integrados en el genoma de una

célula hospedante tras la introducción en la célula hospedante y, con ello, se replican junto con el genoma del hospedante. Además de ello, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente enlazados. A vectores de este tipo se les alude en esta memoria como “vectores de expresión”. En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden utilizarse de manera indistinta, dado que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

Los vectores de expresión recombinantes descritos pueden comprender un ácido nucleico descrito en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedantes a utilizar para la expresión que están operativamente enlazadas a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, “operativamente enlazado” pretende dar a entender que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej. en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedante cuando el vector se introduce en la célula hospedante). La expresión “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, reforzadores y otros elementos para el control de la expresión (p. ej. señales de poliadenilación). Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o véase: Gurber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, comps. Glick y Thompson, Capítulo 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluidas las referencias contenidas en los mismos. Secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedantes y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células hospedantes o bajo ciertas condiciones. Se apreciará por parte de los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a transformar, el nivel de expresión de polipéptidos deseado, etc. Los vectores de expresión descritos se pueden introducir en células hospedantes para producir, con ello, polipéptidos o péptidos, incluidos polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos según se describe en esta memoria (p. ej. polipéptidos IMI, polipéptidos de fusión, etc.).

Los polipéptidos IMI descritos en esta memoria se pueden expresar en plantas y células vegetales tales como células vegetales unicelulares (tales como algas) (véase Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3):239-251 y referencias citadas en la misma) y células vegetales de plantas superiores (p. ej. los espermatofitos, tales como plantas de cosecha). Un polinucleótido IMI se puede “introducir” en una célula vegetal por cualquier medio, incluido transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo con partículas, agroinfección, biolística, y similares.

Métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes, incluidas células vegetales, se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols comp.: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Dado que una resistencia incrementada a herbicidas de imidazolinona es un rasgo general que se desea sea heredado en una amplia diversidad de plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, manihot, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate; especies de Vicia, guisantes, alfalfa, plantas arbústeas (café, cacao, té), especies de Salix, árboles (palma del aceite, coco), hierbas perennes y cosechas forrajeras, estas plantas de cosechas son también plantas diana preferidas para un tratamiento por ingeniería genética como una realización adicional De acuerdo con la invención, la planta es una planta de trigo. Cosechas forrajeras incluyen, pero no se limitan a pasto de trigo, pasto canario, pasto bromo, pasto de centeno silvestre, hierba azul, pasto ovillo, alfalfa, Salfoin, Lotus corniculatus, trifolium hybridum, trifolium pratense y trébol dulce amarillo.

En una realización de la presente invención, la transfección de un polinucleótido IMI en una planta se consigue mediante transferencia de genes mediada por Agrobacterium. Un método de transformación conocido por los expertos en la técnica es la inmersión de una planta en floración en una disolución de Agrobacteria, en donde las Agrobacteria contienen el ácido nucleico IMI, seguido de cultivo de los gametos transformados. La transformación de la planta mediada por Agrobacterium se puede realizar utilizando, por ejemplo, la cepa GV3101 (pMP90) de *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz y Schell, 1986 Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Clontech). La transformación se puede realizar por técnicas convencionales de transformación y regeneración (Deblaere et al.,

1994, Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2ª ed. – Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, - en Sect., Ringbuc Centrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. y Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360, S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza se puede transformar a través de los cotiledones o transformación del hipocotilo (Moloney et al., 1989 Plant cell Report 8:238-242; De Block et al., 1989 Plant Physiol. 91:694-701). El uso de antibióticos para la selección de *Agrobacterium* y de plantas depende del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para la transformación. La selección de la colza se realiza normalmente utilizando canamicina como marcador de la planta seleccionable. Una transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* al lino puede realizarse utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova et al., 1995 Plant Cell Report 13:282-285. Adicionalmente, la transformación de soja se puede efectuar utilizando, por ejemplo, una técnica descrita en la patente europea nº 0 424 047, la patente de EE.UU. nº 5.322.783, la patente europea nº 0 397 687, la patente de EE.UU. 5.376.543 o la patente de EE.UU. nº 5.169.770. La transformación de maíz se puede conseguir mediante bombardeo con partículas, absorción de ADN mediada por polietilenglicol o a través de la técnica de fibras de carburo de silicio. (véase, por ejemplo, Freeling y Walbot "The maize handbook" editorial Springer: Nueva York (1993), ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de transformación de maíz se encuentra en la patente de EE.UU. nº 5.990.387, y un ejemplo específico de transformación de trigo se puede encontrar en la solicitud PCT nº. WO 93/07256.

De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido IMI introducido se puede mantener en la célula vegetal de manera estable si se incorpora en un replicón autónomo no cromosómico o se integra en los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido IMI introducido puede estar presente en un vector extracromosómico no replicatorio y puede ser transitoriamente expresado o transitoriamente activo. En una realización, se puede crear un microorganismo recombinante homólogo, en donde el polinucleótido IMI está integrado en un cromosoma, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen AHAS en la que se ha introducido una deleción, adición, o sustitución para alterar con ello, p. ej. interrumpir funcionalmente, el gen AHAS endógeno y para crear un gen IMI. Para crear una mutación puntual a través de recombinación homóloga se pueden utilizar híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss et al., 1999 Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 y Kmiec, 1999 Gene therapy American Scientist 87(3):240-247). Otros procesos de recombinación homóloga en especies de *Triticum* son también bien conocidos en la técnica y se contemplan para uso en esta memoria.

En el vector de recombinación homólogo, el gen IMI puede estar flanqueado en sus extremos 5' y 3' por una molécula de ácido nucleico adicional del gen AHAS para permitir que se produzca una recombinación homóloga entre el gen IMI exógeno portado por el vector y un gen AHAS endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula de ácido nucleico AHAS flanqueante adicional tiene una longitud suficiente para una recombinación homóloga con éxito con el gen endógeno. Típicamente, en el vector están incluidos varios cientos de pares de bases de hasta kilobases de ADN flanqueante (tanto en los extremos 5' como 3') (véase, p. ej. Thomas, K. R., y Capecchi, M. R., 1987 Cell 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homólogos, o Strepp et al., 1998 PNAS, 95(8):4368-4373 para una recombinación basada en ADNc en *Physcomitrella patens*). Sin embargo, dado que el gen IMI difiere normalmente del gen AHAS en unos muy pocos aminoácidos, no siempre es necesaria la secuencia flanqueante. El vector de recombinación homólogo se introduce en un microorganismo celular vegetal (p. ej. a través de ADN mediado por polietilenglicol) y se seleccionan células en las que se ha recombinado homológamente el gen IMI introducido con el gen AHAS endógeno, utilizando técnicas conocidas.

