

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 553**

51 Int. Cl.:
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04786222 .2**
96 Fecha de presentación: **30.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1659855**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona**

30 Prioridad:
29.08.2003 US 498895 P
30.12.2003 US 533105 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA
AGROPECUARIA
RIVADAVIA 1439
01033 BUENOS AIRES, AR**

72 Inventor/es:
**LIVORE, Alberto B.;
PRINA, Alberto R.;
BIRK, Iwona y
SINGH, Bijay**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 379 553 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 arroz que tienen tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona en general con plantas que tienen una tolerancia aumentada a los herbicidas de imidazolinona. Más específicamente, la presente invención se relaciona con plantas de arroz obtenidas mediante mutagenia y cruzabilidad y transformación que tiene una tolerancia aumentada a los herbicidas de imidazolinona.

Antecedentes de la invención

10 De acuerdo con una encuesta a los agricultores, las principales limitaciones para la producción de arroz son malezas (Hidaka et al., *Agrochemicals Japan*, 2000, 77: 21-29). La siembra directa ha reducido los problemas trabajo de trasplantar, sin embargo esta tecnología ha ayudado a aumentar el problema de la maleza. El uso de herbicida en cultivos de arroz es una práctica común en la mayor parte de las regiones arroceras que dirigen los cultivos de semillas de arroz y/o en países desarrollados que cultivan arroz bajo sistemas de siembra directa o trasplante. Usualmente se aplica un herbicida para pasto y para hoja ancha una o más veces con el fin de controlar las malezas en los cultivos de arroz.

15 Los pastos, juncos y malezas arroz ("arroz rojo") han sido los principales grupos de especies que son aptos para los mismos ambientes donde se cultiva el arroz. Estas malezas se han llegado a distribuir globalmente y son difíciles de controlar en los cultivos de arroz. El arroz rojo pertenece a la misma especie que el arroz cultivado (*Oryza sativa* L.). La similitud genética del arroz rojo y el arroz comercial ha hecho difícil el control de herbicidas del arroz rojo. Diversas prácticas de cultivo ayudan en el control de malezas y son convenientes para mejor cuidado del medio ambiente, tal como preparación de tierra, nivelación del terreno, diques y profundidad del agua, rotación de la tierra, siembra certificada, sistemas de planta apropiados y fechas de plantación. Aunque estas prácticas de cultivo pueden ayudar a reducir el banco de semillas de maleza y el desarrollo de malezas tolerantes al herbicida, estas imponen ciertas restricciones y aumentan el coste del cultivo.

25 A pesar de las muchas recomendaciones para las mejores prácticas de cultivo, los agricultores aún confían en el uso de herbicidas como la herramienta principal para controlar los malezas. El uso y abuso de algunos de estos productos químicos ha resultado en el desarrollo de malezas tolerantes como pasto dentado resistentes al Propanilo y Butaclor (*Echinochloa crus galli*). En estos casos, es conveniente tener otros herbicidas con diferentes modos de acción con la capacidad de controlar la mayor parte de estas especies de malezas, de tal manera que su aplicación se puede alternar con los herbicidas comúnmente aplicados.

30 La sintasa acetohidroxiácida (AHAS; EC 4.1.3.18, sintasa acetolactato (ALS)), codificada por el ácido nucleico AHAS, 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 in: Singh B. K. (Ed) Plant amino acids*. Marcel Dekker Inc. New York, New York. Pg 227-247). El AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicida estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (LaRossa RA and Falco SC, 1984, *Trends Biotechnol.* 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner et al., 1984, *Plant Physiol.* 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian and Gerwick, 1989, *Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in (Ed) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. Pg 277-288*), y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al., 1990, *Plant Physiol.* 94: 239-244.). Se utilizan ampliamente los herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea en la agricultura moderna debido a su efectividad en índices de aplicación muy bajos y sin toxicidad relativa en animales. Al inhibir la actividad AHAS, estas familias de herbicidas evitan el crecimiento y desarrollo adicional de plantas susceptibles que incluyen muchas especies de malezas. Diversos ejemplos de herbicidas de imidazolinona comercialmente disponibles son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas sulfonilurea son clorsulfurón, metil metsulfurón, metil sulfometurón, etil clorimurón, metil tifensulfurón, metil tribenurón, metil bensulfurón, nicosulfurón, metil etametsulfurón, rimsulfurón, metil triflurosulfurón, triasulfurón, metil primisulfurón, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, etil pirazosulfurón, y halosulfurón.

50 Debido a su alta efectividad y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se favorecen para aplicación por rociado sobre la parte superior de un rango amplio de vegetación. La capacidad de rociar un herbicida sobre la parte superior de un amplio rango de vegetación reduce los costes asociados con el establecimiento y mantenimiento de la plantación, y reduce la necesidad para la preparación del sitio antes de uso de tales agentes químicos. El rociado sobre la parte superior de una especie tolerante deseada también resulta en la capacidad de alcanzar el potencial de producción máximo de la especie deseada debido a la ausencia de las especies competitivas. Sin embargo, la capacidad para utilizar tales técnicas de rociado es dependiente de la presencia de las especies tolerantes a imidazolinona de la vegetación deseada en el rociado sobre el área.

Entre los principales cultivos agrícolas, algunas especies leguminosas tales como soja son resistentes de forma natural a los herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad para metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner and Robson, 1985, Weed Sci. 33:469-471). Otros cultivos tales como maíz (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100: 882-886) y arroz (Barrett et al., 1989, Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, pp. 195-220) son susceptibles a los herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona es dependiente de la naturaleza química del herbicida particular y el metabolismo diferencial del compuesto de una forma tóxica a no tóxica en cada planta (Shaner et al., 1984, Plant Physiol. 76:545-546; Brown et al., 1987, Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Otras diferencias fisiológicas de planta tales como absorción y translocación también cumplen una función importante en la sensibilidad (Shaner and Robson, 1985, Weed Sci. 33:469-471).

Los cultivos resistentes a las imidazolinonas, sulfonilureas y triazolpirimidinas se han producido exitosamente utilizando mutagenia de semillas, microesporas, polen, y callos en *Zea mays*, *Brassica napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (Sebastian et al., 1989, Crop Sci. 29:1403-1408; 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 gen nuclear parcialmente dominante, único confiere resistencia. También se aislaron previamente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona luego de mutagenia de semilla de *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882-886). Los estudios confirman que la herencia que un gen parcialmente dominante, único confiere resistencia. Con base en los estudios alélicos, los autores concluyen que las mutaciones en las cuatro estirpes identificadas se ubican en el mismo sitio. Uno de los genes de resistencia al cultivo Fidel se designa FS-4 (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882-886).

El modelamiento con base en ordenador de la conformación tridimensional del complejo de inhibidor AHAS predice diversos aminoácidos en el bolsillo de unión de inhibidor propuesto como sitios donde se inducen mutaciones que conferirán probablemente resistencia selectiva a las imidazolinonas (Ott et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:359-368). Las plantas de tabaco se producen con algunas de estas mutaciones racionalmente designadas en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS que tiene de hecho resistencia específica exhibida en una clase única de herbicidas (Ott et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:359-368).

La resistencia de las plantas a los herbicidas de imidazolinona también se ha reportado en un número de patentes. Las Patentes Estadounidenses Nos. 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439, y 6,222,100 describen de manera general el uso del ácido nucleico AHAS alterado para provocar resistencia herbicida en plantas, y específicamente describe ciertas estirpes de maíz resistentes a la imidazolinona. La Patente Estadounidense No. 5,013,659 describe plantas que exhiben resistencia herbicida que poseen mutaciones en por lo menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas allí codifican resistencia cruzada para las imidazolinonas y sulfonilureas o resistencia específica a la sulfonilurea, pero no se describe la resistencia específica a la imidazolinona. Adicionalmente, la Patente Estadounidense No. 5,731,180 y la Patente Estadounidense No. 5,767,361 discuten un gen aislado que tiene una única sustitución de aminoácido en una secuencia de aminoácidos AHAS monocotiledónea tipo natural que resulta en resistencia específica a imidazolinona.

También se han descrito plantas de arroz resistentes al herbicida y transgénicas. Se describe un mutante de arroz resistente a un herbicida sulfonilurea, derivado por presión selectiva en el cultivo de tejido de callo, cuando se atribuye resistencia a una enzima mutante AHAS (Terakawa et al., "Rice Mutant Resistant to the Herbicide Bensulfurón Metil (BSM) by in vitro Selection," Japan. J. Breed., 1992 vol. 42:267-275). Se han descrito otras variedades de planta de arroz resistentes al herbicida en patentes y solicitudes de patente, que incluyen WO 97/41218, WO 01/85970 y Patente Estadounidense Nos. 5,545,822, 5,736,629, 5,773,704, Patente Estadounidense No. 5,773,703, 5,952,553, y 6,274,796. La Patente Estadounidense No. 5,545,822 describe una estirpe de plantas de arroz que tienen una resistencia metabólicamente basada a los herbicidas que interfieren con la sintasa de acetohidroxiácido de enzima de planta; es decir, la resistencia al herbicida de estas plantas de arroz no se debe a una enzima AHAS resistente. La WO 97/41218 describe una estirpe de plantas de arroz que tienen una enzima AHAS variante que es resistente a los herbicidas que interfieren con la sintasa acetohidroxiácido de enzima de planta tipo natural. Esta estirpe de plantas de arroz se desarrolla al exponer semillas de arroz al etil éster de ácido metanosulfónico de mutágeno (EMS), y detecta millones de progenie para resistencia al herbicida.

Lo que se necesita en la técnica es la identificación de estirpes de arroz adicionales que comprenden genes de resistencia a la imidazolinona. También lo que se necesita en la técnica son plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a los herbicidas tales como imidazolinona y que contienen por lo menos un ácido nucleico AHAS alterado. También se necesitan métodos para controlar el crecimiento de malezas en la vecindad de tales plantas de arroz. Estas composiciones y métodos permitirán el uso de las técnicas de rociado cuando se aplican herbicidas a las áreas que contienen plantas de arroz.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona plantas de arroz que comprenden ácidos nucleicos AHAS variantes no recombinantes, en donde el ácido nucleico variante confiere a la planta de arroz tolerancia aumentada a los herbicidas de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta, en donde la planta de arroz es un derivado o progenie de la planta de arroz con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208, en donde la planta de arroz con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208 comprende el ácido nucleico AHAS variante. El ácido nucleico AHAS variante codifica una proteína AHAS variante que comprende una sustitución de alanina a treonina cuando se compara con una proteína AHAS tipo natural. También se proporcionan partes de planta y semillas de planta derivadas de las plantas de arroz descritas aquí.

Los ácidos nucleicos AHAS variantes de la presente invención comprenden una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 1; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 3; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 5; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 11; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 2; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 4; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 6; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido complementario con cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente, en donde el ácido nucleico AHAS variante codifica un polipéptido AHAS que confiere tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con un polipéptido AHAS tipo natural.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas. En una realización, las plantas de la presente invención no son transgénicas. Ejemplos de plantas de arroz transgénicas que tienen tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona incluyen una planta de arroz que tiene el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41208, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; o un derivado construido genéticamente por ingeniería, recombinante o mutante de la planta con el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; o cualquier progenie de la planta con NCIMB el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; o una planta que es una progenie de cualquiera de estas plantas.

Además de las composiciones de la presente invención, se proporcionan diversos métodos. Se describen aquí métodos para modificar la tolerancia de una planta de arroz a un herbicida de imidazolinona que comprende modificar la expresión de un ácido nucleico AHAS en la planta. También se describen métodos para producir una planta transgénica que tiene tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona que comprende, transformar una célula de planta con un vector de expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos AHAS variantes que codifican una proteína AHAS variante que comprende una sustitución alanina a treonina cuando se compara con una proteína AHAS tipo natural y generar la planta a partir de la célula de planta. La invención incluye adicionalmente un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de arroz, en donde la planta de arroz tiene tolerancia aumentada al herbicida imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta de arroz y en donde la planta comprende uno o más ácidos nucleicos AHAS que codifican una proteína AHAS variante que comprende una sustitución de alanina a treonina cuando se compara con una proteína AHAS tipo natural.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-B muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 2).

Las figuras 1C-D muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 4 (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 4).

Las figuras 1E-F muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 5 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 6).

Las figuras 1G-H muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IRGA 417 tipo natural (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 8).

