

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 012**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/00** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2002 E 02749892 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1420629**

54 Título: **Plantas de trigo que exhiben resistencia aumentada a los herbicidas de imidazolinona**

30 Prioridad:

**09.08.2001 US 311141 P**

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

**05.08.2013**

73 Titular/es:

**NORTHWEST PLANT BREEDING CO. (100.0%)  
2001 COUNTRY CLUB ROAD  
PULLMAN, WA 99163, US**

72 Inventor/es:

**KONZAK, CALVIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 417 012 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Plantas de trigo que exhiben resistencia aumentada a los herbicidas de imidazolinona.

## REMISIÓN A SOLICITUDES AFINES

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional U.S. Núm. de Serie 60/311.141, presentada el 9 de agosto de 2001.

## CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere en general a plantas que exhiben una resistencia incrementada a los herbicidas de imidazolinona. Más específicamente, la presente invención se refiere a plantas de trigo obtenidas por mutagénesis y generación por cruzamiento y transformación que exhiben una resistencia incrementada a los herbicidas de imidazolinona.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La acetohidroxiácido-sintasa (AHAS; EC 4.1.3.18) es la enzima principal que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh B. K., 1999 Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine en: Singh B. K. (Ed) Plant amino acids. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Nueva York., págs. 227-247). AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicidas estructuralmente diversos que incluyen las sulfonilureas (LaRossa R. A. y Falco S. C., 1984 Trends Biotechnol 2: 158-161), las imidazolinonas (Shaner et al; 20 1984 Plant Physiol 76: 545-546), las triazolpirimidinas (Subramanian y Gerwick, 1989 Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in Whitacker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C., págs. 287-288), y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al., 1990 Plant Physiol 94: 239-244). Los herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea son ampliamente utilizados en la agricultura moderna debido a su eficacia a tasas de aplicación muy bajas y su ausencia relativa de toxicidad en los animales. Por inhibir la actividad de AHAS, estas familias de herbicidas previenen el crecimiento y desarrollo ulteriores de plantas sensibles que incluyen muchas especies de malezas. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona disponibles comercialmente son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) y 25 ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorosulfurón, metsulfurón-metilo, sulfometurón-metilo, clormurón-etilo, tifensulfurón-metilo, tribenurón-metilo, bensulfurón-metilo, nicosulfurón, etametsulfurón-metilo, rimsulfurón, triflurosulfurón-metilo, triasulfurón, primisulfurón-metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón-etilo y halosulfurón.

30 Debido a su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se ven favorecidos para aplicación por rociado por aspersión desde arriba de una extensa área de vegetación. La posibilidad de pulverizar un herbicida desde arriba de un área extensa de vegetación reduce los costes asociados con el establecimiento y mantenimiento de la plantación y reduce la necesidad de preparación del sitio antes de la utilización de tales productos químicos. La rociado por aspersión desde arriba de una especie tolerante deseada da también como resultado la posibilidad de alcanzar el potencial de rendimiento máximo de la especie deseada debido a la ausencia de especies competitivas. 35 Sin embargo, la posibilidad de utilizar tales técnicas de rociado por aspersión desde arriba depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada en área a pulverizar.

Entre las cosechas agrícolas principales, algunas especies de leguminosas tales como la soja son naturalmente resistentes a los herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad para metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner y Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471). Otras cosechas tales como maíz (Newhouse et al., 40 1992 Plant Physiol. 100:882-886) y arroz (Barrette et al., 1989 Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, págs. 195-220) son sensibles en cierto grado a los herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona depende de la naturaleza química del herbicida particular y el metabolismo diferencial del compuesto desde una forma tóxica a una forma no tóxica en cada planta (Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:145-546; Brown et al., 1987 Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Otras diferencias fisiológicas de las plantas tales como absorción y translocación juegan también un papel importante en la sensibilidad (Shaner y 45 Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471).

Cultivares de cosechas resistentes a imidazolinonas, sulfonilureas y triazolpirimidinas han sido producidos con éxito utilizando semillas, microsporas, polen, y mutagénesis de callo en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (Sebastian et al., 1989 Crop Sci. 29:1403-1408; Swanson et al., 1989 Theor. Appl. 50 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 simple parcialmente dominante confería resistencia. Se aislaron también previamente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona después de mutagénesis de semillas de *Triticum aestivum* L. cv *Fidel* (Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886). Estudios de herencia confirmaron que un solo gen parcialmente dominante confería resistencia. Basándose en 55 estudios de alelos, los autores llegaron a la conclusión de que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas

estaban localizadas en el mismo locus. Uno de los genes de resistencia del cultivar Fidel se designó FS-4 (Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886).

5 La modelización basada en computadora de la conformación tridimensional del complejo inhibidor de AHAS predice varios aminoácidos en la bolsa propuesta de fijación de inhibidores como sitios en los que las mutaciones inducidas podrían conferir probablemente resistencia selectiva a las imidazolinonas (Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368). Las plantas de trigo producidas con algunas de estas mutaciones diseñadas racionalmente en los sitios de fijación propuestos de la enzima AHAS han exhibido de hecho resistencia específica a una sola clase de herbicidas (Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 963:359-368).

10 Ha sido registrada también resistencia de las plantas a los herbicidas de imidazolinona en cierto número de Patentes. Las Patentes U.S. Núms. 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 y 6.222.100 describen en general el uso de un gen AHAS alterado para provocar resistencia a los herbicidas en las plantas, y describen específicamente ciertas líneas de maíz resistentes a imidazolinona. La Patente U.S. Núm. 5.013.659 da a conocer plantas que exhiben resistencia a los herbicidas que poseen mutaciones en al menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas en dicho lugar codifican o bien resistencia cruzada para 15 imidazolinonas y sulfonilureas o resistencia específica a las sulfonilureas, pero no se describe resistencia específica a imidazolinonas. Adicionalmente, la Patente U.S. Núm. 5.731.180 y la Patente U.S. Núm. 5.767.361 dan a conocer un gen aislado que tiene una sustitución de un solo aminoácido en una secuencia de aminoácidos de AHAS de monocotiledóneas de tipo salvaje que da como resultado resistencia específica a imidazolinona.