En otra realización, se pueden producir microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen IMI en un vector colocándolo bajo el control del operón lac permite la expresión del gen IMI solamente en presencia de IPTG. Sistemas reguladores de este tipo son bien conocidos en la técnica.

El que esté presente en un vector extracromosómico no replicatorio o en un vector que está integrado en un cromosoma, el polinucleótido IMI reside preferiblemente en una casete de expresión en plantas. Una casete de expresión en plantas contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de impulsar la expresión de genes en células vegetales que están operativamente enlazadas, de modo que cada una de las secuencias puede cumplir su función, por ejemplo la terminación de la transcripción mediante señales de poliadenilación. Señales de poliadenilación preferidas son aquellas que proceden de ADN-t de *Agrobacterium tumefaciens* tales como el gen 3 conocido como octopina sintasa del plásmido-Ti pTiACH5 (Gielen et al., 1984, EMBO J. 3:835) o equivalentes

funcionales del mismo, pero también son adecuados todos los otros terminadores funcionalmente activos en plantas. Dado que la expresión de genes en plantas no está muy a menudo limitada a los niveles transcripcionales, una casete de expresión en plantas contiene preferiblemente otras secuencias operativamente enlazadas tales como reforzadores de la traducción, tales como la secuencia de sobre-accionamiento que contiene la secuencia conductora 5' no traducida procedente del virus del mosaico del tabaco que potencia la relación polipéptido por ARN (Gallie et al., 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión en plantas incluyen los detallados en: Becker, D. et al., 1992 New Plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; Bevan, M. W., 1984 Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, Nucl. Acid Res. 12:8711-8721; y Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, comps.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, págs. 15-38).

La expresión de genes en plantas debería estar operativamente enlazada a un promotor apropiado que confiera la expresión de genes de una manera específica en el tiempo para las células o el tejido. Promotores útiles en las casetes de expresión de la invención incluyen cualquier promotor que sea capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal. Promotores de este tipo incluyen, pero no se limitan a los que se pueden obtener de plantas, virus de plantas y bacterias que contienen genes que son expresados en plantas tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, con preferencia para la fase de desarrollo, con preferencia para el tipo de célula, con preferencia para el tejido – con preferencia para el órgano. Promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de las condiciones. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores CaMV 19S y 35S (Odell et al. 1985 Nature 313:810-812), el promotor sX CaMV 35S (Kay et al. 1987 Science 236:1299-1302), el promotor Sepl, el promotor de actina del arroz (McElroy et al. 1990 Plant Cell 2:163-171), el promotor de actina de *Arabidopsis*, el promotor de ubiquitina (Christensen et al. 1989 Plant Molec. Biol. 18:675-689), pEmu (Last et al. 1991 Theor. Appl. Genet. 81:581-588), el promotor del virus del mosaico de la escrofularia 35S, el promotor Smas (Velten et al. 1984 EMBO J. 3:2723-2730), el promotor GRP1-8, el promotor de alcohol cinámico deshidrogenasa (patente de EE.UU. n° 5.683.439), promotores del ADN-t de *Agrobacterium*, tales como manopina sintasa, nopalina sintasa y octopina sintasa, la subunidad pequeña del promotor de ribulosa bifosfato carboxilasa (ssuRUBISCO), y similares.

Promotores inducibles son activos bajo determinadas condiciones medioambientales tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque por patógenos, condiciones anaerobias, y similares. Por ejemplo el promotor hsp80 de *Brassica* es inducido por choque térmico, el promotor PPK es inducido por la luz, el promotor PR-1 procedente del tabaco, *Arabidopsis* y maíz son inducibles mediante infección con un patógeno y el promotor Adhl es inducido por hipoxia y estrés en frío. La expresión de genes de plantas también se puede facilitar a través de un promotor inducible (para la revisión, véase Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108). Promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea una expresión del gen específica para el tiempo. Ejemplos de promotores de este tipo son un promotor inducible por ácido salicílico (solicitud PCT n° WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al., 1992 Plant J. 2:397-404) y un promotor inducible por etanol (solicitud PCT n° WO 93/21334).

Promotores preferidos de fase en desarrollo se expresan preferentemente en determinadas fases del desarrollo. Promotores preferidos de tejidos y órganos incluyen aquellos que se expresan preferiblemente en determinados tejidos u órganos tales como hojas, raíces, semillas o xilema. Ejemplos de promotores preferidos de tejidos y preferidos de órganos incluyen, pero no se limitan a preferidos de frutos, preferidos de óvulos, preferidos de tejido masculino, preferidos de semillas, preferidos de integumentos, preferidos del tubérculo, preferidos de los tallos, preferidos del pericarpio y preferidos de las hojas, preferidos del estigma, preferidos del polen, preferidos de las anteras, preferidos de los pétalos, preferidos de los sépalos, preferidos de los pedicelos, preferidos de las silicuas, preferidos de los pedúnculos, preferidos de las raíces y similares. Promotores preferidos de las semillas se expresan preferiblemente durante el desarrollo y/o germinación de las semillas. Por ejemplo, promotores preferidos de las semillas pueden ser preferidos de los embriones, preferidos del endospermo y preferidos del revestimiento de las semillas. Véase Thompson et al., 1989 BioEssays 10: 108. Ejemplos de promotores preferidos de las semillas incluyen, pero no se limitan a celulosa sintasa (celA), Cim1 gamma-zeína, globulina-1, zeína del maíz de 19 kD (cZ19B1) y similares.