La figura 2 muestra la alineación de la secuencia cADN del gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe IMINTA 1 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 1), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe

5 IMINTA 4 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 3), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe IMINTA 5 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 5), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe de arroz tipo natural IRGA 417 (SEQ ID NO: 7), y una secuencia consensus del gen AHAS de arroz (SEQ ID NO: 9). El polimorfismo de nucleótido confiere tolerancia a la imidazolinona a las estirpes IMINTA 1, 4, y 5 que se indica en

10 La figura 3 muestra la alineación de aminoácido de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen AHAS de la estirpe IMINTA 1 tolerante a imidazolinona (SEQ ID NO: 2), la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen A-HAS de la estirpe IMINTA 4 tolerante a imidazolinona (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen AHAS de la estirpe IMINTA 5 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 6), la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen AHAS de la estirpe de arroz IRGA 417 tipo natural (SEQ ID NO: 8), y una secuencia consensus de aminoácido AHAS de arroz (SEQ ID NO: 10). El polimorfismo confiere tolerancia a la imidazolinona a las estirpes IMINTA 1, 4, y 5 que se indica en

15 La figura 4A muestra un ejemplo de un cADN de longitud completa de un ácido nucleico variante AHAS (SEQ ID NO: 11) y la figura 4B muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen AHAS mostrado en la figura 4A (SEQ ID NO: 12), en donde el polipéptido confiere tolerancia a una imidazolinona en comparación con un polipéptido AHAS tipo natural.

La figura 5 es una tabla que muestra el diseño de bloque aleatorio para el ensayo de campo de la estirpe IMINTA 1 y la variedad IRGA 417.

20 La figura 6 es una tabla que muestra la respuesta de IRGA 417 y las estirpes IMINTA 1 para tratamiento mediante imidazolinona.

La figura 7 es una tabla que muestra la producción de grano en 14% de humedad para IRGA 417 y las estirpes IMINTA 1 después de tratamiento con imidazolinona.

25 La figura 8 es una tabla que muestra la evaluación de los componentes de producción en IRGA 417 y las estirpes IMINTA 1 después de tratamiento con imidazolinona.

Descripción Detallada

30 La presente invención está dirigida a plantas de arroz, partes de plantas de arroz y células de plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona. La presente invención también incluye semillas producidas por las plantas de arroz descritas aquí y métodos para controlar las malezas en la vecindad de las plantas de arroz descritas aquí. Se entiende que como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, "un" o "uno" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se utilice. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que por lo menos se puede utilizar una célula.

35 Como se utiliza aquí, el término "planta de arroz" se refiere a una planta que es un miembro del género *Oryza*. Las plantas de arroz de la presente invención pueden ser miembros de un género *Oryza* que incluye, pero no se limita a, *O. alta*, *O. australiensis*, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. eichingeri*, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, *O. grandigumis*, *O. granulata*, *O. latifolia*, *O. longiglumis*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis*, *O. meyeriana*, *O. minuta*, *O. nivara*, *O. officinalis*, *O. punctata*, *O. rhizomatis*, *O. ridleyi*, *O. rufpogon*, *O. sativa*, y *O. schiechteri* e híbridos de los mismos. Ejemplos de las subespecies *O. sativa* incluidas dentro de la presente invención son Japonica, y Indica. Un cultivo no limitante de Japonica es Nipponbare, y un ejemplo no limitante de Indica es el cultivo 93-11.

40 El término "planta de arroz" está destinado a abarcar plantas de arroz en cualquier etapa de madurez o desarrollo, así como también cualesquier tejidos u órganos (partes de planta) tomados o derivados de cualquier tal planta a menos que se indique claramente otra cosa por el contexto. Las partes de planta incluyen, pero no se limitan a, tallos, raíces, flores, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, cultivos de antera, gametofitos, esporofitos, polen, microesporas, protoplastos, y similares. La presente invención también incluye semillas producidas por las plantas de arroz de la presente invención. En una realización, las semillas son genéticamente puras para una tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la semilla de la planta de arroz.

50 La presente invención describe una planta de arroz que comprende por lo menos un ácido nucleico AHAS variante no recombinante, en donde la planta de arroz ha aumentado la tolerancia a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta. Como se utiliza aquí, el término "sitio de gen AHAS" se refiere a la posición de un gen AHAS en un genoma, y los términos "gen AHAS" y "ácido nucleico AHAS" se refiere a un ácido nucleico que codifica la enzima AHAS.

Como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico AHAS variante" se refiere un ácido nucleico AHAS agregado que tiene una secuencia que se muta de un ácido nucleico AHAS tipo natural y que confiere tolerancia a imidazolinona aumentada a una planta en la que se expresa. Como se utiliza aquí, el término "alelo variante AHAS " se refiere a un copia única single de un ácido nucleico AHAS particular.

5 De acuerdo con lo anterior, la presente invención incluye una planta de arroz que comprende un ácido nucleico AHAS de variante no recombinante, en donde la planta de arroz tiene tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta y en donde el ácido nucleico AHAS variante codifica una proteína variante AHAS que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se
10 compara con una proteína AHAS tipo natural. La mutación de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de aminoácidos AHAS como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El ácido nucleico AHAS variante se selecciona del grupo que consiste de una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 11; un polinucleótido que codifica el polipéptido
15 mostrado en la SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 6; y un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 12.

La presente invención incluye plantas de arroz que comprende uno o más alelos AHAS, en donde la planta de arroz ha aumentado la tolerancia un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta. Los alelos AHAS pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la
20 SEQ ID NO: 3; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 11; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 5; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido complementario cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente.

En una realización, la planta de arroz comprende dos ácidos nucleicos AHAS variantes diferentes. En otra realización, la planta de arroz comprende un ácido nucleico AHAS variante, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, por lo menos uno de los ácidos nucleicos AHAS variantes comprenden una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo
30 que consiste de la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; y SEQ ID NO: 5.

El herbicida imidazolinona se puede seleccionar de, pero no se limita a, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, o una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY®). Más específicamente, el
35 herbicida imidazolinona se puede seleccionar de, pero no se limita a, 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-quinolinacarboxílico, 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-methylnicotínico, y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-mtoluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin- 2-il)-p-
40 toluato. 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.

Las plantas de arroz descritas aquí pueden ser plantas de arroz transgénicas o plantas de arroz no transgénicas. Como se utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula de planta, callo, tejido de planta, o
45 parte de planta, que contiene todo o parte de por lo menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante se integra establemente dentro de un cromosoma o elemento extracromosómico estable, ya que este se pasa en generaciones sucesivas. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinante se refiere a un polinucleótido que se ha alterado, redispuesto o modificado por ingeniería genética. Ejemplos incluyen cualquier polinucleótido clonado, o polinucleótidos, que se ligan o se unen a las secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones de los polinucleótidos que resultan de los eventos que ocurren en forma natural, tales como mutaciones espontáneas, o de mutagenia no espontánea seguido por siembra selectiva. Las plantas que contienen mutaciones que surgen debido a la mutagenia no espontánea y la siembra selectiva se denominan aquí como plantas no transgénicas y se incluyen en la presente invención.

55 Un ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS variante es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene NCLMB, el Número de Designación de Depósito de Patente NCLMB 41206, designada aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 1. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 1 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Otro ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41207, designado aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 4. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 4 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 3.

5 Otro ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41208, designado aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 5. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 5 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 5.

10 Los depósitos separados de aproximadamente 2500 semillas cada una se hacen estirpes de trigo tolerantes a la imidazolinona con el NCIMB, Aberdeen, Scotland, UK en Diciembre 22, 2003. Estos depósitos se hacen de acuerdo con los términos y provisiones del Tratado de Budapest con relación al depósito de los microorganismos. Los depósitos se hacen para un término de por lo menos treinta años y por lo menos cinco años después que la mayor parte de solicitudes recientes para presentación de una muestra del depósito se recibe por el NCIMB. Las semillas depositadas acuerdan el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, y NCIMB 41208.

15 La presente invención incluye la planta de arroz que tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; un derivado de la planta construida genética por ingeniería, mutante o recombinante con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41208, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; cualquier progenie de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41208, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; y una planta que es la progenie de cualquiera de estas plantas, en una realización preferida, la planta de arroz de la presente invención tiene adicionalmente las características de tolerancia al herbicida de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41208, NCIMB 41207, y NCIMB 41208.

20 También se incluyen en la presente invención híbridos de las estirpes de plantas de arroz IMINTA 1, 4, y 5 descritos aquí e híbridos del IMINTA 1, 4, y 5 con otra planta de arroz.

25 Los términos "cultivo" 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 aquellos expertos en la técnica como suficientes para distinguir un cultivo o variedad de otro cultivo o variedad. No existe implicación en el término que todas las plantas de cualquier cultivo dado o variedad serán genéricamente idénticas al gen completo o nivel molecular o aquel de cualquier planta dada será homocigoto a todos los locus. Un cultivo o variedad se considera "genéticamente puro" para un rasgo particular si, cuando el cultivo genéticamente puro o variedad se auto poliniza, toda la progenie contiene los rasgos. Los términos "estirpe consanguínea" o "estirpe" se refieren a un grupo de plantas dentro de un cultivo definido por compartir un conjunto común de características o rasgos aceptados por aquellos expertos en la técnica como suficientes para distinguir una estirpe consanguínea o estirpe de otra estirpe consanguínea o estirpe.

30 No existe implicación en el término que todas las plantas de cualquier estirpe consanguínea dada o estirpe será genéticamente idéntica al gen completo o nivel molecular o aquel de cualquier planta dada será homocigota en todos los locus. Una estirpe consanguínea o estirpe se considera "genéticamente pura" para un rasgo particular si, cuando la estirpe consanguínea pura o estirpe consanguínea se auto poliniza, toda la progenie contiene el rasgo. En la presente invención, el rasgo surge de una mutación en un gen AHAS de la planta de arroz o semilla.

35 Se entiende que la planta de arroz de la presente invención puede comprender un ácido nucleico AHAS tipo natural además de un ácido nucleico AHAS variante. Como se describe en el Ejemplo 2, se contempla que las estirpes de arroz IMINTA 1, 4, y 5 contienen una mutación en solo un alelo AHAS. Por lo tanto, la presente invención incluye una planta de arroz que comprende por lo menos un ácido nucleico AHAS variante además de uno o más ácidos nucleicos AHAS tipo natural.

40 Además de las plantas de arroz, las proteínas AHAS aisladas y ácidos nucleicos que contienen preferiblemente tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con las proteínas AHAS tipo natural y se describen aquí los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos AHASa aislados pueden codificar una proteína que tiene una mutación de alanina a treonina. La mutación de alanina a treonina se puede ubicar en un residuo de amino ácido que corresponde a la posición 96 de la SEQ ID NO: 12. Los ácidos nucleicos aislados pueden comprender un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 1; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 3; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 5; un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 11; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 6; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12; un polinucleótido que comprende por lo menos 60 nucleótidos consecutivos de cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente; y un polinucleótido complementario a cualquiera de

los polinucleótidos mencionados anteriormente. En una realización preferida, el ácido nucleico AHAS aislado comprende una secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 11.

El término "proteína AHAS" o "polipéptido AHAS" se refiere a una proteína de sintasa acetohidroxiácido, y los términos "proteína AHAS variante" o "polipéptido AHAS variante." se refiere a cualquier proteína AHAS que se muta de una proteína AHAS tipo natural y que contiene tolerancia a imidazolinona aumentada a una planta, célula de planta, parte de planta, semilla de planta, o tejido de planta cuando se expresa allí. En una realización preferida, la proteína AHAS variante comprende un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 1. en otra realización preferida, la proteína AHAS variante comprende un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 3. en otra realización preferida, la proteína AHAS variante comprende un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 5. en todavía otra realización preferida, la proteína AHAS variante comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

También como se utiliza aquí, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, de hebra doble o de hebra sencilla, o un híbrido de los mismos. El término también abarca los híbridos de ARN/ADN. Estos términos también abarcan la secuencia no traducida en los extremos 3' y 5' de la región codificante del gen: por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos de la secuencia en la dirección 5' del extremo 5' de la región codificante y por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos de la secuencia en la dirección 3' del extremo 3' de la región codificante del gen. Menos bases comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otros también se pueden utilizar para par de ribozima, dsARN y anticodificante. Por ejemplo, los polinucleótidos que contienen análogos propina C-5 de uridina y citidina se ha mostrado que une el ARN con alta afinidad y son inhibidores anticodificantes potentes de la expresión de gen. Otras modificaciones, tales como la modificación de la estructura principal de fosfodiéster, o también se puede hacer el 2'-hidroxi en el grupo de azúcar de ribosa del ARN. Los polinucleótidos y ribozimas anticodificantes pueden consistir completamente de ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos mezclados. Los polinucleótidos descritos aquí se pueden producir por cualesquier medios, que incluyen preparaciones genómicas, preparaciones de cADN, síntesis in vitro, RT-PCR y transcripción in vitro o in vivo.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se separa sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, las secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias que flanquean en forma natural el ácido nucleico (es decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón que ocurre en forma natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. Una molécula de ácido nucleico A-HAS aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de las secuencias de nucleótido que flanquean en forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido (por ejemplo, una célula *O. sativa*). Un ácido nucleico también se considera aislado si se ha alterado mediante la intervención humana, o se pone en un locus o ubicación que no es su sitio natural, o si se introduce dentro de una célula mediante agroinfección, biolísticos, o cualquier otro método de transformación de planta. Más aún, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cADN, puede ser libre de alguno de otro material celular con el que se asocia de forma natural, o el medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente.