20 Hasta la fecha, la técnica anterior no ha descrito plantas de trigo resistentes a imidazolinona que contengan más de un gen AHAS alterado. Tampoco ha descrito la técnica anterior plantas de trigo resistentes a imidazolinona que contengan mutaciones en genomas distintos del genoma del que se deriva el gen FS-4. Por tanto, lo que se precisa en la técnica es la identificación de genes de resistencia a imidazolinona procedentes de genomas adicionales. Se precisan también en la técnica plantas de trigo que exhiban resistencia incrementada a herbicidas tales como imidazolinona y contengan más de un gen AHAS alterado. Se precisan asimismo métodos para controlar el 25 crecimiento de malezas en la proximidad de tales plantas de trigo. Estas composiciones y métodos permitirían el uso de técnicas de rociado por aspersión desde arriba cuando se aplican herbicidas a áreas que contienen plantas de trigo.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona una planta de trigo que comprende ácidos nucleicos AHAS con mutaciones múltiples, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona comparada con una variedad de tipo salvaje de la planta, y (I) en donde al menos dos de los ácidos nucleicos AHAS con mutaciones múltiples se seleccionan del grupo constituido por:

- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;
- b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;
- 35 c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;
- d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y
- e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);

o (II) en donde dichos al menos dos ácidos nucleicos AHAS mutados comprenden una combinación seleccionada del grupo constituido por:

- 40 f) combinaciones de (i) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 y (ii) polinucleótidos que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5;
- g) combinaciones de (i) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 2 y (ii) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; y
- 45 h) combinaciones de polinucleótidos complementarios para cualquier combinación de los polinucleótidos de f) hasta g); y

en donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta h) codifica una proteína AHAS.

Se proporcionan también partes de plantas y semillas de plantas derivadas de las plantas de trigo descritas en esta memoria.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas. Ejemplos de plantas de trigo no transgénicas que exhiben resistencia aumentada a los herbicidas de imidazolinona incluyen una planta de trigo que tiene una Designación del Depósito de Patente ATCC Número PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; o un derivado recombinante, o modificado por ingeniería genética de la planta con una Designación del Depósito de Patente ATCC Número PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; o de cualquier progenie de la planta con una Designación del Depósito de Patente ATCC Número PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; o una planta que es una progenie de cualquiera de estas plantas.

Además de las composiciones de la presente invención, se proporcionan varios métodos. Se describen en esta memoria métodos de modificación de la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona que comprenden modificar la expresión de un ácido nucleico IMI en la planta. Se describen también métodos de producción de una planta transgénica que tiene tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona que comprenden transformar una célula de la planta con un vector de expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos IMI y generar una planta a partir de la célula de la planta.

Se describe adicionalmente un método de control de malezas en la proximidad de una planta de trigo, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de trigo, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada a la presencia de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo y en donde la planta comprende uno o más ácidos nucleicos de IMI. En algunos aspectos preferidos de estos métodos, las plantas comprenden ácidos nucleicos IMI múltiples que están localizados en diferentes genomas de trigo.

## 20 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-B muestran la secuencia parcial de cDNA de Gunner IMI1 205 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia parcial de aminoácidos deducida del mismo (SEQ ID NO: 2).

Las figuras 2A-B muestran la secuencia parcial de cDNA de Gunner IMI2 208 (SEQ ID NO: 3), y la secuencia parcial de aminoácidos deducida del mismo (SEQ ID NO: 4).

25 Las figuras 3A-B muestran la secuencia parcial de cDNA de Madsen IMI2 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia parcial de aminoácidos deducida del mismo (SEQ ID NO: 6).

La figura 4 es una representación esquemática de las secuencias de aminoácidos conservadas en los genes AHAS implicados en la resistencia a diversos inhibidores de AHAS. El sitio del aminoácido específico responsable de la resistencia se indica por una línea de subrayado. (Modificado de Devine, M. D. y Eberlein, C. V., 1997 Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites *in* Herbicide Activity: Toxicity, Biochemistry, and Molecular Biology, IOS Press Amsterdam, p. 159-185).

Las figuras 5A-C son tablas que muestran la inhibición de la actividad de la enzima AHAS en trigo de tipo salvaje (variedad Gunner), AP205CL (Figura 5A), AP602CL (Figura 5B) y Madsen1 (Figura 5C) por el herbicida de imidazolinona imazamox. Los valores se expresan como porcentaje de la actividad no inhibida.

35 La figura 6 es una tabla que muestra la lesión reducida de Madsen1 por imazamox en comparación con un control de trigo Teal.

Las figuras 7A-B son tablas que muestran la retroinhibición de la actividad de la enzima AHAS por leucina y valina en trigo de tipo salvaje (variedad Gunner), AP205CL (Figura 7A) y AP602CL (Figura 7B).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente invención está dirigida a plantas de trigo, partes de plantas de trigo y células de plantas de trigo que exhiben resistencia incrementada a los herbicidas de imidazolinona. La presente invención incluye también semillas producidas por las plantas de trigo descritas en esta memoria.

Debe entenderse que como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un(a)" puede significar uno o más dependiendo del contexto en el que se utilice. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que puede utilizarse al menos una célula.

Como se utiliza en esta memoria, el término "planta de trigo" hace referencia a una planta que es un miembro del género *Triticum*. Las plantas de trigo de la presente invención pueden ser miembros de un género de *Triticum* que incluye *T. aestivum*, *T. turgidum*, *T. timopheevii*, *T. monococcum*, *T. zhukovskyi* y *T. urartu* e híbridos de las mismas. Ejemplos de subespecies de *T. aestivum* incluidas en la presente invención son *aestivum* (trigo común), *compactum* (trigo de club), *macha* (trigo macha), *vavilovi* (trigo vavilovi), *spelta* y *sphaerococcum* (trigo "shot"). Ejemplos de subespecies de *T. turgidum* incluidas en la presente invención son *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*,

*durum*, *paleocolchicum*, *polonicum*, *turanicum* y *dicoccoides*. Ejemplos de subespecies de *T. monococcum* incluidas en la presente invención son *monococcum* (einkorn) y *aegidopoides*. En una realización de la presente invención, la planta de trigo es un miembro de la especie *Triticum aestivum* L., y más particularmente, un cultivar Gunner o Madsen.