Otros promotores preferidos de tejidos o preferidos de órganos adecuados incluyen el promotor del gen napina procedente de la colza (patente de EE.UU. n° 5.608.152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991

Mol Gen Genet. 225(3):459-67), el promotor de oleosina procedente de *Arabidopsis* (solicitud PCT n° WO 98/45461), el promotor de faseolina procedente de *Phaseolus vulgaris* (patente de EE.UU. n° 5.504.200), promotor Bce4 procedente de Brassica (solicitud PCT n° WO 91/13980) o el promotor B4 de leguminosas (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2):233-9) así como promotores que confieren una expresión específica para las semillas en plantas monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Promotores adecuados a señalar son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (solicitud PCT n° WO 95/15389 y solicitud PCT n° WO 95/23230) o los descritos en la solicitud PCT n° WO 99/16890 (promotores del gen hordeína de la cebada, gen glutelina del arroz, gen orizina del arroz, gen prolamina del arroz, gen gladina del trigo, gen glutelina del trigo, gen glutelina del centeno, gen casirina del sorgo y gen secalina del centeno).

Otros promotores útiles en las casetes de expresión de la invención incluyen, pero no se limitan al promotor de proteína de unión a clorofila a/b principal, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor -conglucina, el promotor napina, el promotor lectina de soja, el promotor zeína de maíz de 15kD, el promotor zeína de 22 kD, el promotor zeína de 27 kD, el promotor g-zeína, los promotores céreo, shrunken1, shrunken 2 y bronce, el promotor Zm13 (patente de EE.UU. n° 5.086.169), los promotores de poligalacturonasa de maíz (PG) (patentes de EE. UU. n°s 5.412.085 y 5.545.546) y el promotor SGB6 (patente de EE.UU. 5.470.359), así como promotores sintéticos u otros promotores naturales.

Se puede obtener una flexibilidad adicional en el control de la expresión de genes heterólogos en plantas utilizando dominios de unión de ADN y elementos de respuesta procedentes de fuentes heterólogas (es decir, dominios de unión a ADN de fuentes no vegetales). Un ejemplo de un dominio de unión a ADN heterólogo de este tipo es el dominio de unión a ADN LexA (Brent y Ptashne, 1985 Cell 43:729-736).

Se describe también una célula hospedante en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Las expresiones "célula hospedante" y "célula hospedante recombinante" se utilizan de manera indistinta en esta memoria. Ha de entenderse que términos de este tipo se refieren no solamente a la célula sujeto particular, sino que también se aplican a la progenie o progenie potencial de una célula de este tipo. Dado que determinadas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, dicha progenie puede no ser de hecho, idéntica a la célula parental, pero sigue estando incluida dentro del alcance del término tal como se utiliza en esta memoria. Una célula hospedante puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polinucleótido IMI puede ser expresado en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insectos, células de hongos o células de mamíferos (tales como células de ovarios de hámster chino (CHO) o células COS), células de algas, ciliados, células vegetales, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum*. Otras células hospedantes adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

Una célula hospedante descrita en esta memoria, tal como una célula hospedante procariótica o eucariótica en cultivo se puede utilizar para producir (es decir expresar), un polinucleótido IMI.

Se describen también métodos para producir polipéptidos IMI utilizando las células hospedantes de la invención. El método puede comprender cultivar la célula hospedante descrita en esta memoria (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido IMI, o en cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica un polipéptido de tipo salvaje o IMI) en un medio adecuado hasta que se produzca un polipéptido IMI. El método puede comprender, además, aislar polipéptidos IMI del medio o de la célula hospedante. Se describen también polipéptidos IMI aislados y porciones biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o porción biológicamente activa del mismo está exento de algo del material celular cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante o mediante precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión "esencialmente exento de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos IMI en las que el polipéptido está separado de algunos de los componentes celulares de las células en las que se produce de manera natural o recombinante. La expresión "esencialmente exento de material celular" puede incluir preparaciones de un polipéptido IMI que tenga menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de material no IMI (al que se alude también en esta memoria como un "polipéptido contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de material no IMI, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de material no IMI y, lo más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% de material no IMI.



5 Cuando el polipéptido IMI o porción biológicamente activa del mismo se produce de manera recombinante, también está preferiblemente en esencia exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10% y, lo más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de polipéptidos. La expresión  
 10 "esencialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de polipéptidos IMI en las que el polipéptido está separado de los precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. La expresión "esencialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos" puede incluir preparaciones de un polipéptido IMI que tenga menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos no IMI, más preferiblemente menos de  
 15 aproximadamente 20% de precursores químicos o productos químicos no IMI, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o productos químicos no IMI y, lo más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o productos químicos no IMI. Se describen también polipéptidos aislados o porciones biológicamente activas de los mismos que carecen de polipéptidos contaminantes procedentes del mismo organismo del que se deriva el polipéptido IMI. Típicamente, polipéptidos de este tipo se producen mediante expresión recombinante de, por ejemplo, un polipéptido IMI de *Triticum monococcum* en plantas distintas de *Triticum monococcum* o microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliados, algas u hongos.

20 Las secuencias de los polinucleótidos y de los polipéptidos IMI de la invención tienen una diversidad de usos. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la presente invención se pueden utilizar para transformar plantas, modulando con ello la resistencia de las plantas a los herbicidas de imidazolinona. Por consiguiente, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica con una tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende (a) transformar un célula vegetal con uno o más vectores de expresión que comprenden uno o más ácidos nucleicos IMI, y (b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una resistencia a un herbicida de imidazolinona incrementada en  
 25 comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. En una realización los múltiples ácidos nucleicos IMI se derivan de diferentes genomas. Se incluyen también en la presente invención métodos para producir una planta transgénica con una tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona, que comprende (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico IMI, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico no-IMI y (b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una resistencia a un herbicida de imidazolinona incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