Específicamente se excluyen de la definición de "ácidos nucleicos aislados": cromosomas que ocurren en forma natural (tales como extensiones de cromosoma), colecciones de cromosoma artificial, colecciones genómicas, y colecciones de cADN que existen como una preparación de ácido nucleico in vitro o como una preparación de célula anfitriona transfecteda/transformada, en donde las células anfitrionas son una preparación heterogénea in vitro o se ponen en placas como una población heterogénea de únicas colonias. También específicamente se excluyen las colecciones anteriores en donde un ácido nucleico específico hace menos de 5% del número de insertos nucleicos agregados en las moléculas de vector. Adicionalmente se excluyen específicamente las preparaciones de ADN genómicas de célula completa o las preparaciones de ARN de célula completa (que incluyen preparaciones de célula completa que se comparten mecánicamente o se digieren enzimáticamente). Aún adicionalmente se excluyen específicamente las preparaciones de célula completa encontradas como una preparación in vitro o como una mezcla heterogénea separada mediante electroforesis en donde el ácido nucleico de la invención no se ha separado adicionalmente de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separar adicionalmente al extirpar una banda sencilla de una población de banda heterogénea en un gel de agarosa o transferencia a nylon).

Una molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11 o una porción de la misma se puede aislar utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada aquí. Por ejemplo, el cADN de AHAS a. *O. sativa* se puede aislar de una colección *O. sativa* utilizando todo o una porción de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 11. Más aún, una molécula de ácido nucleico que abarca todo o una porción de la SEQ ID NO:

1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 11 se puede aislar mediante la reacción de cadena polimerasa utilizando los cebadores de oligonucleótido designados con base en esta secuencia. Por ejemplo, el mRNA se puede aislar de las células de planta (por ejemplo, mediante el procedimiento de extracción de guanidinio-tiocianato de Chirgwin et al., 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299), y se puede preparar el cADN utilizando transcriptasa inversa (por ejemplo, transcriptasa inversa Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa AMV, disponible de Seikagaku America, inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores de oligonucleótido sintéticos para la amplificación de la reacción de la cadena polimerasa se puede designar con base en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 11. Una molécula nucleica agregada de la invención se puede amplificar utilizando cADN o, alternativamente, ADN genómico, como una plantilla y cebadores de oligonucleótido apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación PCR estándar. La molécula de ácido nucleico así amplificada se puede clonar en un vector apropiado y se caracteriza por análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos que corresponden a una secuencia de nucleótidos AHAS se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

Los ácidos nucleicos AHAS descritos aquí puede comprender las secuencias que codifican una Proteína AHAS (es decir, "regiones codificantes"), así como también las secuencias no traducidas 5' y las secuencias no traducidas 3'. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender solo las regiones codificantes de un gen AHAS, o pueden contener fragmentos genómicos completos aislados del ADN genómico. Una región codificante de estas secuencias se indica como una "posición ORF." Más aún, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una porción de una región codificante de un gen AHAS, por ejemplo, un fragmento que se puede utilizar como una sonda o un cebador. La secuencia de nucleótidos determinada de la clonación del gen AHAS de *O. sativa* permite la generación de sondas y cebadores designados para uso en identificar y/o clonar los homólogos AHAS en otros tipos de células y organismos, así como también los homólogos AHAS de otras plantas de arroz y especies relacionadas. La porción de la región codificante también puede codificar un fragmento biológicamente activo de una proteína AHAS.

Como se utiliza aquí, el término "porción biológicamente activa de" una proteína AHAS está destinada a incluir una porción, por ejemplo, un dominio/motivo, de una proteína AHAS que, cuando se produce en una planta aumenta la tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta. Los métodos para cuantificar la tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona se proporcionan en los Ejemplos adelante. Las porciones biológicamente activas de una proteína AHAS incluyen péptidos derivados de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 12 que incluyen pocos aminoácidos que una proteína AHAS de longitud completa e imparte tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona luego de la expresión en una planta. Típicamente, las porciones biológicamente activas (por ejemplo, péptidos que tienen, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, o más aminoácidos de longitud) comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad de una proteína AHAS. Más aún, otras porciones biológicamente activas en las que se eliminan otras regiones del polipéptido, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y se evalúan para una o más de las actividades descritas allí. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de una proteína AHAS incluyen uno o más dominios conservados seleccionados del grupo que consiste de un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E, en donde el dominio conservado contiene una mutación.

Adicionalmente, los polipéptidos de fusión o quiméricos AHAS se describen aquí. Como se utiliza aquí, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" AHAS comprende un polipéptido AHAS ligado operativamente a un no polipéptido AHAS. Un "no polipéptido AHAS" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que no es sustancialmente idéntica a un polipéptido AHAS, por ejemplo, un polipéptido que no es una isoenzima AHAS, cuyo péptido realiza una función diferente que un polipéptido AHAS. Como se utiliza aquí con respecto al polipéptido de fusión, el término "ligado operativamente" está destinado a indicar que el polipéptido AHAS y el no polipéptido AHAS se fusionan entre sí hay que ambas secuencias cumplen con la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El no polipéptido AHAS se puede fusionar al terminal N o al terminal C del polipéptido AHAS. Por ejemplo; en una realización, el polipéptido de fusión es un polipéptido de fusión GST-AHAS en el que la secuencia AHAS se fusiona al terminal C de la secuencia GST. Tales polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos AHAS recombinantes, en otra realización, el polipéptido de fusión es un polipéptido AHAS que contiene una secuencia de señal heteróloga en su terminal N, en ciertas células anfitrionas (por ejemplo, células anfitrionas de mamífero), la expresión y/o secreción de un polipéptido AHAS se puede aumentar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.

Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido AHAS tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 12 se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido dentro de una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11 de tal manera que una o más sustituciones, adiciones, o eliminaciones de aminoácido se introducen dentro del polipéptido codificado. Las mutaciones se pueden introducir dentro de una secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11 mediante técnicas estándar, tales como mutagenia dirigida a sitio y mutagenia mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de amino agregadas conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácido no esenciales predichas.

Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido tienen cadenas laterales similares que se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolinea, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofán, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido AHAS se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de una secuencia codificante AHAS, tal como mediante mutagenia de saturación, y los mutantes resultantes se pueden detectar para una actividad AHAS descrita aquí para identificar los mutantes que retienen la actividad AHAS. Luego de mutagenia de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 11, el polipéptido codificado se puede expresar recombinantemente y la actividad del polipéptido se puede determinar al analizar la tolerancia a la imidazolinona de una planta que expresa el polipéptido como se describe en los Ejemplos adelante.

Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de las dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un polipéptido para alineación óptima con el otro polipéptido). Los residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondientes luego se comparan. Cuando una posición en una secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácido como la posición correspondiente en la otra secuencia, luego las moléculas son idénticas en esta posición. El mismo tipo de comparación se puede hacer entre las dos secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de secuencia = números de posiciones idénticas/números de posiciones totales x 100). Para los propósitos de la invención, el porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido se determina utilizando el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Una penalidad de espacio abierto de 15 y una penalidad de extensión de espacio de 6.66 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Una penalidad de espacio abierto de 10 y una penalidad de extensión de espacio de 0.1 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los otros parámetros se establecen en configuraciones predeterminadas.

Se entiende que para los propósitos de determinar la identidad de secuencia, cuando se compara con una secuencia de ADN a una secuencia de ARN, un nucleótido timidina equivalente a un nucleótido uracilo. Preferiblemente, los polipéptidos AHAS aislados descritos aquí son por lo menos aproximadamente 50-60%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 60-70%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, o 90-95%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99%, o más idéntico a una secuencia de aminoácidos completa mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 12.

Adicionalmente, se pueden crear ácidos nucleicos AHAS optimizados. Preferiblemente, un ácido nucleico AHAS optimizado codifica un polipéptido AHAS que modula la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona, y más preferiblemente aumenta la tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona luego de su sobreexpresión de la planta. Como se utiliza aquí, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que se construye genéticamente por ingeniería para aumentar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar los ácidos nucleicos AHAS optimizados de planta, la secuencia de ADN del gen se puede modificar a 1) comprende codones preferidos por genes de planta altamente expresados; 2) comprende un contenido de A+T en la composición base de nucleótido a aquella sustancialmente encontrada en las plantas; 3) forma una secuencia de inicio de planta, 4) elimina las secuencias que provocan desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o aquella forma de estructura secundaria de horquilla o sitios de empalme de ARN. La expresión aumentada de los ácidos nucleicos AHAS en plantas se puede lograr al utilizar la frecuencia de distribución del uso de codón en plantas en general o una planta particular. Los métodos para optimizar la expresión del ácido nucleico en las plantas se puede encontrar en la EPA 0359472; EPA 0385962; Solicitud PCT No. WO 91/16432; Patente Estadounidense No. 5,380,831; Patente Estadounidense No. 5,438,391; Perlack et al., 1991, Prec. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; y Murray et al., 1989, nucleic Acids Res. 17:477498.

Como se utiliza aquí, "frecuencia del uso de codón preferido" se refiere a la preferencia exhibida mediante una célula anfitriona específica en el uso de codones de nucleótido para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, el número de ocurrencia de este codón en el gen se divide por el número total de ocurrencias de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. De forma similar, la frecuencia del uso de codón preferida que se exhibe mediante una célula anfitriona se puede calcular al promediar la frecuencia del uso de codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula anfitriona. Se prefiere que este análisis se limite a los genes que se expresan altamente por la célula anfitriona. El porcentaje de desviación de la frecuencia del uso de codón preferido para un gen sintético de aquel empleado por una célula

anfitriona se calcula primero al determinar el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un codón único de aquel de la célula anfitriona seguido al obtener la desviación promedio sobre todos los codones. Como se define aquí, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATQ y TGG), en términos generales, la desviación promedio general del uso de codón de un gen optimizado de aquel de una célula anfitriona se calcula utilizando la ecuación $1A = n = 1 \sum X_n - Y_n X_n$ veces 100 Z en donde X_n = frecuencia de uso para codón n en la célula anfitriona; Y_n = frecuencia de uso para 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 general de la frecuencia de uso de codón, A, para todos los aminoácidos preferiblemente debe ser menor de aproximadamente 25%, y más preferiblemente menor de aproximadamente 10%.

Por lo tanto, se puede optimizar un ácido nucleico AHAS de tal manera que su distribución del uso de codón se desvía, preferiblemente, no más de 25% de los genes de planta altamente expresados y, más preferiblemente, no más de aproximadamente 10%, adicionalmente, se da consideración al porcentaje del contenido G+C de la tercera base degenerada (las monocotiledóneas parecen favorecer G+C en esta posición, mientras que las dicotiledóneas no). También se reconoce que el nucleótido XCG (en donde X es A, T, C, o G) es el codón menos preferido en dicotiledóneas mientras que el codón XTA se evita en las monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos AHAS optimizados de esta invención también tienen preferiblemente índices de evitación de doblete CG y TA que se aproximan cercanamente a aquellos de la planta anfitriona seleccionada (es decir, *Oryza sativa*). Más preferiblemente estos índices se desvían de aquel del anfitrión por no más de aproximadamente 10-15%.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos AHAS descritos anteriormente, se describen aquí moléculas de ácido nucleico aisladas que son anticodificantes. Se considera que los polinucleótidos anticodificantes inhiben la expresión de gen de un polinucleótido objetivo al unir específicamente el polinucleótido objetivo e interferir con la transcripción, empalme, transporte, traducción y/o estabilidad del polinucleótido objetivo. Los métodos se describen en la técnica anterior para objetivar el polinucleótido anticodificante al ADN cromosómico, en un transcripto de ARN primario o a un mRNA procesado. Preferiblemente, las regiones objetivo incluyen los sitios de empalme, codones de inicio de traducción, codones de terminación de traducción, y otras secuencias dentro de la estructura de lectura abierta.