- 5 Debe entenderse que el término "planta de trigo" abarca plantas de trigo en cualquier etapa de madurez o desarrollo así como tejidos u órganos (partes de la planta) tomados o derivados de dichas plantas de trigo a no ser que se indique claramente otra cosa por el contexto. Partes de las plantas incluyen, pero sin carácter limitante, tallos, raíces, flores, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, cultivos de anteras, gametofitos, esporofitos, polen, microsporas, protoplastos y análogas. La presente invención incluye también  
10 semillas producidas por las plantas de trigo de la presente invención. En una realización, las semillas son progenie verdadera para una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la semilla de la planta de trigo.

La presente invención describe una planta de trigo como se define en la reivindicación 1 que comprende ácidos nucleicos IMI múltiples, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona  
15 en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido nucleico IMI" se refiere a un ácido nucleico que está mutado con respecto a un ácido nucleico AHAS en una planta de trigo de tipo salvaje que confiere resistencia incrementada a la imidazolinona a una planta en la que se transcribe el mismo.

Como se utiliza cuando se describen los ácidos nucleicos IMI, el término "múltiple" hace referencia a ácidos nucleicos IMI que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y no se refiere a un simple aumento en el número del mismo ácido nucleico IMI. Por ejemplo, los ácidos nucleicos IMI pueden ser diferentes debido al hecho de que se derivan de o están localizados en genomas de trigo diferentes.

Es posible que las plantas de trigo de la presente invención tengan ácidos nucleicos IMI múltiples de diferentes genomas, dado que estas plantas pueden contener más de un genoma. Por ejemplo, una planta de trigo *Triticum aestivum* contiene tres genomas a los que se hace referencia a veces como genomas A, B y D. Dado que AHAS es una enzima metabólicamente necesaria, se supone que cada genoma tiene al menos un gen que codifica la enzima AHAS, observada comúnmente con otras enzimas metabólicas en trigo hexaploide que han sido mapeadas. El ácido nucleico AHAS en cada genoma puede diferir, y usualmente lo hace, en su secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico AHAS en otro genoma. Una persona con experiencia en la técnica puede determinar el genoma de origen  
25 de cada ácido nucleico AHAS por cruzamiento genético y/o métodos de secuenciación o métodos de digestión con exonucleasas conocidos por los expertos en la técnica, y como se describe también en el Ejemplo 2 más adelante. Para los propósitos de esta invención, los ácidos nucleicos IMI derivados de uno de los genomas A, B o D se distinguen y se designan como ácidos nucleicos Imi1, Imi2 o Imi3. En esta memoria no se afirma que cualquier clase de ácido nucleico IMI particular esté correlacionada con cualquier genoma A, B o D particular. Por ejemplo, en esta memoria no se afirma que los ácidos nucleicos Imi1 estén correlacionados con ácidos nucleicos del genoma A, que los ácidos nucleicos Imi2 estén correlacionados con ácidos nucleicos del genoma B, etc. Las designaciones Imi1, Imi2 y Imi3 indican simplemente que los ácidos nucleicos IMI dentro de cada una de tales clases no se segregan independientemente, mientras que dos ácidos nucleicos IMI de clases diferentes sí se segregan independientemente y pueden derivarse por tanto de genomas de trigo diferentes.

La clase Imi1 de ácidos nucleicos incluye el gen Fs-4 como ha sido descrito por Newhouse et al. (1992 Plant Physiol. 100:882-886) y el gen Gunner IMI 1 205 descrito con mayor detalle más adelante. La clase Imi2 de ácidos nucleicos incluye el gen Gunner Imi2 208 y el gen Imi2 Madsen descrito más adelante. Como se muestra por los miembros de la clase Imi1 de ácidos nucleicos, cada clase IMI puede incluir miembros de especies de trigo diferentes. Por tanto, cada clase IMI incluye ácidos nucleicos IMI que difieren en su secuencia de nucleótidos pero que se designan sin embargo como originarios de, o que están localizados en, el mismo genoma de trigo utilizando estudios de herencia  
40 como es conocido por quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica.

Como se utiliza en esta memoria con relación a los ácidos nucleicos, el término "procedente de" se refiere a un ácido nucleico "localizado en" o "derivado de" un genoma particular. El término "localizado en" se refiere a un ácido nucleico contenido en dicho genoma particular. Como se utiliza también en esta memoria con relación a un genoma, el término "derivado de" se refiere a un ácido nucleico que ha sido separado o aislado de dicho genoma. El término "aislado" se define con mayor detalle más adelante.

La planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI, en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico distinto de Imi1. El término "distinto de Imi1" se refiere a un ácido nucleico IMI que no es un miembro de la clase Imi1 como se describe arriba, a saber las secuencias de polinucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 o polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende SEQ ID NO:4 ó 6. De acuerdo con ello, la planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI que comprende la secuencia de polinucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 4 ó 6.

La presente invención incluye plantas de trigo que comprenden ácidos nucleicos AHAS con mutaciones múltiples como se definen en la reivindicación 1, en donde la planta de trigo exhibe una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

5 El herbicida de imidazolinona puede seleccionarse, pero sin carácter limitante, de PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), 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 herbicida de imidazolinona puede seleccionarse, pero sin carácter limitante, 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 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-tolueno de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-tolueno de metilo. Se prefiere el uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico. Se prefiere particularmente el uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

En una realización, la planta de trigo comprende dos ácidos nucleicos IMI, en donde los ácidos nucleicos se derivan o están localizados en genomas de trigo diferentes. Preferiblemente, los dos ácidos nucleicos son un ácido nucleico lmi1 y un ácido nucleico lmi2, en donde el ácido nucleico lmi1 comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1, y el ácido nucleico lmi2 comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