30 La presente invención incluye métodos para modificar una tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende modificar la expresión de uno o más ácidos nucleicos IMI. Preferiblemente, los ácidos nucleicos están situados en o se derivan de diferentes genomas. La resistencia de la planta al herbicida de imidazolinona se puede aumentar o disminuir según se consiga al aumentar o disminuir la expresión de un polinucleótido IMI, respectivamente. Preferiblemente, la resistencia de la planta al herbicida de imidazolinona se incrementa aumentando la expresión de un polinucleótido IMI. La expresión de un polinucleótido IMI se puede modificar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar los métodos de aumentar la expresión de polinucleótidos IMI en los que la planta sea transgénica o no transgénica. En  
 35 los casos en los que la planta sea transgénica, la planta se puede transformar con un vector que contenga cualquiera de los ácidos nucleicos codificantes IMI descritos anteriormente, o la planta se puede transformar con un promotor que dirige la expresión de polinucleótidos IMI endógenos en la planta, por ejemplo. La invención prevé que un promotor de este tipo pueda ser regulado de una manera específica para el tejido o en el desarrollo. Alternativamente, plantas no transgénicas pueden tener la expresión de polinucleótidos IMI endógena modificada al inducir un promotor nativo. La expresión de polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 en plantas diana se puede conseguir, pero no se limita a uno de los siguientes ejemplos: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducido por productos químicos y (c) sobre-expresión del promotor tratado mediante ingeniería, por ejemplo con factores de transcripción derivados del dedo de zinc (Greisman y Pabo, 1997 Science 275:657).

40 En una realización preferida, la transcripción del polinucleótido IMI se modula utilizando factores de transcripción derivados de dedos de zinc (ZFPs) según se describe en Greisman y Pabo, 1997, Science 275:657 y fabricados por Sangamo Biosciences, Inc. Estos ZFPs comprenden tanto un dominio de reconocimiento de ADN como un dominio funcional que provoca la activación o represión de un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico IMI. Por lo tanto, se puede crear una activación y represión de ZFPs que reconoce específicamente los promotores de polinucleótidos IMI arriba descritos y utilizados para aumentar o disminuir la expresión de polinucleótidos IMI en una planta, modulando con ello la resistencia a los herbicidas de la planta.

Se describen también métodos para plantas que son monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas se pueden seleccionar de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuate, algodón, colza, canola, manihot, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies de Salix, palma del aceite, coco, hierbas perennes y cosechas forrajeras, por ejemplo. Cosechas forrajeras incluyen, pero no se limitan a pasto de trigo, pasto canario, pasto bromo, pasto de centeno silvestre, hierba azul, pasto ovido, alfalfa, Salfoin, Lotus corniculatus, Trifolium hybridum, Trifolium pratense y trébol dulce amarillo. De acuerdo con la invención, la planta es una planta de trigo. En cada uno de los métodos arriba descritos, la célula vegetal incluye, pero no se limita a un protoplasto, célula productora de gametos y una célula que se regenera en una planta entera. Tal como se utiliza en esta memoria, el término “transgénico” se refiere a cualquier planta, célula vegetal, callo, tejido de una planta o parte de planta, que contenga la totalidad o al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, la totalidad o parte del polinucleótido recombinante está establemente integrado en un cromosoma o en un elemento extra-cromosómico estable, de modo que se pasa a generaciones sucesivas.

Tal como se describe arriba, la presente invención enseña composiciones y métodos para aumentar la resistencia a imidazolinona de una planta o semilla de trigo en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta o semilla. En una realización preferida, la resistencia a imidazolinona de una planta de trigo o semilla se incrementa de modo que la planta o semilla puede resistir una aplicación de herbicida de imidazolinona, preferiblemente de aproximadamente 10-400 g ia ha<sup>-1</sup>, más preferiblemente 20-160 g ia ha<sup>-1</sup> y, lo más preferiblemente, 40-80 g ia ha<sup>-1</sup>. Tal como se utiliza en esta memoria, “resistir” una aplicación de herbicida de imidazolinona significa que la planta no es exterminada ni dañada por una aplicación de este tipo.

Adicionalmente, se proporciona en esta memoria un método para reprimir malas hierbas dentro de la vecindad de una planta de trigo de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y a la planta de trigo, en donde la planta de trigo tiene una resistencia incrementada al herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo, y en donde la planta comprende uno o más ácidos nucleicos IMI. En una realización, la planta comprende múltiples ácidos nucleicos IMI situados en o derivados de diferentes genomas. En otra realización, la planta comprende un ácido nucleico no Imil. Al proporcionar plantas de trigo con una resistencia incrementada a imidazolinona, se puede emplear una amplia diversidad de formulaciones para proteger plantas de trigo de las malas hierbas, con el fin de potenciar el crecimiento de la planta y reducir la competición por nutrientes. Un herbicida de imidazolinona se puede utilizar por sí mismo para la represión de malas hierbas antes del brote, después del brote, antes de la plantación y en la plantación, en zonas que rodean a las plantas de trigo descritas en esta memoria, o se puede utilizar una formulación de herbicida de imidazolinona que contenga otros aditivos. El herbicida de imidazolinona también se puede utilizar como un tratamiento de las semillas. Aditivos encontrados en una formulación de herbicida de imidazolinona incluyen otros herbicidas, detergentes, coadyuvantes, agentes de dispersión, agentes de pegajosidad, agentes estabilizadores o similares. La formulación herbicida de imidazolinona puede ser un preparado húmedo o seco, y puede incluir, pero no se limita a polvos fluibles, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida y formulaciones de herbicida de imidazolinona se pueden aplicar de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo mediante pulverización, riego, espolvoreado o similar.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### *Mutagénesis y selección de líneas de trigo resistentes*

Aproximadamente 15.000 semillas del acceso “TM23” de hábito de primavera de *Triticum monococcum* se trataron con EMS. El método utilizado era: (1) pre-empapar semillas en agua durante cuatro horas, (2) tratar con EMS al 0,3% durante 16 horas, (3) aclarar en agua durante 8 horas, (4) secar al aire durante cuatro horas y (5) plantar las semillas. Una cierta cantidad de las semillas recolectadas se incrementó adicionalmente sin la selección en cuanto a la tolerancia a herbicidas de imidazolinona. La semilla recolectada se plantó y trató con 40 g/ha de imazamox. Se plantaron un total de 120 kg de semillas, dando como resultado aproximadamente 2,4 millones de plantas tratadas, asumiendo un peso del grano de 35 mg y un brote de las plantículas del 70%. La generación de semillas rastreada oscilaba de M2 a M5, con más de un 72% de semillas de al menos M3. Se identificaron cinco plantas

como tolerantes, designadas EM1 a EM5, y se trasplantaron a un invernadero para la producción de semillas. La EM2 se incrementó bajo la selección del herbicida de imidazolinona antes del ensayo de campo inicial (Ejemplo 4).