El término "anticodificante," para los propósitos de la invención, se refiere a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es suficientemente complementario a todo o una porción de un gen, transcripto primario, o mRNA procesado, con el fin de interferir con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de pares base de acuerdo con las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Específicamente, las purinas serán par base con pirimidinas para formar una combinación del par guanina con el par de citosina (G:C) y adenina con timidina (A:T) en el caso del ADN, o par de adenina con uracilo (A:U) en el caso de ARN. Se entiende que los dos polinucleótidos pueden hibridar entre sí aún si ellos no son completamente complementarios entre, dado que cada uno tiene por lo menos una región que es sustancialmente complementaria a la otra. El término "ácido nucleico anticodificante" incluye ARN de hebra sencilla así como también casetes de expresión de ADN de hebra doble que se pueden transcribir para producir un ARN anticodificante. Los ácidos nucleicos anticodificantes "activos" son moléculas de ARN anticodificantes que son capaces de hibridar selectivamente con un transcripto primario o mRNA que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ 10 NO: 6, o SEQ ID NO: 12.

Además de los ácidos nucleicos AHAS y los polipéptidos descritos anteriormente, estos ácidos nucleicos y polipéptidos unidos a una unidad estructural se describen allí. Estas unidades estructurales incluyen, pero no se limitan a, unidades estructurales de detección, unidades estructurales de hibridación, unidades estructurales de purificación, unidades estructurales de suministro, unidades estructurales de reacción, unidades estructurales de unión, y similares. Un grupo típico de ácidos nucleicos tienen unidades estructurales de unidas a las sondas y cebadores. Las sondas y cebadores comprenden típicamente un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido comprende típicamente una región de la secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones exigentes a por lo menos aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 40, 50, o 75 nucleótidos consecutivos de una hebra codificante de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11, una secuencia anticodificante de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11, o los mutantes que ocurren en forma natural de los mismos. Los cebadores con base en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11 se pueden utilizar en reacciones PCR para clonar los homólogos AHAS. Las sondas con base en la secuencia de nucleótidos AHAS se pueden utilizar para detectar transcriptos o secuencias genómicas que las codifican o polipéptidos homólogos, en realizaciones preferidas, la sonda comprende adicionalmente un grupo marcado adherido a esta, por ejemplo el grupo marcado puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima. Tales sondas se pueden utilizar como una parte de un equipo de prueba de marcador genómico para identificar células que expresan un polipéptido AHAS, tal como al medir un nivel de un ácido nucleico que codifica AHAS, en una muestra de células, por ejemplo, detectar los niveles de mRNA AHAS o determinar si un gen AHAS genómico se ha mutado o eliminado.

Adicionalmente, un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico AHAS como se describió anteriormente, en donde la expresión del vector en una célula anfitriona resulta en tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de célula anfitriona se describe aquí. Como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido," que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar los segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar dentro del genoma vírico. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran dentro del genoma de una célula anfitriona luego de la introducción dentro de la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma anfitrión. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que ellos se ligan operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión." en general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar intercambiablemente cuando el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención está destinada a incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus, y adenovirus asociados), que sirven como funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante descritos allí comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas que se van a utilizar para expresión, que se liga operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Con respecto a un vector de expresión recombinante, "ligado operativamente" está destinado a significar que la secuencia de nucleótidos de interés se liga a las secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción *in vitro* o en una célula anfitriona cuando el vector se introduce dentro de la célula anfitriona). El término "secuencia reguladora" está destinada a incluir promotores, mejoradores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology*, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) y Gruber and Crosby, in: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Eds. Glick y Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, que incluyen las referencias allí. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células anfitrionas o bajo ciertas condiciones, se apreciará por aquellos expertos en la técnica el que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos aquí se pueden introducir dentro de las células anfitrionas para producir por lo tanto polipéptidos o péptidos, que incluyen los polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos como se describe aquí (por ejemplo, polipéptidos AHAS, polipéptidos de fusión, etc.).

Los polipéptidos AHAS se pueden expresar en plantas y células de plantas tales como células de plantas unicelulares (tales como algas) (Ver Faiciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251 y referencias allí) y células de planta de plantas mayores (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cultivo). Un polinucleótido AHAS se puede "introducir" dentro de una célula de planta por cualquier medio, que incluye transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo de partícula, agroinfección, biolísticos y similares.

Los métodos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas que incluyen células de plantas se pueden encontrar en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd 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, Ed: Garland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Como tolerancia aumentada a los herbicidas de imidazolinona es un rasgo general que se desea heredar en una amplia variedad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, mandioca, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas como papa, tabaco, berenjena, y tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, plantas arborícolas (café, cacao, té), especies de Salix, árboles (aceite de palma, de coco), hierbas perennes y cultivos forrajeros, estas plantas de cultivo también se prefieren plantas objetivo para una ingeniería genética. Los cultivos forrajeros incluyen, pero no se limitan a, Pasto de Trigo, Alpiste, Cebadilla Criolla, Césped de Centeno Silvestre, Poa, Pasto Ovilla, Alfalfa, Salfoin, Loto, Trébol Híbrido, Trébol Rojo, y Trébol de Olor.

La transfección de un polinucleótido AHAS dentro de una planta se puede lograr mediante la transferencia de gen mediado por *Agrobacterium*. Un método de transformación conocido por aquellos expertos en la técnica es la inmersión de una planta florecida dentro de una solución de *Agrobacteria*, en donde la *Agrobacteria* contiene el ácido nucleico AHAS, seguido por siembra de los gametos transformados. La transformación de la planta mediada por *Agrobacterium* se puede realizar utilizando, por ejemplo, la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz and Schell, 1988, *Mol.*

Gen. Genet. 204:383-398) o LBA4404 (Ctontech) *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación se puede realizar mediante transformación estándar y técnicas de regeneración (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res.13: 4777-4788; Galvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, - in Sect. Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. y Thompson, John E., Methods in Planet Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede ser transformador por medio de transformación de cotiledóneas o hipocotiledóneas. (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8: 238-242; Do Block et al., 1989, Plant Physiol. 91: 694-701). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y selección de plantas depende del vector binario y la cepa *Agrobacterium* utilizada para transformación. La selección de colza se realiza normalmente utilizando canamicina como marcador de planta seleccionable. Se puede realizar la transferencia del gen mediado por *Agrobacterium* al lino utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova et al., 1994, Plant cell Report 13:282-285. Adicionalmente, la transformación de la soja se puede realizar utilizando por ejemplo una técnica descrita en la Patente Europea No. 0424 047, Patente Estadounidense No. 5,322,783, Patente Europea No. 0397 687, Patente Estadounidense No. 5,378,543, o Patente Estadounidense Neo. 5,169,770. La transformación del maíz se puede lograr mediante bombardeo de partícula, retoma de AADN mediada por polietilenglicol o por medio de la técnica de fibra de carburo de sílice. (Ver, por ejemplo, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97828-7). Un ejemplo específico de la transformación de maíz se encuentra en la Patente Estadounidense No. 5,990,387, y un ejemplo específico de la transformación de trigo se puede encontrar en la Solicitud PCT No. WO 93/07258.

El polinucleótido AHAS introducido se puede mantener en la célula de planta establemente si se incorpora dentro de un replicón autónomo no cromosómico o se integra en los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido AHAS introducido puede estar presente en un vector no replicante extra-cromosómico y puede expresar transitoriamente o ser transitoriamente activo. Se puede crear un microorganismo recombinante homólogo en donde el polinucleótido AHAS se integra dentro de un cromosoma, se prepara un vector que contiene por lo menos una porción de un gen AHAS en el que se ha introducido una eliminación, adición o sustitución para alterar por lo tanto, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen AHAS endógeno y para crear un gen AHAS. Para crear una mutación puntual por medio de recombinación homóloga, se pueden utilizar híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss et al., 1899, Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 y Kmiec, 1999, Gene therapy American Scientist 87(3):240-247). Otros procedimientos de recombinación homólogos en las especies *Oryza* también se conocen bien en la técnica y se contemplan para uso aquí.

En el vector de recombinación homólogo, el gen AHAS se puede flanquear en sus extremos 5' y 3' mediante una molécula de ácido nucleico adicional del gen AHAS para permitir la recombinación homóloga que ocurre entre el gen AHAS exógeno llevado por vector y un gen AHAS endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula agregada nucleica AHAS flanqueada adicional es de longitud suficiente para recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, varios cientos de pares base hasta kilobases de ADN de flaqueo (ambos en los extremos 5' y 3') se incluyen en el vector (Ver, por ejemplo, Thomas, K. R., and Capeochi, M. R., 1987, Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homólogos o Strepp at al., 1998, PNAS, 95(8): 4368-4373 para recombinación con base en cADN en *Physcomitrella pstsns*). Sin embargo, debido a que el gen AHAS difiere normalmente del gen AHAS en muy pocos aminoácidos, una secuencia de flaqueo no siempre es necesaria. El vector de recombinación homólogo se introduce dentro de un microorganismo o célula de planta (por ejemplo, por medio de polietilenglicol mediado por ADN), y células en las que el gen AHAS introducido se ha recombinado homológamente con el gen AHAS endógeno se seleccionan utilizando técnicas conocidas en el arte.

Se pueden producir microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permite la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen AHAS en un vector puesto bajo el control del operón lac permite la expresión del gen AHAS solo en la presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en la técnica.

Si está presente en un vector de no replicación extra-cromosómico o un vector que se integra dentro de un cromosoma, el polinucleótido AHAS reside preferiblemente en un casete de expresión de planta. Un casete de expresión de planta contiene preferiblemente las secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de gen en células de plantas que se ligan operativamente ya que cada secuencia puede cumplir su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción mediante señales de poliadenilación. La señales de poliadenilación preferidas son aquellas originadas de t-ADN *Agrobacterium tumefaciens* tal como el gen 3 conocido como sintasa octopina del plásmido Ti pTIACH5 (Glenn et al., 1984, EMBO J. 3:835) o equivalentes funcionales de los mismos, pero también son adecuados todos los otros terminados funcionalmente activos en las plantas. Como expresión del gen de planta no se limita muy frecuentemente en niveles transcripcionales, un casete de expresión de planta contiene preferiblemente otras secuencias ligadas operativamente como mejoradores traduccionales tales como la secuencia saturada que contiene la secuencia líder no traducida 5 del virus de mosaico de tabaco que mejora el polipéptido por relación de ARN (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión de planta incluyen aquellos 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 transformación, Nucl. Add. Res. 12:8711-8721; and Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Vol.1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993. S. 15-38.

La expresión del gen de planta se debe ligar operativamente a un promotor apropiado que confiere expresión de gen en una forma preferida de tejido o preferida de tipo celular, oportuna. Los promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen cualquier promotor que es capaz de iniciar la transcripción en una célula de planta. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a aquellos que se pueden obtener de plantas, virus de planta y bacterias que contienen genes que se expresan en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizabulum*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, preferido de etapa de desarrollo, preferido de tipo celular, preferido de tejido o preferido de órgano. Los promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de 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 Sep1, el promotor de actina de arroz (McElroy et al., 1990. Célula de planta 2:163-171), el promotor de actina *Arabidopsis*, el promotor ubiquitina (Christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18:675-689); pEmu (Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81:581-588), el promotor 35S mosaico flgwoft, el promotor Smas (Velten et al., 1984, EMBO J. 3:2723-2730), el promotor GRP1-8, el promotor de deshidrogenasa de alcohol cinnamilo (Patente Estadounidense No. 5,683,439), promotores del T-ADN de *Agrobacterium*, tales como sintasa mannopina, sintasa nopalina, y sintasa octopina, la subunidad pequeña del promotor de carboxilasa debifosfato de ribulosa (ssu-RUBISCO), y similares.