20 En una realización preferida de la presente invención, los ácidos nucleicos IMI múltiples contenidos en la planta codifican una secuencia de aminoácidos que comprende una mutación en un dominio que está conservado entre varias proteínas AHAS. A estos dominios conservados se hace referencia en la presente memoria como Dominio A, Dominio B, Dominio C, Dominio D y Dominio E. La figura 4 muestra la localización general de cada dominio en una proteína AHAS. El Dominio A contiene la secuencia de aminoácidos AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO: 7). El Dominio B contiene la secuencia de aminoácidos QWED (SEQ ID NO: 8). El Dominio C contiene la secuencia de aminoácidos WFAYPGGASMEIHQALTRS (SEQ ID NO: 9). El Dominio D contiene la secuencia de aminoácidos AFQETP (SEQ ID NO: 10). El Dominio E contiene la secuencia de aminoácidos IPSSG (SEQ ID NO: 11). La presente invención contempla también que pueden existir ligeras variaciones en los dominios conservados, por ejemplo, en plantas del cultivar "cockleberry", el residuo serina en el Dominio D está reemplazado por un residuo alanina.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención incluye una planta de trigo que comprende un ácido nucleico IMI que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación en un dominio conservado seleccionado del grupo constituido por un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E. En una realización, la planta de trigo comprende un ácido nucleico IMI que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación en un dominio E. En realizaciones preferidas adicionales, las mutaciones en los dominios conservados se encuentran en las localizaciones indicadas por el subrayado siguiente: AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO:7); QWED (SEQ ID NO:8); VFAYPGGASMEIHQALTRS (SEQ ID NO:9); AFQETP (SEQ ID NO:10) e IPSSG (SEQ ID NO:11).

Una sustitución preferida es asparagina en lugar de serina en el Dominio D (SEQ ID NO: 11).

40 Las plantas de trigo descritas en esta memoria pueden ser plantas de trigo transgénicas o plantas de trigo no-transgénicas. Como se utiliza en esta memoria, el término "transgénico" hace referencia a cualquier planta, célula de planta, callo, tejido de planta o parte de planta, que contiene la totalidad o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, la totalidad o parte del polinucleótido recombinante está integrada de manera estable en un cromosoma o elemento extracromosómico, de modo que el mismo se transmite a generaciones 0sucesivas. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinante" hace referencia a un polinucleótido que se ha alterado, ha sufrido transposición o se ha modificado por ingeniería genética. Ejemplos incluyen cualquier polinucleótido, o polinucleótidos clonados, que están enlazados o unidos a secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones de polinucleótidos que sean resultado de sucesos que ocurren naturalmente, tales como mutaciones espontáneas, o de mutagénesis no espontánea seguida por generación selectiva. Las plantas que contienen mutaciones que surgen debido a mutagénesis no espontánea y cruzamiento selectivo se designan en esta memoria como plantas no transgénicas, y se incluyen en la presente invención. En realizaciones en las cuales la planta de trigo es transgénica y comprende ácidos nucleicos IMI múltiples, los ácidos nucleicos pueden derivarse de genomas diferentes o del mismo genoma. Alternativamente en las realizaciones en las cuales la planta de trigo no es transgénica y comprende ácidos nucleicos IMI múltiples, los ácidos nucleicos están localizados en genomas diferentes o en el mismo genoma.

Un ejemplo de un cultivar de planta de trigo no transgénico que comprende un ácido nucleico IMI es el cultivar de la planta depositado con la ATCC bajo la Designación en el Depósito de Patentes Número PTA-4213 y designado en

esta memoria como el cultivar de trigo Gunner IMI 205. El cultivar de trigo Gunner IMI 205 contiene un ácido nucleico Imi1. La secuencia parcial de nucleótidos correspondiente al gen Gunner IMI1 205 se muestra en SEQ ID NO: 1.

5 Otro ejemplo de un cultivar de planta de trigo no transgénica que comprende un ácido nucleico IMI es el cultivar de la planta depositado con la ATCC bajo la Designación en el Depósito de Patentes Número PTA-4214 y designado en esta memoria como el cultivar de trigo Gunner IMI 208. El cultivar de trigo Gunner IMI 208 contiene un ácido nucleico Imi2. La secuencia parcial de nucleótidos correspondiente al gen Gunner IMI2 208 se muestra en SEQ ID NO: 2.

10 Otro ejemplo adicional de un cultivar de planta de trigo no transgénica que comprende un ácido nucleico IMI es el cultivar de la planta depositado con la ATCC bajo la Designación en el Depósito de Patentes Número PTA-4255 y designado en esta memoria como el cultivar de trigo Madsen IMI. El cultivar de trigo Madsen IMI contiene un ácido nucleico Imi2. La secuencia parcial de nucleótidos correspondiente al gen Madsen IMI2 se muestra en SEQ ID NO: 5.

15 Se realizaron depósitos separados de 2500 semillas de los cultivares de trigo Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 y Madsen IMI con la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, en fecha 9 de abril de 2002 (Gunner IMI 205 y Gunner IMI 208) y en fecha 1 de mayo de 2002 (Madsen IMI). Estos depósitos se realizaron de acuerdo con los términos y provisiones del Tratado de Budapest concernientes al depósito de microorganismos. Los depósitos se hicieron para un plazo de al menos 30 años, y al menos 5 años después ha sido recibido por la ATCC el requerimiento más reciente para el suministro de una muestra del depósito. Las semillas depositadas recibieron los Números de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213 (Gunner IMI 205), PTA-4214 (Gunner IMI 208), y PTA-zzzz (Madsen IMI).

20 La presente invención incluye la planta de trigo que tiene un Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; un mutante, recombinante, o derivado modificado por ingeniería genética de la planta con el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; cualquier progenie de la planta con el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255; y una planta que es la progenie de cualquiera de estas plantas. En una realización preferida, la planta de trigo de la presente invención tiene adicionalmente las características de resistencia a los herbicidas de la planta con el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213, PTA-4214 o PTA-4255.

30 Se incluyen también en la presente invención híbridos de los cultivares de trigo Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 o Madsen IMI descritos en esta memoria y otro cultivar de trigo. El otro cultivar incluye, pero sin carácter limitante, *T. aestivum* L. cv Fidel y cualquier cultivar que albergue un gen mutante FS-1, FS-2, FS-3, o FS-4. (Véanse la Patente U.S. Núm. 6.339.184 y la Solicitud de Patente U.S. Núm. 08/474.832). Híbridos preferidos contienen una combinación de ácidos nucleicos Imi1, Imi2 y/o Imi3. Ejemplos de híbridos preferidos son los híbridos Gunner IMI 205/Gunner IMI 208. Los híbridos Gunner IMI 205/Gunner IMI 208 comprenden un ácido nucleico Imi1 y un ácido nucleico Imi2.