## EJEMPLO 2

5 *Transferencia de EM2 de Triticum monococcum diploide a T. aestivum ssp hexaploide y luego a T. turgidum ssp durum tetraploide*

EMIMI es la designación del parental fuente EM2 de *T. monococcum*. Crocus es la designación del parental de *T. aestivum ssp aestivum* utilizado. 605 flósculos de crocus se polinizaron con polen de EMIMI, dando como resultado 84 semillas F<sub>1</sub>, 38.409 flósculos de las plantas F<sub>1</sub> se polinizaron utilizando el polen de crocus, dando como resultado 2 embriones que fueron rescatados. Las plantas BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> resultantes se autofecundaron para dar BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> y se trataron con 20 g/ha de imazamox. De las 24 plantas, así tratadas, 11 eran totalmente resistentes, 7 mostraron una cierta lesión y 6 eran susceptibles. Las plantas resistentes se cruzaron con la variedad de trigo blando Teal, que representa la 3<sup>a</sup> dosis de trigo blando. Plantas de la línea resultante, con un pedigrí de Crocus\*2/EMIMI/CDC Teal/3/ se cruzaron con AC Elsa o AC Superb y se les dio el código, respectivamente, 98PH8 (cruce Elsa) y 98PH9 (cruce Superb), 98PH8 se cruzó seis veces más con AC Elsa y 98PH8 se cruzó seis veces más con AC Superb. Las dos poblaciones se codificaron como sigue:

20 P00.35 = 98PH8/6\*Elsa = Crocus\*2/EM2//CDC Teal/3/7\* AC Elsa  
P00.45 = 98PH9/6\*Superb = Crocus\*2/EM2//CDC Teal/3/7\* AC Superb

La segregación de las plantas derivadas de retrocruzamiento en las dos poblaciones se ajustaron a un esperado modelo de gen único 1:1 tolerante: susceptible cuando se trataron con 20 g/ha de imazamox. Como era de esperar, con esa tasa y un sólo gen de tolerancia heterocigótico en un fondo de trigo blando, las plantas puntuadas como tolerantes conservaron una cierta lesión. Se produjeron haploides dobles a partir de cada una de las poblaciones utilizando el método de polinización de maíz. Se obtuvieron siete líneas DH resistentes a partir de P00.35 y se obtuvieron 78 líneas DH resistentes a partir de P00.45. Las utilizadas en trabajos subsiguientes habían demostrado ser puras para la tolerancia a los herbicidas.

30 Se utilizó *T. aestivum* como la especie de puente para transferir el gen EM2 de *T. monococcum* a *T. turgidum*. En cada una de las generaciones, las plantas se trataron con al menos una tasa de 20 g/ha de imazamox antes de seleccionar plantas como parentales. Una conversión de *T. aestivum* intermedia con el pedigrí "Crocus \*2/EM2//CDC Teal/3/2\* AC Superb" tolerante a imazamox se cruzó con la línea durum AC Avonlea. Las plantas F<sub>1</sub> resultantes se autofecundaron para producir una población F<sub>2</sub>, de las que 52 de 390 plantas se identificaron como resistentes (sin lesión tras la aplicación del herbicida). Algunas de éstas se utilizaron como femeninas y se cruzaron con AC Avonlea. Las plantas BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> resultantes se cruzaron de nuevo con AC Avonlea. Para las subsiguientes dos generaciones, AC Avonlea se utilizó como la planta femenina. La línea resultante se designó 00DIMI-#17 y tenía el pedigrí: AC Avonlea\*2/3/Crocus\*2/EM2//CDC Teal/3/2\*AC Superb// 3\*AC Avonlea. Esta línea se autofecundó para dar F<sub>2</sub> y plantas F<sub>2</sub> se trataron con 40 g/ha de imazamox. Las plantas F<sub>2</sub> resistentes se hicieron avanzar a la generación F<sub>4</sub>. Las 53 plantas F<sub>4</sub> sometidas a ensayo sobrevivieron a la aplicación de 80 g/ha de imazamox. A través de las líneas F<sub>4:5</sub> no se encontraron plantas susceptibles de las 124 plantas tratadas con 80 g/ha de imazamox, indicando una inserción estable del gen EM2 en un fondo de durum.

## 45 EJEMPLO 3

### *Resultados relacionados con la herencia de genes IMI y relaciones alélicas entre genes IMI*

50 En todo el comentario que sigue, la tasa de aplicación del herbicida de imidazolinona imazamox que se utilizó en los estudios de herencia era de 20 gramos por hectárea. Esta tasa era lo suficiente como para exterminar a plantas de trigo susceptibles. El material parental incluido se muestra en la Figura 4.

55 Durante el proceso de introgresión, el gen EM2 se segregó, como era de esperar, para un solo gen parcialmente dominante. *Triticum monococcum*, del que se derivó la mutación EM2, es un trigo diploide que contiene sólo el genoma A. El trigo hexaploide tiene el genoma A así como los genomas B y D. Asumiendo que durante la introgresión el gen EM2 se incorporaba homológamente en el genoma A de trigo hexaploide, como era

normalmente de esperar, entonces la mutación EM2 en los materiales parentales “EM2” y “EM2FS4” descritos anteriormente se encontrarían en el genoma A. La Tabla que figura más abajo proporciona datos de segregación de F<sub>2</sub> que ayudan a elucidar las relaciones alélicas entre los diversos mutantes. Ningún material parental, con la excepción de la línea Teal susceptible, tenía plantas susceptibles cuando se trataba con imazamox; por lo tanto, no se muestran estos datos.