Los promotores inducibles son activos bajo ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, y similares. Por ejemplo, el promotor hsp80 de *Brassica* se induce por choque con calor; el promotor PPDK se induce por Luz; el promotor PR-1 de tabaco, *Arabidopsis*, y maíz son inducibles mediante infección con un patógeno; y el promotor Adh1 se induce por hipoxia y tensión por frío. La expresión de gen de planta también se puede facilitar por medio de un promotor inducible (Para revisión, ver Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea la expresión del gen específico de tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible de ácido salicílico (Solicitud PCT No. 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 No. WO 93/21334).

Los promotores preferidos de la etapa de desarrollo se expresan preferiblemente en ciertas etapas de desarrollo. Los promotores preferidos de tejido y órgano incluyen aquellos que se expresan preferiblemente en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas, o xilema. Ejemplos de promotores preferidos de órgano y preferidos de tejido incluyen, pero no se limitan a promotores preferidos de frutos, preferidos de óvulo, preferidos de tejido macho, preferidos de semilla, preferidos de integumento, preferidos de tubérculo, preferidos de caña, preferidos de pericarpio, y preferidos de hoja, preferidos de estigma, preferidos de polen, preferidos de antera, preferidos de pétalo, preferidos de sépalo, preferidos de pedúnculo, preferidos de silicua, preferidos de tallo, preferidos de raíz y similares. Los promotores preferidos de semilla se expresan preferiblemente durante el desarrollo de semilla y/o germinación. Por ejemplo, los promotores preferidos de semilla pueden ser preferidos de embriones, preferidos de endospermo y preferidos de cubierta de semilla. Ver Thompson et al., 1989, BioEssays 10:108: Ejemplos de promotores preferidos de semilla incluyen, pero no se limitan a sintasa de celulosa (celA), Cim1, gama-zeína, globulina-1, maíz 19 kD zeína (cZ19B1) y similares.

Otros promotores preferidos de órgano o preferidos de tejido adecuados incluyen el promotor de gen napina de colza (Patente Estadounidense No. 5,608,152), el promotor USP de Vicia faba (Baeumlein et al., 1991, Mol Gen Genet 225(3):459-67), el promotor oleosina de *Arabidopsis* (Solicitud PCT No. WO 98/45461), el promotor plusolln de *Phaseolus vulgaris* (Patente Estadounidense No. 5,504,200), el promotor Bce4 de *Brassica* (Solicitud PCT No. WO 91/13980), o el promotor de legúmina B4 (Le84; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2):233-9), así como también promotores que confieren expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Los promotores adecuados para notar son el promotor de gen lpt2 o lpt1 de cebada (Solicitud PCT No. WO 95/15389 y Solicitud PCT No. WO 95/23230) o aquellos descritos en la Solicitud PCT No. WO 99/16890 (promotores de gen hordeína de cebada, gen de glutelina de arroz, gen orizina de arroz, gen prolamina de arroz, gen gliadina de trigo, gen glutelina de trigo, gen glutelina de avena, gen kaslrin de sorgo, y gen secalina de centeno).

Otros promotores útiles en los casetes de expresión descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, el promotor de proteína de unión a/b de clorofilo principal, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor β -conglicina, el promotor napina, el promotor de lectina de soja, el promotor de zeína 15kD de maíz, el promotor de zeína 22kD, el promotor de zeína 27kD, el promotor de g-zeína, los promotores cerosos, reducido 1, reducido 2, y bronce, el promotor Zm13 (Patente Estadounidense No. 5,088,169), los promotores poligalacturonasa de maíz (PG) (Patente Estadounidense Nos. 5,412,085 y 5,545,546), y el promotor SGB6 (Patente Estadounidense No. 5,470,359), así como también promotores sintéticos u otros promotores naturales.

La flexibilidad adicional en controlar la expresión de gen heteróloga en plantas se puede obtener al utilizar los dominios de unión de ADN y los elementos de respuesta de fuentes heterólogas (es decir, Dominios de unión a ADN de fuentes de no planta). Un ejemplo de tal dominio de unión de ADN heterólogo es el dominio de unión de ADN LexA (Brent and Ptashne, 1985, Cell 43:729-738).

5 Adicionalmente, se describen aquí las células anfitrionas en las que el vector de expresión recombinante aquí descrito se ha introducido. Los términos "célula anfitriona" y "célula anfitriona recombinante" se utilizan intercambiablemente aquí. Se entiende que tales términos no se refieren solo a la célula objeto particular pero también aplican a la progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones futuras debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluyen dentro del alcance del término como se utiliza aquí. Una célula anfitriona puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polinucleótido AHAS se puede expresar en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células fúngicas, o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster Chinos (CHO) o células COS), algas, ciliatos, callos de planta, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Otras células anfitrionas adecuadas se conocen por aquellos expertos en la técnica.

Una célula anfitriona como se describe aquí, tal como una célula anfitriona procariótica o eucariótica, se puede utilizar para producir (es decir, expresar) un polinucleótido AHAS. De acuerdo con lo anterior, se describen aquí los métodos para producir los polipéptidos AHAS utilizando las células anfitrionas descritas allí. El método puede comprender cultivar la célula anfitriona descrita aquí (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido AHAS, o dentro del que se ha introducido el genoma de un gen que codifica el polipéptido AHAS o tipo natural) en un medio adecuado hasta que se produce el polipéptido AHAS. El método puede comprender adicionalmente aislar los polipéptidos AHAS del medio o la célula anfitriona. Se describen aquí los polipéptidos AHAS aislados adicionales, y las porciones biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o porción biológicamente activa del mismo está libre de algún material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinantes, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido AHAS en el que se separa el polipéptido de algunos de los componentes celulares de las células en las que se produce de forma natural o recombinantemente. La frase "sustancialmente libre de material celular" puede incluir preparaciones de un polipéptido AHAS que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de material no AHAS (también denominado aquí como "polipéptidos contaminantes"). Más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de material no AHAS, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de material no AHAS, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de material no AHAS.

Cuando el polipéptido AHAS, o la porción biológicamente activa del mismo, se produce recombinantemente, también preferiblemente es sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 %, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de polipéptido. La frase "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos" incluye preparaciones del polipéptido AHAS en las que se separa el polipéptido de los precursores químicos u otros químicos que están involucrados en la síntesis del polipéptido, en una realización, la frase "sustancialmente libre de precursores químicos o otros químicos" incluye preparaciones de un polipéptido AHAS que tiene menos de aproximadamente 30 % (por peso seco) de precursores químicos o químicos no AHAS, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de precursores químicos o químicos no AHAS, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de precursores químicos o químicos no AHAS, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de precursores químicos o químicos no AHAS. En realizaciones preferidas, los polipéptidos aislados, o las porciones biológicamente activas de los mismos, carecen de polipéptidos contaminantes para el mismo organismo del que se deriva el polipéptido AHAS. Típicamente, tales polipéptidos se producen mediante expresión recombinante de, por ejemplo, un polipéptido AHAS de *Oryza sativa* en plantas diferentes a *Oryza sativa* o microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliatos, algas, u hongos.

El polinucleótido AHAS y las secuencias de polipéptido descritas aquí tienen una variedad de usos. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácido de la presente invención se pueden utilizar para transformar plantas, modulando por lo tanto la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona. De acuerdo con lo anterior, se describe aquí un método para producir una planta transgénica que tiene tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona comprende, (a) transformar una célula de planta con uno o más vectores de expresión que comprenden uno o más ácidos nucleicos AHAS variantes, y (b) generar a partir de la célula de planta una planta transgénica con una tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta. El ácido nucleico AHAS variante puede codificar un polipéptido AHAS variante que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se compara con un polipéptido AHAS tipo natural.

Adicionalmente, se describen aquí los métodos para modificar la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona que comprende modificar la expresión de uno o más ácidos nucleicos AHAS variantes. La tolerancia de la planta al herbicida imidazolinona se puede aumentar o reducir cuando se logre al aumentar o reducir la

expresión de un polinucleótido AHAS, respectivamente. Preferiblemente, la tolerancia de la planta al herbicida imidazolinona se aumenta al aumentar la expresión de un polinucleótido AHAS. El ácido nucleico AHAS variante puede codificar un polipéptido AHAS variante que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se compara con un polipéptido AHAS tipo natural. La expresión de un polinucleótido AHAS se puede modificar mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. Se pueden utilizar métodos para aumentar la expresión de los polinucleótidos AHAS cuando la planta es transgénica o no transgénica. En casos cuando la planta sea transgénica, la planta se puede transformar con un vector que contiene cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican AHAS descritos anteriormente, o la planta se puede transformar con un promotor que dirige la expresión de los polinucleótidos AHAS endógenos en la planta, por ejemplo. Tal promotor puede ser específico de tejido o regulado por desarrollo. Alternativamente, las plantas no transgénicas pueden tener expresión de polinucleótido AHAS endógeno modificado por inducir un promotor natural. La expresión de los polinucleótidos que comprenden una secuencia de polinucleótidos como se define en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11 en plantas objetivo se puede llevar a cabo por, pero no se limita a, uno de los siguientes ejemplos: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducido por químico, y (c) sobreexpresión del promotor construido por ingeniería con por ejemplo los factores de transcripción derivados de dedo de zinc (Greisman & Pabo, 1997, Science 275:657).

La transcripción del polinucleótido AHAS se puede modular utilizando factores de transcripción derivados de dedo de zinc (ZFP) como se describe en Greisman and Pabo, 1997, Science 275:657 y fabricado por Sangamo Biosciences, inc. Estos ZFP comprenden un dominio de reconocimiento de ADN y un dominio funcional que provoca la activación o represión de un ácido nucleico objetivo tal como un ácido nucleico AHAS. Por lo tanto, se pueden crear ZFP activantes y de represión que reconocen específicamente los promotores de polinucleótido AHAS descritos anteriormente y se utilizan para aumentar o reducir la expresión del polinucleótido AHAS en una planta, modulando por lo tanto la tolerancia al herbicida de la planta

Como se describió en más detalles adelante, las plantas producidas por los métodos descritos aquí pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas se pueden seleccionar de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, papa, tabaco, berenjena, tomate, especies Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies Salix, aceite de palma, coco, pastos perennes y cultivos forrajeros, por ejemplo. Los cultivos forrajeros incluyen, pero no se limitan a, Pasto de Trigo, Alpiste, Cebadilla Criolla, Césped de Centeno Silvestre, Poa, Pasto Ovillo, Alfalfa, Salfoin, Loto, Trébol Híbrido, Trébol Rojo, y Trébol de Olor. En cada uno de los métodos descritos anteriormente, la célula de planta incluye, pero no se limita a, un protoplasto, célula que produce gameto, y una célula que se regenera en una planta completa. Como se utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, callo de planta, callos, tejido de planta, o parte de planta, que contiene todo o parte de por lo menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante se integra establemente dentro de un cromosoma o elemento extra-cromosómico estable, ya que se pasa en generaciones sucesivas.

El cultivo de tejido de diversos de tejidos de arroz y la regeneración de plantas es bien conocida y se publica ampliamente. Por ejemplo, se puede hacer referencia a Chu, Q. R., et al., (1999) "Use of bridging parents with high anther culturability to improve plant regeneration and breeding value in rice", Rice Biotechnology Quarterly 38: 25-28; Chu, Q. R., et al., (1998), "A novel plant regeneration medium for rice anther culture of Southern U.S. crosses", Rice Biotechnology Quarterly 35:15-16; Chu, Q. R., et al., (1997), "A novel basal medium for embryogenic callus induction of Southern US crosses", Rice Biotechnology Quarterly 32:19-20; y Oono, K, "Broadening the Genetic Variability By Tissue Culture Methods", Jap. J. Breed. 33 (Suppl2), 306-307, illus. 1983, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Se describieron anteriormente composiciones y métodos para aumentar la tolerancia a la imidazolinona de una planta de arroz o semilla cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta o semilla. La tolerancia a la imidazolinona de una planta de arroz o semilla se puede aumentar de tal manera que la planta o semilla puede resistir la aplicación de un herbicida de imidazolinona de preferiblemente aproximadamente 10-400 g ai ha⁻¹, más preferiblemente 20-160 g ai ha⁻¹, y más preferiblemente, 40-80 g ai ha⁻¹. Como se utiliza aquí, "resistir" la aplicación de un herbicida de imidazolinona significa que la planta no se mata o ni se lesiona mediante tal aplicación.