35 Los términos "cultivar" y "variedad" se refieren a un grupo de plantas dentro de una especie definida por la compartición de una serie de características o rasgos comunes aceptados por los expertos en la técnica como suficientes para distinguir un cultivar o variedad de otro cultivar o variedad. No existe implicación alguna en ninguno de los términos de que todas las plantas de cualquier cultivar o variedad sean genéticamente idénticas al nivel total génico o molecular, o de que cualquier planta dada sea homocigótica para todos los loci. Un cultivar o variedad se considera "progenie verdadera" para un rasgo particular si, cuando el cultivar o variedad de progenie verdadera se auto-poliniza, la totalidad de la progenie contiene el rasgo. En la presente invención, el rasgo procede de una mutación en un gen AHAS de la planta o semilla de trigo.

45 Debe entenderse que la planta de trigo de la presente invención puede comprender un gen AHAS de tipo salvaje o no mutado además de un gen IMI. Como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se contempla que los cultivares de trigo Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 y Madsen IMI contienen una mutación en una sola de las múltiples isoenzimas AHAS. Por tanto, la presente invención incluye una planta de trigo que comprende ácidos nucleicos IMI múltiples además de uno o más ácidos nucleicos AHAS de tipo salvaje o no mutados.

50 Además de plantas de trigo, la presente invención abarca ácidos nucleicos AHAS aislados mutados como se definen en la reivindicación 20. Los ácidos nucleicos comprenden un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por un polinucleótido de SEQ ID NO: 3; un polinucleótido de SEQ ID NO: 5; un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 6; y un polinucleótido complementario para cualquiera de los polinucleótidos arriba mencionados. En una realización preferida, el ácido nucleico AHAS mutado comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

55 El término "proteína AHAS" hace referencia a una proteína acetohidroxiácido-sintasa, y el término "proteína IMI" hace referencia a cualquier proteína AHAS que está mutada respecto a una proteína AHAS de tipo salvaje y que

confiere resistencia incrementada a la imidazolinona a una planta, célula de planta, parte de planta, semilla de planta o tejido de planta cuando se expresa en dicho lugar. La proteína IMI puede comprender por ejemplo, un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. Como se utiliza también en esta memoria, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" hacen referencia a RNA o DNA que es lineal o ramificado, mono o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término abarca también híbridos RNA/DNA. Estos términos abarcan también secuencias no traducidas localizadas en ambos extremos 3' y 5' de la región codificante del gen: al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de secuencia aguas arriba del extremo 5' de la región codificante y al menos aproximadamente 200 nucleótidos de secuencia aguas abajo del extremo 3' de la región codificante del gen. Bases menos comunes, como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras pueden utilizarse también para apareamiento antisentido de dsRNA y ribozima. Por ejemplo, se ha demostrado que los polinucleótidos que contienen análogos C-5 propino de uridina y citidina fijan RNA con afinidad alta y son inhibidores antisentido potentes de la expresión génica. Pueden hacerse también otras modificaciones, tales como modificaciones en la cadena de fosfodiéster, o el hidroxilo 2' en el grupo del azúcar ribosa del RNA. Los polinucleótidos y ribozimas antisentido pueden estar constituidos totalmente por ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos mixtos. Los polinucleótidos de la invención pueden producirse por cualquier medio, con inclusión de preparaciones genómicas, preparaciones de cDNA, síntesis *in vitro*, RT-PCR y transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está exento de algunas de las secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicación existente naturalmente. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En diversas realizaciones, la molécula del ácido nucleico IMI aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el DNA genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico (v.g., una célula de *Triticum aestivum*). Un ácido nucleico se considera también aislado si el mismo se ha alterado por intervención humana, o se ha puesto en un locus o localización que no es su sitio natural, o si se introduce en una célula por agroinfección o biolística. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cDNA, puede liberarse de algo del material celular restante con el cual está asociada naturalmente, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Se excluyen específicamente de la definición de "ácidos nucleicos aislados" los materiales siguientes: cromosomas existentes naturalmente (tales como extensiones de cromosomas), bibliotecas de cromosomas artificiales, bibliotecas genómicas, y bibliotecas de cDNA que existen sea como una preparación de ácido nucleico *in vitro* o como una preparación de células hospedadoras transfectadas/transformadas, en donde las células hospedadoras son una preparación heterogénea *in vitro* o están extendidas como una población heterogénea de colonias simples. Se excluyen también específicamente las bibliotecas anteriores en las cuales un ácido nucleico especificado constituye menos de 5% del número de inserciones de ácido nucleico en las moléculas vectoras. Además, se excluyen específicamente preparaciones de DNA genómico de células enteras o RNA de células enteras (con inclusión de preparaciones de células enteras que están cizalladas mecánicamente o digeridas enzimáticamente). Aún más, se excluyen específicamente las preparaciones de células enteras encontradas como preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis en la cual el ácido nucleico de la invención no se ha separado ulteriormente de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (v.g., separación ulterior por escisión de una sola banda de una población de bandas heterogéneas en un gel de agarosa o transferencia en nailon).

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, v.g., una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 5 puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia proporcionada en esta memoria. Por ejemplo, un cDNA IMI de *T. aestivum* puede aislarse a partir de una biblioteca de *T. aestivum* utilizando la totalidad o una parte de la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. Además, una molécula de ácido nucleico que abarca la totalidad o una porción de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5 puede aislarse por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados basándose en esta secuencia. Por ejemplo, puede aislarse mRNA de células de plantas (v.g., por el procedimiento de extracción con tiocianato de guanidinio de Chirgwin et al., 1979 Biochemistry 18:5294-5299) y puede prepararse cDNA utilizando transcriptasa inversa (v.g., transcriptasa inversa MLV de Moloney disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

Pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos sintéticos para amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa basándose en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando cDNA o, alternativamente, DNA genómico como molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación PCR. La

molécula de ácido nucleico así amplificada puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de la secuencia de DNA. Adicionalmente, se pueden preparar oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos IMI por técnicas de síntesis estándar, v.g., utilizando un sintetizador automático de DNA.