La carencia de segregación en la generación F<sub>2</sub> indica que líneas parentales comparten al menos un alelo en un locus particular. Las relaciones de segregación F<sub>2</sub> de 3:1, 15:1 y 63:1 indican, respectivamente, uno, dos y tres loci independientes. La segregación de 15A, cuando se cruzó con la línea Teal susceptible, indicó dos loci independientes implicados con tolerancia a imazamox (Figura 5, línea 2). EM2 se encuentra en un locus diferente que FS4 (Figura 5, línea 7). EM2 comparte un locus con 15A (Figura 5, línea 3). FS4 comparte un locus con 15A (Figura 5, línea 4), el parental EM2 + FS4, cruzado con 15A, tampoco se segregaba en F<sub>2</sub> (Figura 5, línea 5). Parece ser que FS4 se encuentra en el genoma D (Jim Anderson, comunicación personal). EM2 debería estar en el genoma A. Por lo tanto, los dos loci implicados con tolerancia a imazamox en 15A deberían encontrarse en los genomas A y D. El parental 11A, cuando se cruzó con la línea Teal susceptible, se segregó como un solo locus (Figura 5, línea 1). Éste era independiente del locus de tolerancia en EM2 (Figura 5, línea 6) y FS4 (Figura 5, línea 9). Como sería de esperar por la ausencia de segregación de EM2 y FS4 con 15A, 11A era también independiente de los loci en 15A (Figura 5, línea 10) y el parental EM2 + FS4 (Figura 5, línea 8). Asumiendo que los genes AHAS se encuentran en un conjunto homólogo en el trigo hexaploide, existen sólo tres genes AHAS expresados y cada uno de los genes expresados se encuentra en un genoma diferente, entonces 11A debería estar en el genoma B.

#### EJEMPLO 4

*Tolerancia a herbicidas IMI proporcionada por EM2 en trigo Einkorn, durum y hexaploide, y tolerancia incrementada cuando se combina con otros genes de tolerancia no alélicos*

La línea EM2 tolerante a imazamox (Ejemplo 1) se evaluó en una única localización en el campo en cuanto a diversas características agronómicas que podrían verse afectadas por la lesión del herbicida. En la Figura 6 se muestran datos de los tres años de evaluación. Los datos de 1998 son medias de dos replicaciones. Los datos de rendimiento de 1999 y 2000 son medias de cuatro replicaciones. Los otros datos de 1999 son medias de dos replicaciones. El testigo Einkorn era susceptible a 40 gramos de imazamox, todas las plantas morían. La mutación EM2 en el fondo Einkorn confería una excelente tolerancia a una tasa de 40 g/ha.

La línea EM2 se evaluó para la lesión global de la cosecha a tres tasas de imazamox, tres veces durante la sesión de desarrollo. Estos datos se presentan en la Figura 7. En 1999, únicamente se observó inicialmente una ligera lesión, y los síntomas desaparecieron gradualmente a lo largo del curso de la estación anual. En 2000 no se observó lesión alguna en la línea EM2, mientras que el testigo no tolerante a herbicidas fue virtualmente exterminado.

También se ha demostrado la tolerancia conferida por EM2 en fondos de durum (tetraploides) y de trigo blando (hexaploide). El historial de cruce de las líneas testadas se describió previamente (Ejemplo 2). Tal como se indica en el Ejemplo 2, cuando líneas F<sub>4:5</sub> de la recuperación de EM2 durum 00DIMI#17 se evaluaron en cuanto a la tolerancia a 80 g/ha de imazamox, todas las plantas eran tolerantes, mientras que todas las plantas de la línea durum susceptible utilizadas como chequeo fueron exterminadas, indicando que EM2 confiere tolerancia a la clase Imi de herbicidas en un fondo durum. La línea derivada del doble haploide P00.45, constituida por EM2 en un fondo hexaploide, era tolerante a 20 g/ha de imazamox como un testigo parental en estudios de alelismo descritos en el Ejemplo 3; todas las plantas del testigo hexaploide susceptibles fueron exterminadas a esa tasa.

Se ha demostrado que la combinación de más de un gen de tolerancia a Imi aumenta la tolerancia del trigo a herbicidas de imidazolinona. Se sometieron a ensayo cuatro genotipos en cuanto a la tolerancia en dos tasas diferentes de imazamox. Los genotipos incluían una línea sólo FS4, BW755; Teal 15A, previamente descrito como con dos loci independientes en cuanto a la tolerancia a herbicidas Imi; una línea derivada doble haploide de EM2 + FS4, y una línea derivada del cruce de 15A y 11A, a través de selección a granel convencional de las plantas más tolerantes a lo largo de generaciones sucesivas a tasas crecientes de imazamox. Las tasas de imazamox incluían 200 y 600 gramos por hectárea. La lesión de las plantículas de las 18 a 25 plantas por tratamiento por genotipo se estimó sobre una base por planta utilizando cinco categorías que oscilaban desde la muerte a sin lesión. Los datos

se resumen en la Figura 8.

5 En ninguna de las tasas fueron exterminadas plantas. La línea de genes sencilla, BW755, que contenía FS4, fue  
dañada a ambas tasas. La investigación previa ha indicado que 11A y FS4 proporcionan una tolerancia similar en  
trigo blando. Las dos líneas de dos genes, Teal 15A y EM2/FS4 reaccionaban de manera similar. No se producía  
lesión alguna en la tasa menor, demostrando una tolerancia incrementada sobre la planta de un gen, pero todas  
fueron dañadas a una tasa mayor. La línea de tres genes seguía siendo secretora, según se evidencia porque  
10 algunas plantas exhibían lesión a ambas tasas, pero aproximadamente la mitad de las plantas no tenía lesión  
alguna a la tasa más elevada, demostrando una tolerancia incrementada frente a cualquiera de las dos líneas de  
genes.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una planta de trigo que comprende al menos un ácido nucleico IMI, en donde la planta de trigo tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, y en donde el ácido nucleico IMI se selecciona del grupo que consiste en:
- a) polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1;
  - b) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI codificada por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1; y
  - c) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI que comprende al menos una identidad de la secuencia de aminoácidos del 90% con cualquier polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, en donde la proteína IMI comprende una sustitución de serina por asparagina en el Dominio E.
- 2.- La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde la planta de trigo no es transgénica, la planta de trigo comprende, además, un ácido nucleico Imi1, un ácido nucleico Imi2, o tanto un ácido nucleico Im1 como un ácido nucleico Im2, y la planta de trigo es una planta de trigo tetraploide o una hexaploide.
- 3.- La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde uno de los ácidos nucleicos IMI comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1.
- 4.- La planta de trigo de la reivindicación 1, que comprende dos ácidos nucleicos IMI.
- 5.- La planta de trigo de la reivindicación 1, que comprende tres ácidos nucleicos IMI.
- 6.- La planta de trigo de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, en donde la planta es transgénica.
- 7.- La planta de trigo de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, en donde la planta es no transgénica.
- 8.- La planta de trigo cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, en donde la planta comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos recogida en SEQ ID NO: 1 y es un derivado recombinante o tratado mediante ingeniería genética de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; o es un descendiente de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.
- 9.- La planta de trigo de la reivindicación 7, en donde la planta comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos recogida en SEQ ID NO: 1 y es una progenie de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.
- 10.- La planta de trigo de la reivindicación 7, en donde la planta comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos recogida en SEQ ID NO: 1.
- 11.- La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde el herbicida de imidazolinona se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolina-carboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metilo.
- 12.- La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde el herbicida de imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico.
- 13.- La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde el herbicida de imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