Adicionalmente se proporciona aquí un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de arroz, en donde la planta de arroz ha aumentado la tolerancia el herbicida imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta de arroz y en donde la planta de arroz tolerante a la imidazolinona comprende por lo menos un ácido nucleico AHAS variante no recombinante. El ácido nucleico AHAS variante codifica un polipéptido AHAS variante que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se compara con un polipéptido AHAS tipo natural. La mutación está en el residuo de aminoácido que corresponde a la posición 96 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12. Al proporcionar plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a la imidazolinona, se pueden emplear una amplia variedad de formulaciones para proteger las plantas de arroz de las malezas, con el fin de mejorar el crecimiento de la planta y reducir la competencia para los nutrientes Un herbicida de imidazolinona se puede utilizar

5 en sí mismo para el control de malezas pro-emergencia, post-emergencia, preplantación, y en planificación en áreas que rodean las plantas de arroz descritas aquí o se puede utilizar una formulación del herbicida imidazalinona que contiene otros aditivos. También se puede utilizar el herbicida imidazolinona como un tratamiento de semilla. Los aditivos encontrados en una formulación de herbicida de Imidazolinona incluyen otros herbicidas, adyuvantes, agentes de rociado, agentes de pegajosidad, agentes estabilizantes, o similares. La formulación de herbicida imidazolinona puede ser una preparación húmeda o seca o y puede incluir, pero no se limita a, polvos que pueden fluir, concentrados emulsificables y concentrados líquidos. El herbicida imidazolinona y las formulaciones de herbicida se pueden aplicar de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, mediante rociado, irrigación, pulverización, o similares.

10 La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no se constituyen en ninguna forma como limitaciones impuestas luego del alcance de los mismos. Por el contrario, se entiende claramente que puede recurrirse a otras diversas realizaciones, modificaciones, y equivalentes de las mismas, que, después de leer la descripción allí, podrán sugerirse para aquellos expertos en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Mutagenia y Selección de estirpes de Arroz Tolerantes a la Imidazolinona

20 Se tratan dos muestras de semillas (600 g cada una) del cultivo de arroz IRGA 417 con una solución acuosa de azida de sodio 0.001 M a pH 3 (regulador de fosfato 0.067 M) para producir la semilla M1. Este tratamiento se aplica al remojar cada muestra de semilla en un Erlenmeyer de dos litros que contiene un litro de solución de azida de sodio, bajo agitación constante, durante 18 horas, a temperatura ambiente. Después de tratamiento, las semillas se enjuagan en agua potable y, luego, las semillas se secan al aire parcialmente sobre láminas de papel de transferencia con el fin de extraer la humedad de la superficie de las semillas. Después de esto, las semillas tratadas se siembran directamente en el vivero.

25 Las semillas M1 se plantan en el vivero con un plantador de semilla experimental Wintersteiger en un índice de 50 plantas por metro cuadrado. Las estirpes revisadas de una variedad tipo natural IRGA 417 se plantan con un plantador de tipo de empuje. Las estirpes se cultivan bajo condiciones de inundación hasta madurez (26 % de humedad de grano) y se cosechan a granel. La semilla recolectada (M2) se seca en un secador convectivo durante 14 horas a 45° C. Las semillas M2 se mantienen en almacenamiento cerrado hasta la siguiente estación.

30 La semilla de las plantas M1 (semilla M2) se planta con un plantador de semilla experimental para grandes áreas (AVEC) en un índice de 50 kg/ha. Un estimado de 3 ha que se ha establecido finalmente comprende una población de 6×10^6 plantas. Las estirpes revisadas de una variedad tipo natural IRGA 417 se plantan con un plantador de tipo de empuje. El área completa se somete a una presión de selección con una mezcla de dos herbicidas Imidazolinona. Se realizan tres aplicaciones separadas de los herbicidas imidazolinona con un rociador comercial en diferentes direcciones para evitar cualquier escape y resultar en un tratamiento 3X. Un volumen total de 222 l/ha se rocía a 50

35 psi, con boquillas Teejets 8002, en cada aplicación de herbicidas imidazolinona.

El índice del tratamiento 1X es una mezcla de Arsenal (imazapir 75 g a.i./ha) y Cadre (imazapic 24.85 g a.i./ha) en una solución de agua con un tensoactivo no iónico (Citowet) en un índice de 0.25% (v/v). Las aplicaciones se realizan en la cuarta etapa de hoja de las plantas de arroz. No se registra lluvia durante los 7 días después de los

40 tratamientos.

Se hacen observaciones en momentos regulares para supervisar el área completa. Después de 90 días, los individuos que sobreviven se marcan y se trasplantan al invernadero para multiplicación asexual y producción de semilla aumentada. Se cultivan un total de 10 plantas individuales, y la semilla se cosecha y se seca en un incubador de semilla durante 7 días a 50 °C. No sobreviven plantas de las estirpes revisadas después de tratamiento

45 con herbicida.

La semilla de las plantas M2 seleccionadas se plantan en recipientes individuales bajo condiciones de invernadero. Se aplica un tratamiento 2X con un Rociador portátil R&D, dividido en dos aplicaciones de un índice 1X de Arsenal (Imazapir 75 g a.i./ha) y Cadre (Imazapic 24.85 g a.i./ha) en una solución de agua con un tensoactivo no iónico (Citowet) en el índice de 0.25 % (v/v). Las plantas se cultivan hasta madurez (26 % de humedad de grano) y se cosecha manualmente. La semilla recolectada se somete a un tratamiento de reposo ruptura de 7 días a 50° C y se prepara para una plantación de estación tardía en la región norte.

50

La semilla de las poblaciones de tres plantas tolerantes seleccionadas que crecen en invernadero se planta en el campo en Las Palmas Chaco para aumentar la semilla. Las tres poblaciones identificadas como tolerantes a los herbicidas de imidazolinona se nombran IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5. Estas se plantan con una planta de arroz comercial en el índice de 50 kg/ha. Se aplica un tratamiento de 2X herbicidas de imidazolinona, Arsenal (Imazapir 75 g a.i./ha) y Cadre (Imazapic 24 g a.i./ha) en una solución de agua con un tensoactivo no iónico (Citowet) en el índice de 0.2 5% (v/v) se aplica de cuatro a cinco etapas de hoja de las plantas de arroz. No se observan síntomas fitotóxicos en ninguna de las tres poblaciones. Las tres poblaciones produjeron la parcela tratada con un herbicida para pasto regular. No se observan segregantes y se produce una población altamente homogénea en rasgos tolerantes y agronómicos.

10 Ejemplo 2

Caracterización Molecular de IMINTA 1, IMINTA 4, e IMINTA 5

Se extrae ADN genómico de hojas de plántulas que crecen en invernadero de estirpes de arroz tipo natural y IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 variante y el gen AHAS se amplifica mediante PCR. El producto PCR se secuencía utilizando protocolos estándar. El análisis de secuencia revela un cambio de par base único en la región codificante del gen AHAS que provoca un cambio de aminoácido de Alanina al aminoácido 96 en la estirpe tipo natural a Treonina 96 en las estirpes mutantes. Esta mutación corresponde a un cambio de aminoácido en Alanina 122 en la secuencia de Arabidopsis AHAS a Treonina 122. La secuencia de nucleótidos AHAS para IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 se muestran en las figuras 1A, C, y E, respectivamente como las SEQ ID NOs: 1, 3, y 5; y las secuencias de aminoácido AHAS deducidas de IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 se muestran en las figuras 1B, D, y F como las SEQ ID NOs: 2, 4, y 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácido deducidas y de nucleótido de AHAS de la cepa de arroz tipo natural IRGA 417 se muestran en las figuras 1G y H, respectivamente, como las SEQ ID NOs: 7 y 8. Las alineaciones de las secuencias de aminoácido y nucleótido AHAS para IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 se muestran en las figuras 2 y las figuras 3, respectivamente. La secuencia consensus de gen de arroz AHAS se muestra como la SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia consensus AHAS de arroz se muestra como la SEQ ID NO: 10. El polimorfismo que confiere la tolerancia a la imidazolinona a las estirpes IMINTA 1, 4, y 5 se indica en negrilla.

Un ejemplo de un cADN de longitud completa de un ácido nucleico AHAS que codifica un polipéptido que confiere tolerancia a los herbicidas de imidazolinona se muestra como la SEQ ID NO: 11, y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el gen AHAS se muestra como la SEQ ID NO: 12 en la figura 4.

30 Ejemplo 3

Tolerancia a los Herbicidas AHAS Proporcionados por IMINTA 1

Se realiza un ensayo de campo con la estirpe mutante IMINTA 1 e IRGA 417, que compara el desempeño en la presencia y ausencia de tratamiento de imidazolinona. El tratamiento de imidazolinona 1 X consiste de Arsenal (Imazapir 75 g a.i./ha) y Cadre (Imazapic 24,85 g a.i./ha) en una solución de agua con un tensoactivo no iónico (Citowet) en el índice de 0.25 %. Las variedades y tratamientos se establecen como se indica en la figura 5 como un diseño de bloque aleatorio con tres replicaciones.

Los resultados del tratamiento se establecen en figura 6. No existe diferencia estadística entre los tratamiento en el número de plantas/m², así que muestra que la aplicación de herbicida 3X no tiene efecto perjudicial. Las estirpes de revisión susceptibles se siembran a lo largo de las parcelas que no sobreviven a tratamiento herbicida. El mayor valor en las parcelas IMINTA 3X después de tratamiento puede ser debido al ahijamiento.

La producción de grano y los componentes de producción se evalúan para entender el efecto del tratamiento en las diferentes etapas fisiológicas, y se muestran en las figuras 7 y 8, respectivamente. No se encuentran diferencias estadísticas entre los tratamiento, aunque los valores absolutos muestran un mejor desempeño del IMINTA 1 3X. El análisis de los componentes de producción muestra un número mayor de panículas por metro cuadrado y espiguillas/panícula en las parcelas IMINTA 1 3X que han determinado una producción mayor que los otros tratamientos. Adicionalmente, se observa un porcentaje de blanqueo fuerte debido a las bajas temperaturas antes y durante florecimiento. Los días y las noches frías reducen la producción de la semilla y son la razón para las producciones promedio bajas.

Aunque no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, existe un valor de producción de grano mayor de IMINTA 1 3X. Como se mencionó, se encuentran más panículas y espiguillas/ panícula en estas parcelas. Observaciones en otras estirpes tolerantes bajo tratamientos de aplicación mayores muestran mayor ahijamiento y el número de espiguillas/ panícula sugiere un efecto posible de los herbicidas en el proceso de diferenciación de tallos y flores.

Las variedades IMINTA 4 y IMINTA 5 también se prueban en el campo en la misma forma como la variedad IMINTA 1. La producción de grano y los componentes de producción se encuentra que son comparables con la variedad IMINTA 1.

- 5 Debido a que la tolerancia en IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 se debe a una mutación en la enzima AHAS que la hace tolerante a la inhibición mediante los herbicidas de imidazolinona, la actividad in vitro del AHAS extraído de plantas tipo natural (no tienen la mutación para tolerancia) se compara con la actividad in vitro de AHAS extraído de plantas tolerantes en la presencia de diversas concentraciones de un herbicida de imidazolinona.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de arroz que comprende un ácido nucleico AHAS de variante no recombinante, en donde el ácido nucleico AHAS variante confiere a la planta tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta, en donde la planta de arroz es un derivado o progenie de la planta de arroz con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208, en donde la planta de arroz con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208 comprende el ácido nucleico AHAS variante, y en donde el ácido nucleico AHAS variante comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:
- (a) un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5;
- (b) un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 11;
- (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6;
- (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12; y
- (e) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de a) a d) anterior.
2. La planta de arroz de la reivindicación 1, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de
- (a) una planta que es un derivado construido genéticamente por ingeniería, recombinante o mutante de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCRVIB 41208;
- (b) cualquier progenie de la planta del Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; o
- (c) una planta que es una progenie de cualquiera de las plantas de (a) a (b).
3. La planta de arroz de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico AHAS variante comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en la SEQ ID NO: 1.
4. La planta de arroz de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico AHAS variante comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en la SEQ ID NO: 3.
5. La planta de arroz de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico AHAS variante comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en la SEQ ID NO: 5.
6. La planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el herbicida imidazolinona se selecciona del grupo que consiste de 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-quinolinacarboxílico, 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 metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato.
7. La planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el herbicida imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico.
8. La planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el herbicida imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.
9. Una parte de planta de la planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la parte de planta comprende el ácido nucleico AHAS variante.
10. Una célula de planta de la planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula de planta comprende el ácido nucleico AHAS variante.
11. Una semilla producida por la planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la semilla comprende el ácido nucleico AHAS variante.