5 Los ácidos nucleicos IMI de la presente invención pueden comprender secuencias que codifican una proteína IMI (es decir, "regiones codificantes"), así como secuencias no traducidas 5' y secuencias no traducidas 3'. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender sólo las regiones codificantes de un gen IMI, o pueden contener fragmentos genómicos enteros aislados de DNA genómico. Una región codificante de estas secuencias se indica como una "posición ORF". Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una porción de una región codificante de un gen IMI, por ejemplo, un fragmento  
10 que puede utilizarse como sonda o cebador. Las secuencias de nucleótidos determinadas por la clonación de los genes IMI de *T. aestivum* permiten la generación de sondas y cebadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de homólogos IMI en otros tipos de células y organismos, así como homólogos de IMI de otras plantas de trigo y especies afines. La porción de la región codificante puede codificar también un fragmento biológicamente activo de una proteína IMI.

15 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "porción biológicamente activa de" una proteína IMI incluye una porción, v.g., un dominio/motivo, de una proteína IMI que, cuando se produce en una planta aumenta la resistencia de la planta a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de la planta de tipo salvaje. Métodos para cuantificación de la resistencia incrementada a los herbicidas de imidazolinona se proporcionan en los ejemplos que siguen. Porciones biológicamente activas de una proteína IMI incluyen péptidos  
20 que comprenden SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 que incluyen menos aminoácidos que una proteína IMI de longitud total e imparten resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona cuando se expresan en una planta. Típicamente, las porciones biológicamente activas (v.g., 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 que tiene al menos una actividad de una proteína IMI. Además, otras porciones biológicamente activas en las cuales están  
25 delecionadas otras regiones del polipéptido, se pueden preparar por técnicas recombinantes y pueden evaluarse respecto a una o más de las actividades descritas en esta memoria. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de una proteína IMI incluyen uno o más dominios conservados seleccionados del grupo constituido por un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E, en donde el dominio conservado contiene una mutación.

30 Se describen también polipéptidos IMI quiméricos o de fusión.

Como se utiliza en esta memoria, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" IMI comprende un polipéptido IMI enlazado operativamente a un polipéptido distinto de IMI. Un "polipéptido distinto de IMI" hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que no es sustancialmente idéntica a un polipéptido IMI, v.g., un polipéptido que no es una isoenzima IMI, péptido que desempeña una función distinta de la de un polipéptido IMI.  
35 Dentro del polipéptido de fusión, debe entenderse que el término "enlazado operativamente" indica que el polipéptido IMI y el polipéptido distinto de IMI están fusionados uno a otro de tal modo que ambas secuencias cumplen la función compuesta atribuida a la secuencia utilizada. El polipéptido distinto de IMI puede fusionarse al término N o al término C del polipéptido IMI. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión GST-IMI en el cual la secuencia IMI está fusionada al término C de la secuencia GST. Tales polipéptidos de fusión  
40 pueden facilitar la purificación de polipéptidos IMI recombinantes. En otro aspecto, el polipéptido de fusión es un polipéptido IMI que contiene una secuencia señal heteróloga en su término N. En ciertas células hospedadoras (células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de un polipéptido IMI puede aumentarse con el uso de una secuencia señal heteróloga.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido IMI que tiene identidad de secuencia a un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5 puede crearse por introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, tal que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en el polipéptido codificado. Las mutaciones pueden introducirse en una  
50 secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5 por técnicas estándar, tales como mutagénesis orientada y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se hacen sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (v.g., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (v.g., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (v.g. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (v.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (v.g., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (v.g., tirosina,  
55

- fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido IMI se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse aleatoriamente mutaciones a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de IMI, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden someterse a
- 5 cribado respecto a una actividad IMI descrita en esta memoria a fin de identificar mutantes que retienen la actividad de IMI. Después de la mutagénesis de la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, el polipéptido codificado puede expresarse recombinantemente y la actividad del polipéptido puede determinarse por análisis de la resistencia a la imidazolinona de una planta que expresa el polipéptido como se describe en los ejemplos que siguen.
- 10 A fin de determinar la identidad porcentual de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (v.g., pueden introducirse lagunas en la secuencia de un polipéptido para alineación óptima con el otro polipéptido). Se comparan luego los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en otra secuencia, entonces las moléculas son idénticas en dicha
- 15 posición. Puede hacerse el mismo tipo de comparación entre dos secuencias de ácido nucleico. La identidad porcentual de secuencia entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad porcentual de secuencia = números de posiciones idénticas/números totales de posiciones x 100). Para los propósitos de la invención, la identidad porcentual de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido se determina utilizando el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600
- 20 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Para determinar la identidad porcentual de dos ácidos nucleicos se utiliza una penalidad por abertura de laguna de 15 y una penalidad por extensión de laguna de 6,66. Para determinar la identidad porcentual de dos polipéptidos se utiliza una penalidad por abertura de laguna de 10 y una penalidad por extensión de laguna de 0,1. Para todos los parámetros restantes se asignan los ajustes por defecto.
- Debe entenderse que para los propósitos de determinación de la identidad de secuencia, cuando se compara una
- 25 secuencia de DNA con una secuencia de RNA, un nucleótido timidina es equivalente a un nucleótido uracilo. Preferiblemente, los polipéptidos IMI aislados descritos en esta memoria son al menos aproximadamente 50-60%, con preferencia al menos aproximadamente 60-70%, y con mayor preferencia al menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% o 90-95%, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más, idénticos a una secuencia entera de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ
- 30 ID NO: 6. En otro aspecto, los polipéptidos IMI descritos en esta memoria tienen al menos aproximadamente 50-60%, con preferencia al menos aproximadamente 60-70%, con mayor preferencia al menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% o 90-95%, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más, idénticos a una secuencia entera de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. Adicionalmente, pueden crearse ácidos nucleicos IMI optimizados. Preferiblemente, un ácido nucleico IMI optimizado codifica un polipéptido IMI que modula la tolerancia de una planta a los herbicidas de imidazolinona, y más preferiblemente aumenta la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona después de su sobre-expresión en la planta. Como se utiliza en esta memoria, "optimizado" hace referencia a un ácido nucleico que se ha modificado por ingeniería genética para aumentar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos IMI optimizados de plantas, la secuencia de DNA del gen puede modificarse de modo que 1) comprenda codones preferidos por genes de plantas fuertemente expresados; 2) comprenda un contenido de A+T en composición de bases de nucleótidos tal como el encontrado sustancialmente en las plantas; 3) forme una secuencia de iniciación en plantas, 4) elimine secuencias que causan desestabilización, poliadenilación inadecuada, degradación y terminación de RNA o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de remodelación de RNA. La expresión incrementada de ácidos nucleicos IMI en plantas puede conseguirse por
- 35 utilización de la frecuencia de distribución del uso de codones en las plantas en general o en una planta particular. Métodos para optimización de la expresión de ácidos nucleicos en plantas pueden encontrarse en EPA 0359472; EPA 0385962; Solicitud PCT Núm. WO 91116432; Patente U.S. Núm. 5.380.831; Patente U.S. Núm. 5.436391; Perlack *et al.*, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; y Murray *et al.*, 1989 Nucleic Acids. Res. 17:477-498.
- 40 Como se utiliza en esta memoria, "frecuencia de uso preferido de codones" se refiere a la preferencia exhibida por una célula hospedadora específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, se divide el número de apariciones de dicho codón en el gen por el número total de apariciones de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. Análogamente, la frecuencia de uso preferido de codones exhibida por una célula hospedadora puede
- 45 calcularse promediando la frecuencia de uso preferido de codones en un gran número de genes expresados por la célula hospedadora. Es preferible que este análisis se limite a los genes que son expresados fuertemente por la célula hospedadora. La desviación porcentual de la frecuencia de uso preferido de codones para un gen sintético con respecto a la empleada por una célula hospedadora se calcula determinando primeramente la desviación porcentual de la frecuencia de uso de un codón simple con respecto a la de la célula hospedadora seguido por obtención de la desviación media para todos los codones. Como se define en esta memoria, este cálculo incluye
- 50
- 55
- 60