- 14.- Una parte de planta de la planta de trigo de la reivindicación 1.
- 15.- Una célula vegetal de la planta de trigo de la reivindicación 1.
- 16.- Una semilla producida por la planta de trigo de la reivindicación 1, en donde la semilla comprende al menos uno de los ácidos nucleicos IMI.
- 17.- Un ácido nucleico IMI aislado, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste:
- a) polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1;
  - b) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI codificada por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1; y
  - c) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI que comprende al menos una identidad de la secuencia de aminoácidos del 90% con cualquier polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, en donde la proteína IMI comprende una sustitución de serina por asparagina en el Dominio E; y
  - d) polinucleótidos complementarios a cualquier polinucleótido de a) a c).
- 18.- El ácido nucleico IMI aislado de la reivindicación 17, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 1.
- 19.- Un método para reprimir malas hierbas en la vecindad de una planta de trigo, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y la planta de trigo, en donde la planta de trigo tiene una resistencia al herbicida de imidazolinona incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo, en donde la planta de trigo comprende al menos un ácido nucleico IMI seleccionado del grupo que consiste en:
- a) polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1;
  - b) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI codificada por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1; y
  - c) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI que comprende al menos una identidad de la secuencia de aminoácidos del 90% con cualquier polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, en donde la proteína IMI comprende una sustitución de serina por asparagina en el Dominio E.
- 20.- El método de la reivindicación 19, en el que la planta de trigo no es transgénica, y la planta de trigo comprende, además, un ácido nucleico Imi1, un ácido nucleico Imi2 o tanto un ácido nucleico Imi1 como un ácido nucleico Imi2.
- 21.- El método de la reivindicación 19, en el que el herbicida de imidazolinona se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolina-carboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluenoato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluenoato de metilo.
- 22.- Un método para reprimir malas hierbas en la vecindad de una planta de trigo, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y la planta de trigo, en donde la planta de trigo tiene una resistencia al herbicida de imidazolinona incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo, en donde la planta de trigo
- (a) comprende las características de resistencia a herbicidas de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; o
  - (b) es un derivado recombinante o tratado mediante ingeniería genética, de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; o
  - (c) es un descendiente de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra

representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113; y  
 en donde la planta de trigo comprende un polipéptido Einkorn IMI3 que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1.

5 23.- El método de la reivindicación 22, en el que la planta de trigo es una progenie de una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.

10 24.- El método de la reivindicación 22, en el que la planta de trigo es una planta de la línea Einkorn IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de la línea ante la ATCC bajo el Número de Designación de Depósito de Patente PTA-4113.

15 25.- El método de la reivindicación 22, en el que el herbicida de imidazolinona se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolina-carboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metilo.

20 26.- Un método para modificar una tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona, que comprende modificar la expresión de al menos un ácido nucleico IMI, en donde el ácido nucleico IMI se selecciona del grupo que consiste en:

- a) polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1;
- 25 b) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI codificada por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1; y
- c) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI que comprende al menos una identidad de la secuencia de aminoácidos del 90% con cualquier polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, en donde la proteína IMI comprende una sustitución de serina por asparagina en el Dominio E,
- 30 en el que modificar la expresión de al menos un ácido nucleico IMI comprende
  - i) transformar la planta con un vector que contiene cualquiera o más de los ácidos nucleicos codificadores de IMI, o
  - 35 ii) inducir en la planta un promotor nativo de un ácido nucleico IMI endógeno.

27.- El método de la reivindicación 26, en el que la planta de trigo no es transgénica, y la planta comprende, además, un ácido nucleico lmi1, un ácido nucleico lmi2 o tanto un ácido nucleico lmi1 como un ácido nucleico lmi2.

40 28.- Un método para producir una planta transgénica que tiene una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona, que comprende:

- a) transformar una célula vegetal con uno o más vectores de expresión que comprenden múltiples ácidos nucleicos IMI, en donde el ácido nucleico IMI se selecciona del grupo que consiste en:
  - 45 i) polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1;
  - ii) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI codificada por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1; y
  - iii) polinucleótidos que codifican cualquier proteína IMI que comprende al menos una identidad de la secuencia de aminoácidos del 90% con cualquier polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, en donde la proteína IMI comprende una sustitución de serina por asparagina en el Dominio E;
  - 50 y
- b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

55 29.- Una planta transgénica, producida por el método de la reivindicación 28.



30.- Una semilla, producida por la planta transgénica de la reivindicación 29, en donde la semilla comprende el ácido nucleico IMI.

5 31.- Un método para reprimir malas hierbas en la vecindad de una planta, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y a la planta, en donde la planta tiene una resistencia al herbicida de imidazolinona incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, y en donde la planta es la planta transgénica de la reivindicación 29.