12. La semilla de la reivindicación 11, en donde la semilla es genéticamente pura para una tolerancia aumentada a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la semilla de la planta de arroz.

13. Un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y la planta, en donde la planta comprende un ácido nucleico AHAS de variante no recombinante que confiere tolerancia aumentada de la planta al herbicida imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta, en donde la planta de arroz tiene el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208 o es un derivado o progenie del mismo, en donde la planta de arroz con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208 comprende el ácido nucleico AHAS variante, y en donde el ácido nucleico AHAS variante comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

(a) un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 5;

(b) un polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 11;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 6;

(d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12; y

(e) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de a) a d) anterior.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de:

(a) una planta que tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208;

(b) una planta que es un derivado construido genéticamente por ingeniería, recombinante o mutante de la planta con el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208;

(c) cualquier progenie de la planta del Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; o

(d) una planta que es una progenie de cualquiera de las plantas de las plantas de (a) a (c).

15. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde el herbicida imidazolinona se selecciona del grupo que consiste de 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-quinolinacarboxílico, 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 metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato.

16. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde el herbicida imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico.

17. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde el herbicida imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

FIGURA 1A

Secuencia de nucleótido AHAS parcial de la estirpe de arroz IMINTA 1 (SEQ ID NO: 1)

CCTTGTCCGCCGCCGCGAC

GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC
GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC
ACCCCGCGTCCCCGGCGCGCCGGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCA
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
GCGTCCGGGTCTGCGTCCGACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG
TCCGCGCTCGCCGACGCGTCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC
GGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCCTT
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTCCTCGCGTC
CTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGCTGGTTCGACATCCCAAGGACATCCAGC
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC
ATPGCACGCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT
GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCT
GCTCTGCATCTGGTGATGAATPGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC
CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTATGATCC
GTGTGCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATG
CGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGCGTTGATGAT
CGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
ACAATATTACACCTACAAGCGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCTCAT
GAACATTCAGGAGTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCCTCCCGTGAAGG
TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
AGGTTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
TTCTGCGAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCACA
CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGGCGCATCAAGGACA
TGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
TTGGCAAAGCACCAGCCCGC

Figura 1B

Secuencia de aminoácidos AHAS parcial deducida de la estirpe de arroz IMINTA 1 (SEQ ID NO: 2)

LSAAATAKTGRKKNHQRHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV
 TPPSPAPPATPLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPPGTSMEI
 HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV
 SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV
 DVEDI PRVIQEAFFLASSGRPGPVLDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY
 IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI
 PVTFTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFD
 RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL
 DQSTTKTS SDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK
 GEAI IATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSAGLGAMGFGLPAAAGASVA
 NPGVTVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED
 RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRRAIK
 KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMI PSGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 1C

Secuencia de nucleótido AHAS parcial de la estirpe de arroz IMINTA 4 (SEQ ID NO: 3)

CCTTGTCGCGCCGCGCA

GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTC TTCCCGCTC
GAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC
ACCCGCGGTCCCGGCGCCGCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACC AACACCTCTTCCGCCA
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
GCGTCGGGGTCTGCGTCCGACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG
TCCGCGCTCGCCGACGCGTCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC
GGCCAGGTCCCCGCGCATGATCGGCACCGACGCC TCCAGGAGACGC
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACC AAGACAATTACCTTGTCTT
GATGTGGAGGACATCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC
CTCGGGCCGTCCTGGCCCGTGTGGTTCGACATCCCAAGGACATCCAGC
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGTAC
ATTGCACGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT
GCGTCTGGTTGGCGAGTACGGCGCCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCT
GCTCTGCATCTGGTGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC
CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCGATGATGATCC
GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATG
CGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTCCGGTTGATGAT
CGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACAGATGTGGGCGGC
ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTGTGGCT
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
TGATGGTGTGAAACAACAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
AGGTTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
TTCTTGCAGTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCACACA
CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACA
TGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
TTGGCA

Figura 1D

Secuencia de aminoácidos AHAS parcial deducida de la estirpe de arroz IMINTA 4 (SEQ ID NO: 4)

**LSAAATAKTGRKNHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV
TPPSPAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGTSMEI
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV
SALADALDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY
IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI
PVT'TTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL
DQSTTKTS SDFSAWHNELDQOKREFPLGYKTFGEEIPQYAIQVLDELTK
GEAIIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSAGLGAMGFGLPAAAGASVA
NPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY**

Figura 1E

Secuencia de nucleótido AHAS parcial de la estirpe de arroz IMINTA 5 (SEQ ID NO: 5)

GCGGCCGCGGCQGCCACCTTGTCCGCCGCGGAC
GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCFTTCCCGCTC
GAGGCCGGGTGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC
ACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCA
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
GCGTCGGGCTTCGCGTCCACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC
GGGCCAGTCCCCCGCCATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC
CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCTT
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC
CTCGGGCCGTCTGGCCCCGTGCTGGTCGACATCCCAAGGACATCCAGC
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC
ATTGCACGCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAAATTGCTTGAGCAGGTCTT
GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTGCGGTGGTGGCT
GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC
CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC
GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATG
CGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGGTTTGTATGAT
CGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGC AAGCAGGCCAAGATTGTGCA
CATTGACATGTATCCAGCGGAGATTGGAAAGACAAGCAACCACATGTGT
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGC TTTACAGGCTTGAATGCTCTGCTA
GACCAGACACAACAAGACAAGTTCTGATTTTGTGCGTGGCACAATGA
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA
GGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCC TGTGCAGCTGGTGTCTTGTGGCT
AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCTCAT
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTTGAGAACCCTCCCGTGAAGG
TGATGGTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
AGGTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTCAATA
TTCTTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
AAGATGCTCGATACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCACCA
CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGCGCATTC AAGGACA
TGATCCTGGATGGTGTATGGCAGGACTGTGTA

Figura 1F

Secuencia de aminoácidos AHAS parcial deducida de la estirpe de arroz IMINTA 5 (SEQ ID NO: 6)

AAAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHVF PARGRVGAAAVRCSAVSPV
TPPSPAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGTSMEI
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV
SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY
IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI
PVT'TTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVCLALQGLNALL
DQSTTKTSSDFSAAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK
GEAIATGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGASVA
NPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTV

Figura 1G

Secuencia de nucleótido AHAS de la estirpe de arroz I47 tipo natural (SEQ ID NO: 7)

ATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCGCCACCTTGTCCGCGCCGCGGAC
 GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC
 GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGCGTTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGT
 ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCGCCCGCCACGCCGCTCCGGCGGTGGGGGCGC
 GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT
 GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATC
 CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCACCACCTCTCCGCCA
 CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
 GCGTCGGGGTCTGCGTCCGCACTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG
 TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC
 GGGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC
 CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAGCACAATTACCTGTCCCTT
 GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTC
 CTCGGGCGCTCCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC
 AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC
 ATTGCACGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAAATTGCTTGAGCAGGTCTT
 GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCCGTTGGTGGCT
 GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGTTTGTGAGCTGACCGGCATC
 CCAGTTACAACCACCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC
 GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG
 CGGTGGATAAAGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGGTTTGTATGAT
 CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA
 CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT
 CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA
 GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTGTAGTGGCACAATGA
 GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG
 AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA
 GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTGTGGCT
 AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 TGATGGTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 AGGTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTTGGGCAACCCAGAATG
 TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 TTCTTGCAGTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCACA
 CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
 TGATCCTGGATGGTGTGTCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
 TTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGA

Figura 1H

Secuencia de aminoácidos AHAS deducida de la estirpe de arroz I47 tipo natural (SEQ ID NO: 8)

MATTAATAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV
TPPSPAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEI
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV
SALADALDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY
IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI
PVTTLMLGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDD
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL
DQSTTKTSSDFSAWHNELDQOKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK
GEAIIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGASVA
NPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMI P SGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 2

Alineación de las secuencias de nucleótido de IMINTA 1, IMINTA 4, e IMINTA 5 con secuencias AHAS de arroz tipo natural

1	50
I1_arroz	(1) -----CCTTGTCGGCCGCCGCGAC
I4_arroz	(1) -----CCTTGTCGGCCGCCGCGAC
I5_arroz	(1) -----GCGGCCGCGGCCGCCACCTTGTCGGCCGCCGCGAC
wt_I47	(1) ATGGCTACGACCCGCCGCGGCCGCCGCCACCTTGTCGGCCGCCGCGAC
Consensus	(1) GCGGCCGCGGCCGCCACCTTGTCGGCCGCCGCGAC
	51 100
I1_arroz	(20) GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
I4_arroz	(20) GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
I5_arroz	(36) GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
wt_I47	(51) GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
Consensus	(51) GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
	101 150
I1_arroz	(70) GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCCGCTGCCCGGTC
I4_arroz	(70) GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCCGCTGCCCGGTC
I5_arroz	(86) GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCCGCTGCCCGGTC
wt_I47	(101) GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCCGCTGCCCGGTC
Consensus	(101) GAGGCCGGGTGGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCCGCTGCCCGGTC
	151 200
I1_arroz	(120) ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
I4_arroz	(120) ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
I5_arroz	(136) ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
wt_I47	(151) ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
Consensus	(151) ACCCCGCGCTCCCCGGCGCCCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
	201 250
I1_arroz	(170) GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGT
I4_arroz	(170) GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGT
I5_arroz	(186) GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGT
wt_I47	(201) GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGT
Consensus	(201) GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGT
	251 300
I1_arroz	(220) GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
I4_arroz	(220) GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
I5_arroz	(236) GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
wt_I47	(251) GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
Consensus	(251) GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
	301 350
I1_arroz	(270) CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
I4_arroz	(270) CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
I5_arroz	(286) CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
wt_I47	(301) CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
Consensus	(301) CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
	351 400
I1_arroz	(320) CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
I4_arroz	(320) CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
I5_arroz	(336) CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
wt_I47	(351) CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
Consensus	(351) CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
	401 450
I1_arroz	(370) GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG
I4_arroz	(370) GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG

I5_arroz	(386)	GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
wt_I47	(401)	GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
Consensus	(401)	GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	500
		451	
I1_arroz	(420)	TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTCGCCATCAC	
I4_arroz	(420)	TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTCGCCATCAC	
I5_arroz	(436)	TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTCGCCATCAC	
wt_I47	(451)	TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTCGCCATCAC	
Consensus	(451)	TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTCGCCATCAC	550
		501	
I1_arroz	(470)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGC	
I4_arroz	(470)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGC	
I5_arroz	(486)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGC	
wt_I47	(501)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGC	
Consensus	(501)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCCTTCCAGGAGACGC	600
		551	
I1_arroz	(520)	CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCCTT	
I4_arroz	(520)	CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCCTT	
I5_arroz	(536)	CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCCTT	
wt_I47	(551)	CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCCTT	
Consensus	(551)	CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCCTT	650
		601	
I1_arroz	(570)	GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC	
I4_arroz	(570)	GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC	
I5_arroz	(586)	GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC	
wt_I47	(601)	GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC	
Consensus	(601)	GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC	700
		651	
I1_arroz	(620)	CTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
I4_arroz	(620)	CTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
I5_arroz	(636)	CTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
wt_I47	(651)	CTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
Consensus	(651)	CTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	750
		701	
I1_arroz	(670)	AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC	
I4_arroz	(670)	AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC	
I5_arroz	(686)	AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC	
wt_I47	(701)	AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC	
Consensus	(701)	AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC	800
		751	
I1_arroz	(720)	ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT	
I4_arroz	(720)	ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT	
I5_arroz	(736)	ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT	
wt_I47	(751)	ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT	
Consensus	(751)	ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT	850
		801	
I1_arroz	(770)	GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTTCGGTGGTGGCT	
I4_arroz	(770)	GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTTCGGTGGTGGCT	
I5_arroz	(786)	GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTTCGGTGGTGGCT	
wt_I47	(801)	GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTTCGGTGGTGGCT	
Consensus	(801)	GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCCTATGTTCGGTGGTGGCT	900
		851	
I1_arroz	(820)	GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCCGCCGTTTGTGTGAGCTGACCCGGCATC	
I4_arroz	(820)	GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCCGCCGTTTGTGTGAGCTGACCCGGCATC	
I5_arroz	(836)	GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCCGCCGTTTGTGTGAGCTGACCCGGCATC	
wt_I47	(851)	GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCCGCCGTTTGTGTGAGCTGACCCGGCATC	