codones singulares (es decir, ATG y TGG). En términos generales, la desviación media global del uso de codones de un gen optimizado con respecto al de una célula hospedadora se calcula utilizando la ecuación  $1 A = n = 1 Z X_n - Y_n X_n$  multiplicado por  $100 Z$ , donde  $X_n$  = frecuencia de uso para el codón  $n$  en la célula hospedadora;  $Y_n$  = frecuencia de uso para el codón  $n$  en el gen sintético,  $n$  representa un codón individual que especifica un aminoácido y el número total de codones es  $Z$ . La desviación global de la frecuencia de uso de codones,  $A$ , para todos los aminoácidos debería ser preferiblemente menor que aproximadamente 25%, y con mayor preferencia menor que aproximadamente 10%.

Por tanto, un ácido nucleico IMI puede optimizarse de tal modo que su frecuencia de distribución de uso de codones se desvíe, preferiblemente, no más de 25% de la de los genes de plantas expresados fuertemente y, con mayor preferencia, no más de aproximadamente 10%. Además, se presta consideración al contenido porcentual de G+C de la tercera base degenerada (las monocotiledóneas parecen favorecer G+C en esta posición, mientras que las dicotiledóneas no lo hacen). Debe reconocerse también que el nucleótido XCG (donde X es A, T, C o G) es el codón menos preferido en las dicotiledóneas, mientras que el codón XTA se evita tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos IMI optimizados de esta invención tienen también preferiblemente índices de evitación de dobletes CG y TA que se aproximan estrechamente a los de la planta hospedadora seleccionada (es decir, *Triticum aestivum*). Más preferiblemente, estos índices se desvían de los del hospedador en no más de aproximadamente 10-15%.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IMI arriba descritos, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que son antisentido respecto a ellas. Se cree que los polinucleótidos antisentido inhiben la expresión génica de un polinucleótido diana por fijarse específicamente al polinucleótido diana e interferir con la transcripción, remodelación, transporte, traducción y/o estabilidad del polinucleótido diana. Se describen en la técnica anterior métodos para direccionar el polinucleótido antisentido al DNA cromosómico, a un transcrito de RNA primario o a un mRNA procesado. Preferiblemente, las regiones diana incluyen sitios de remodelación, codones de iniciación de la traducción, codones de terminación de la traducción, y otras secuencias dentro del marco de lectura abierto.

Para los propósitos de la invención, el término "antisentido" se refiere a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es suficientemente complementario para la totalidad o una porción de un gen, transcrito primario o mRNA procesado, de tal modo que interfiere con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de apareamiento de bases de acuerdo con las reglas estándar de la complementariedad de Watson-Crick. Específicamente, las purinas se aparearán en bases con pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada con timina (A:T) en el caso del DNA, o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso del RNA. Debe entenderse que dos polinucleótidos pueden hibridarse uno a otro aun cuando no sean completamente complementarios entre sí, con tal que cada uno tenga al menos una región que es sustancialmente complementaria al otro. El término "ácido nucleico antisentido" incluye tanto RNA monocatenario como casetes de expresión de DNA bicatenario que pueden transcribirse para producir un RNA antisentido. Los ácidos nucleicos antisentido "activos" son moléculas de RNA antisentido que son capaces de hibridarse selectivamente con un transcrito primario o mRNA que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

Además de los ácidos nucleicos IMI y polipéptidos arriba descritos, el presente documento describe estos ácidos nucleicos y polipéptidos unidos a un resto. Estos restos incluyen, pero sin carácter limitante, restos de detección, restos de hibridación, restos de purificación, restos de suministro, restos de reacción, restos de fijación, y análogos. Un grupo típico de ácidos nucleicos que tienen restos unidos son sondas y cebadores. Las sondas y los cebadores comprenden típicamente un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido comprende típicamente una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones severas a al menos aproximadamente 12, con preferencia aproximadamente 25, con mayor preferencia aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una cadena de sentido de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, una secuencia antisentido de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o mutantes de las mismas existentes naturalmente. Cebadores basados en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5 pueden utilizarse en reacciones PCR para clonar homólogos IMI. Sondas basadas en las secuencias de nucleótidos IMI pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican el mismo polipéptido o polipéptidos homólogos. En aspectos preferidos, la sonda comprende adicionalmente un grupo identificador unido a ella, pudiendo ser el grupo identificador v.g. un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor enzimático. Tales sondas pueden utilizarse como parte de un kit de test marcador genómico para identificación de células que expresan un polipéptido IMI, por ejemplo por medición de un nivel de un ácido nucleico codificante de IMI, en una muestra de células, v.g., por detección de niveles de mRNA de IMI o determinación de si un gen de IMI genómico ha sido mutado o delecionado.