Figura 1

Secuencia parcial de ADNc de Einkorn IMI3 (SEQ ID NO: 1)

GATGGTAGTTTCCTCATGAACATTGAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTGA  
 TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCA  
 CACACATACCTTGCCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT  
 CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC  
 CAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACCGGAGGT  
 GCTTTAAGGACATGA

Figura 2

			400
3_end_Einkorn	(SEQ ID NO:2)	(381)	GATGGTAGTTTCCTCATGAA
EM2	(SEQ ID NO:1)	(1)	GATGGTAGTTTCCTCATGAA
Consenso	(SEQ ID NO:3)	(381)	GATGGTAGTTTCCTCATGAA
		401	450
3_end_Einkorn	(401)	CATTGAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTGA	
EM2	(31)	CATTGAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTGA	
Consenso	(401)	CATTGAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTGA	
		451	500
3_end_Einkorn	(451)	TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG	
EM2	(81)	TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG	
Consenso	(451)	TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG	
		501	550
3_end_Einkorn	(501)	TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA	
EM2	(131)	TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA	
Consenso	(501)	TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA	
		551	600
3_end_Einkorn	(551)	GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTT	
EM2	(181)	GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTT	
Consenso	(551)	GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTT	
		601	650
3_end_Einkorn	(601)	CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG	
EM2	(231)	CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG	
Consenso	(601)	CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG	
		651	700
3_end_Einkorn	(651)	ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGTCCCGCATCA	
EM2	(281)	ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGTCCCGCATCA	
Consenso	(651)	ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGTCCCGCATCA	
		701	750
3_end_Einkorn	(701)	GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACCGGAGGTGCTTTAAGGACATGA	
EM2	(331)	GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACCGGAGGTGCTTTAAGGACATGA	
Consenso	(701)	GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACCGGAGGTGCTTTAAGGACATGA	

Figura 3

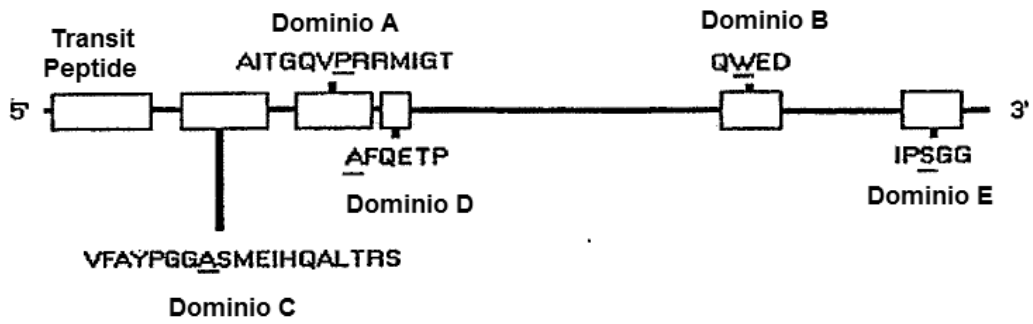


Figura 4

Código	Descripción
EM2	Línea derivada de doble haploide de P00.45 (véase el Ejemplo 2)
11A	Una línea de trigo hexaploide que contiene la mutación 11A de IMI homocigótica, que se manifiesta no alélica tanto con mutaciones 15A como con la mutación FS4
EM2FS4	Línea derivada de doble haploide que contiene tanto la mutación EM2 de trigo einkorn introgresado en un fondo de trigo hexaploide como la mutación FS4 en trigo hexaploide
15A	Una línea de trigo hexaploide que contiene las mutaciones 15A de IMI homocigóticas, que demuestran tener dos genes de tolerancia a IMI independientes, uno de los cuales era alélico a la mutación FS4
FS4	Una línea de trigo hexaploide que contiene la mutación FS4 de IMI homocigótica, un solo locus, localizado en el genoma D (Jim Anderson, comunicación personal)
Teal	Un trigo hexaploide susceptible a la aplicación de imazamox

Figura 5

Línea de Tabla Nº#	Cruce	Gen	Observado		Relación	Esperada		p
			Toler.	Susc.		Toler.	Susc.	
1	11A/Teal	F2	505	189	3:1	521	174	0.1742
2	15A/Teal	F2	893	74	15:1	907	60	0.0716
3	EM2/15A	F2	1940	0				
4	15A/FS4	F2	410	0				
5	EM2+FS4/15A	F2	1134	0				
6	EM2/11A	F2	1331	100	15:1	1342	89	0.2300
7	EM2/FS4	F2	1192	72	15:1	1185	79	0.4160
8	EM2+FS4/11A	F2	622	16	63:1	628	10	0.0580
9	11A/FS4	F2	688	47	15:1	689	46	0.8714
10	11A/15A	F2	600	14	63:1	604	10	0.1516

Figura 6

	testigo Einkorn		EM2	
	imazamox, g/ha		imazamox, g/ha	
<b>1998</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>40</b>
Rendimiento (kg/ha)	3011	0	3792	3494
Despunte (días)	52	0	52	53
Madurez (días)	79	0	79	79
Altura (cm)	85	0	85	85
<b>1999</b>				
Rendimiento (kg/ha)	2349	0	2687	3219
Despunte (días)	63	0	62	62
Madurez (días)	110	0	110	110
Altura (cm)	109	0	106	108
<b>2000</b>				
Rendimiento (kg/ha)	2238	0	2676	2684

Figura 7

		% de lesion en tres instantos (DAT = días después de tratamiento en fase de 3-4 hojas)					
		EM2			Testigo Einkorn		
g ia/ha		16 DAT	41 DAT	78 DAT	16 DAT	41 DAT	78 DAT
1999 1 Loc	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	15	2.5	0.3	0.0	93.8	100.0	97.3
	30	2.5	1.3	0.0	96.0	99.5	99.3
	60	7.5	2.5	0.0	97.0	100.0	99.5
		EM2			Testigo Einkorn		
		18 DAT	44 DAT	73 DAT	18 DAT	44 DAT	73 DAT
2000 2 Loc Ave	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	15	0.0	0.0	0.0	93.1	96.9	98.1
	30	0.0	0.0	0.0	53.0	97.4	99.4
	60	0.0	0.0	0.0	97.5	99.5	100.0

Figura 8

Genotipo	g/ha de Imazamox			
	200		600	
	%lesionado	%Sin lesión	%lesionado	%Sin lesión
BW755 (FS4)	100	0	100	0
Teal 15A (2 genes)	0	100	100	0
EM2/FS4 (2 genes)	0	100	100	0
15A/11A (3 genes)	33	67	48	52