Consensus	(851)	GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGTGAGCTGACCGGCATC	950
		901	950
I1_arroz	(870)	CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	
I4_arroz	(870)	CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	
I5_arroz	(886)	CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	
wt_I47	(901)	CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	
Consensus	(901)	CCAGTTACAACCCTCTGATGGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	
		951	1000
I1_arroz	(920)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG	
I4_arroz	(920)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG	
I5_arroz	(936)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG	
wt_I47	(951)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG	
Consensus	(951)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG	
		1001	1050
I1_arroz	(970)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGATGAT	
I4_arroz	(970)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGATGAT	
I5_arroz	(986)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGATGAT	
wt_I47	(1001)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGATGAT	
Consensus	(1001)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGATGAT	
		1051	1100
I1_arroz	(1020)	CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA	
I4_arroz	(1020)	CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA	
I5_arroz	(1036)	CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA	
wt_I47	(1051)	CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA	
Consensus	(1051)	CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA	
		1101	1150
I1_arroz	(1070)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT	
I4_arroz	(1070)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT	
I5_arroz	(1086)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT	
wt_I47	(1101)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT	
Consensus	(1101)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT	
		1151	1200
I1_arroz	(1120)	CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	
I4_arroz	(1120)	CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	
I5_arroz	(1136)	CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	
wt_I47	(1151)	CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	
Consensus	(1151)	CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	
		1201	1250
I1_arroz	(1170)	GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA	
I4_arroz	(1170)	GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA	
I5_arroz	(1186)	GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA	
wt_I47	(1201)	GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA	
Consensus	(1201)	GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA	
		1251	1300
I1_arroz	(1220)	GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG	
I4_arroz	(1220)	GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG	
I5_arroz	(1236)	GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG	
wt_I47	(1251)	GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG	
Consensus	(1251)	GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG	
		1301	1350
I1_arroz	(1270)	AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	
I4_arroz	(1270)	AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	
I5_arroz	(1286)	AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	
wt_I47	(1301)	AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	
Consensus	(1301)	AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	
		1351	1400

I1_arroz (1320) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 I4_arroz (1320) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 I5_arroz (1336) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 wt_I47 (1351) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 Consensus (1351) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
 1401 1450
 I1_arroz (1370) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 I4_arroz (1370) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 I5_arroz (1386) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 wt_I47 (1401) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 Consensus (1401) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
 1451 1500
 I1_arroz (1420) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
 I4_arroz (1420) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
 I5_arroz (1436) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
 wt_I47 (1451) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
 Consensus (1451) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCT
 1501 1550
 I1_arroz (1470) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 I4_arroz (1470) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 I5_arroz (1486) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 wt_I47 (1501) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 Consensus (1501) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT
 1551 1600
 I1_arroz (1520) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 I4_arroz (1520) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 I5_arroz (1536) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 wt_I47 (1551) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 Consensus (1551) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
 1601 1650
 I1_arroz (1570) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 I4_arroz (1570) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 I5_arroz (1586) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 wt_I47 (1601) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 Consensus (1601) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
 1651 1700
 I1_arroz (1620) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
 I4_arroz (1620) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
 I5_arroz (1636) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
 wt_I47 (1651) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
 Consensus (1651) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
 1701 1750
 I1_arroz (1670) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 I4_arroz (1670) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 I5_arroz (1686) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 wt_I47 (1701) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 Consensus (1701) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
 1751 1800
 I1_arroz (1720) TTCTGTCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 I4_arroz (1720) TTCTGTCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 I5_arroz (1736) TTCTGTCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 wt_I47 (1751) TTCTGTCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 Consensus (1751) TTCTGTCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
 1801 1850
 I1_arroz (1770) AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA
 I4_arroz (1770) AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA

ES 2 379 553 T3

```

I5_arroz (1786) AAGATGCTCGATACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA
wt_I47 (1801) AAGATGCTCGATACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA
Consensus (1801) AAGATGCTCGATACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA
1851 1900

I1_arroz (1820) CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
I4_arroz (1820) CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
I5_arroz (1836) CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
wt_I47 (1851) CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
Consensus (1851) CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA
1901 1950

I1_arroz (1870) TGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
I4_arroz (1870) TGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
I5_arroz (1886) TGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTA-----
wt_I47 (1901) TGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
Consensus (1901) TGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
1951 1986

I1_arroz (1920) TTGGCAAAGCACCAGCCCGGC-----
I4_arroz (1920) TTGGCA-----
I5_arroz (1917) -----
wt_I47 (1951) TTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGA
Consensus (1951) TTGGCAAAGCACCAGCCCGGC

```

Figura 3

Alineación de las secuencias de aminoácido de IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 con las secuencias AHAS de arroz tipo natural

		1	-----LSAAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	50
I1_arroz	(1)		-----LSAAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
I4_arroz	(1)		-----LSAAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
I5_arroz	(1)		-----AAAAATLSAAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
arroz_wt_I47	(1)		MATTAATAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
Consensus	(1)		AAAAATLSAAATAKTGRKQHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
		51		100
I1_arroz	(40)		TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVDVFAYPGGTSMSEI	
I4_arroz	(40)		TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVDVFAYPGGTSMSEI	
I5_arroz	(46)		TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVDVFAYPGGTSMSEI	
arroz_wt_I47	(51)		TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVDVFAYPGGTSMSEI	
Consensus	(51)		TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVDVFAYPGGTSMSEI	
		101		150
I1_arroz	(90)		HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
I4_arroz	(90)		HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
I5_arroz	(96)		HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
arroz_wt_I47	(101)		HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
Consensus	(101)		HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
		151		200
I1_arroz	(140)		SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV	
I4_arroz	(140)		SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV	
I5_arroz	(146)		SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV	
arroz_wt_I47	(151)		SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV	
Consensus	(151)		SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV	
		201		250
I1_arroz	(190)		DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
I4_arroz	(190)		DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
I5_arroz	(196)		DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
arroz_wt_I47	(201)		DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
Consensus	(201)		DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
		251		300
I1_arroz	(240)		IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI	
I4_arroz	(240)		IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI	
I5_arroz	(246)		IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI	
arroz_wt_I47	(251)		IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI	
Consensus	(251)		IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI	
		301		350
I1_arroz	(290)		PVTTTLMGLGNFSDDDLRLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
I4_arroz	(290)		PVTTTLMGLGNFSDDDLRLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
I5_arroz	(296)		PVTTTLMGLGNFSDDDLRLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
arroz_wt_I47	(301)		PVTTTLMGLGNFSDDDLRLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
Consensus	(301)		PVTTTLMGLGNFSDDDLRLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
		351		400
I1_arroz	(340)		RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
I4_arroz	(340)		RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
I5_arroz	(346)		RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
arroz_wt_I47	(351)		RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
Consensus	(351)		RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
		401		450
I1_arroz	(390)		DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPQYAIQVLDLTK	
I4_arroz	(390)		DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPQYAIQVLDLTK	

```

I5_arroz (396) DQSTTKTSSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPPYAIQVLDLTK
arroz_wt_I47 (401) DQSTTKTSSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPPYAIQVLDLTK
Consensus (401) DQSTTKTSSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPPYAIQVLDLTK
451 500

I1_arroz (440) GEAI IATGVGQHQMWAQQYYTYKRPRQWLS SAGLGAMGFGLPAAAGASVA
I4_arroz (440) GEAI IATGVGQHQMWAQQYYTYKRPRQWLS SAGLGAMGFGLPAAAGASVA
I5_arroz (446) GEAI IATGVGQHQMWAQQYYTYKRPRQWLS SAGLGAMGFGLPAAAGASVA
arroz_wt_I47 (451) GEAI IATGVGQHQMWAQQYYTYKRPRQWLS SAGLGAMGFGLPAAAGASVA
Consensus (451) GEAI IATGVGQHQMWAQQYYTYKRPRQWLS SAGLGAMGFGLPAAAGASVA
501 550

I1_arroz (490) NPGVTVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVVQWED
I4_arroz (490) NPGVTVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVVQWED
I5_arroz (496) NPGVTVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVVQWED
arroz_wt_I47 (501) NPGVTVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVVQWED
Consensus (501) NPGVTVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVVQWED
551 600

I1_arroz (540) RFYKANRAHTYLG NPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK
I4_arroz (540) RFYKANRAHTYLG NPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK
I5_arroz (546) RFYKANRAHTYLG NPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK
arroz_wt_I47 (551) RFYKANRAHTYLG NPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK
Consensus (551) RFYKANRAHTYLG NPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK
601 644

I1_arroz (590) KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMI PSGGAFKDMILDGDGRIVY
I4_arroz (590) KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMI PSGGAFKDMILDGDGRIVY
I5_arroz (596) KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMI PSGGAFKDMILDGDGRIVY-
arroz_wt_I47 (601) KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMI PSGGAFKDMILDGDGRIVY
Consensus (601) KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMI PSGGAFKDMILDGDGRIVY

```

Figura 4A

Secuencia de nucleótido AHAS de longitud completa confieren resistencia a los herbicidas de imidazolinona (SEQ ID NO: 11)

ATGGCTACGACCGCCGCGCGCCGCGCCACC'TTGTCCGCGCCGCGAC
GGCCAAGACCGGCGGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC
GAGGCCGGGTGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC
ACCCCGCGTCCCGCGCGCCGCGCCACGCGCTCCGGCGGTGGGGGCC
GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGTGGAGCGGT
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACC AACACCTCTTCCGCCA
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCGCCATCAC
GGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACC AAGCACAATTACCTTGTCCCTT
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTC
CTCGGGCGTCTCGGCCGCTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC
ATTGCACGCC'TGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT
GCGTCTGGT'TGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCT
GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGT'TGAGCTGACCGGCATC
CCAGTTACAACCACTCTGATGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC
GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTA TG
CGGTGGATAAAGCTGACCTGTGTCTTGCATTTGGCGTGGGTTTGTATGAT
CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTT'AGTGCCTGGCACAATGA
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCC'TC'TGGGGTACAAGACTTTTGGTG
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGT'TGGACAGCACCAGATGTGGGCGC
ACAATA'TTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGCT'TCGGCTGGTC
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTGTGGCT
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCATCAT
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACC'TCCCGTGAAGG
TGATGGTGT'TGAACAACCAACATTTGGGTATGGTGTGCAATGGGAGGAT
AGGTTT'TACAAGGCAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA
TTCTGCACTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
AAGATGCTCGATACCCCGGCCATAC'TGTTGGATATCATCGTCCACA
CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGGCGCATCAAGGACA
TGATCTGGATGGTGTATGGCAGGACTGTGTACCTGA

Figura 4B

Secuencia de aminoácidos AHAS de longitud completa deducida confiere resistencia a los herbicidas de imidazolinona (SEQ ID NO: 12)

MATTAATAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV
 TPPSPAPPATPLRFWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGTSMEI
 HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV
 SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL
 DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY
 IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI
 PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDD
 RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALL
 DQSTTKTSDFSAWHNELDQOKREFPLGYKTFGEEIPQYAIQVLDELTK
 GEAIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLSAGLGAMGFGLPAAAGASVA
 NPGVTVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED
 RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK
 KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 5

I	II	III
Iminta 1 Notratado	Irga 417	Iminta 1 Notratado
Iminta 1 3X	Iminta 1 Notratado	Iminta 1 3X
Irga 417	Iminta 1 3X	Irga 417

Figura 6

Tratamientos	No brom de Plantas/m ² antes de tratamiento	No brom de Plantas/m ² después de tratamiento
IMINTA 1 3X	171	179
IMINTA 1 no tratado	168	164
IRGA 417	150	140

Figura 7

14% de humedad de Producción de Grano

Tratamientos	PRODUCC. GRANO Promedio kg/HA
IMINTA 1 3X	3323 a
IMINTA 1 PRUEBA	2908 a
IRGA 417	2796 a
l.s.d.	763
c.v.%	11.2
F=	0.244

Figura 8

Componentes de producción

Tratamientos	Panicula /m ²	peso de grano 1000	% blanqueo	púas/ panicula	púas/ m ²
IMINTA 1 3X	453 a	21.7567 a	37.26	59.23 a	26804 a
IMINTA 1 no tratado	405 ab	21.2567 b	37.05	51.60 b	21145 ab
IRGA 417	307 b	22.1067 a	27.99	62.10 a	19061 b
l.s.d.	116	0.4386	14.9	3.29	6889
c.v. %	13.2	0.9	19.2	2.52	13.6
P=	0.057	0.014	0.257	0.002	0.076