El documento describe adicionalmente un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico de IMI como se describe arriba, en el cual la expresión del vector en una célula hospedadora da como resultado una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona comparada con una variedad de tipo salvaje

de la célula hospedadora. Como se utiliza en esta memoria, el término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de DNA bicatenario circular al cual pueden ligarse segmentos de DNA adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el cual pueden ligarse segmentos de DNA adicionales al genoma viral. Ciertos

5 vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (v.g., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (v.g., vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora después de introducción en la célula hospedadora, y se replican con ello junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente. A tales vectores se hace

10 referencia en esta memoria como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de DNA recombinante se encuentran a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiabilmente dado que el plásmido es la forma de vector utilizada más frecuentemente. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (v.g., retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-

15 asociados), que desempeñan a funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células

20 hospedadoras que se utilizan para las expresión, que está(n) enlazada(s) operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "enlazado operativamente" tiene por objeto significar que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (v.g., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). La expresión "secuencia reguladora" tiene por objeto incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (v.g., señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression

25 Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) o véase: Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, eds. Glick y Thompson, capítulo 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, con inclusión de las referencias citadas en dicho lugar. Secuencias reguladoras incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células hospedadoras o en ciertas condiciones. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión deseado del polipéptido, etc. Los vectores de expresión pueden introducirse en células hospedadoras para producir así

30 polipéptidos o péptidos, con inclusión de polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en esta memoria (v.g., polipéptidos IMI, polipéptidos de fusión, etc.).

35

Los polipéptidos IMI pueden expresarse en plantas y en células de planta tales como células de plantas unicelulares (tales como algas) (véase Falciatore *et al.*, 1999 Marine Biotechnology 1(3): 239-251 y las referencias citadas en dicho lugar) y células vegetales procedentes de plantas superiores (v.g., las espermatofitas, tales como plantas de cosecha). Un polinucleótido IMI puede "introducirse" en una célula vegetal por cualquier medio, con inclusión de

40 transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo de partículas, agroinfección, biolística y análogos.

Métodos adecuados para transformación o transfección de células hospedadoras que incluyen células vegetales pueden encontrarse en Sambrook, *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, 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: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Dado que la resistencia incrementada a los herbicidas de imidazolinona es un rasgo general que se desea heredar en una gran diversidad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, mandioca, pimiento, girasol y tagetes, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena, y tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa, plantas

50 arbustivas (café, cacao, té), especies de Sáliz, árboles (palma de aceite, cocotero), gramas perennes y cosechas forrajeras, estas plantas de cosecha son también plantas diana preferidas para una ingeniería genética como una realización adicional de la presente invención. En una realización preferida, la planta es una planta de trigo. Cosechas forrajeras incluyen, pero sin carácter limitante, grama oficial, alpiste, bromo, centeno silvestre, grama azul, grama de huerto, alfalfa, salfoina, trébol de pata de pájaro, trébol híbrido, trébol rojo y meliloto.

En una realización de la presente invención, la transfección de un polinucleótido IMI en una planta se realiza por transferencia de genes medida por Agrobacterium. Un método de transformación conocido por los expertos en la técnica es la inmersión de una planta en floración en una solución de agrobacterias, en donde la agrobacteria contiene el ácido nucleico IMI, seguido por generación de los gametos transformados. La transformación de plantas medida por Agrobacterium puede realizarse utilizando por ejemplo la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986

55

Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Clontech) de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación puede efectuarse por técnicas estándar de transformación y regeneración (Deblaere *et al.*, 1994 Nucl. Acids Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2ª edición - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - en Sect., Ringbuc Centrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4;

5 Glick, Bernard R. y Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede transformarse por transformación de cotiledones o hipocótilo (Moloney *et al.*, 1999 Plant Cell Report 8:238-242; De Block *et al.*, 1989 Plant Physiol. 90: 694-701). El uso de antibióticos para selección de *Agrobacterium* y plantas depende del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para la transformación. La selección de colza se realiza normalmente utilizando

10 kanamicina como marcador de planta seleccionable. La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* al lino puede realizarse, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova *et al.*, 1994 Plant Cell Report 13:282-285. Adicionalmente, la transformación de la soja puede realizarse utilizando por ejemplo una técnica descrita en la Patente Europea Núm. 0424047, la Patente U.S. Núm. 5.322.783, la Patente Europea Núm. 0397687, la Patente U.S. Núm. 5.376.543 o la Patente U.S. Núm. 5.169.770. La transformación del maíz puede realizarse por

15 bombardeo con partículas, incorporación de DNA mediada por polietilenglicol o por la técnica de fibras de carburo de silicio. (Véase, por ejemplo, Freeling y Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: Nueva York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de transformación de maíz se encuentra en la Patente U.S. Núm. 5.990.387, y un ejemplo específico de transformación de trigo puede encontrarse en la Solicitud de Patente PCT Núm. WO 93/07256.

20 Según la presente invención, el polinucleótido IMI introducido puede mantenerse en la célula vegetal de manera estable si el mismo se incorpora en un replicón autónomo no cromosómico o se integra en los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido IMI introducido puede estar presente en un vector no replicante extra-

25 cromosómico y expresarse transitoriamente o ser transitoriamente activo. En una realización, puede crearse un microorganismo recombinante homólogo en el cual el polinucleótido IMI se integra en un cromosoma, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen AHAS en el cual se ha introducido una delección, adición o

30 sustitución para alterar con ello, v.g., destruir funcionalmente, el gen AHAS endógeno y crear un gen IMI. Para crear una mutación puntual por recombinación homóloga, pueden utilizarse híbridos DNA-RNA en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss *et al.*, 1999 Nucleic Acids Research 27(5): 1323-1390 y Kmiec, 1999, Gene Therapy American Scientist 87(3): 240-247). Otros procedimientos de recombinación homóloga en especies de *Triticum* son también bien conocidos en la técnica y se contemplan para uso en esta memoria.

En el vector de recombinación homóloga, el gen IMI puede estar flanqueado en sus extremos 5' y 3' por una molécula de ácido nucleico adicional del gen AHAS a fin de permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen IMI exógeno transportado por el vector y un gen AHAS endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula de ácido nucleico AHAS flanqueante adicional tiene una longitud suficiente para recombinación homóloga exitosa

35 con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen en el vector varios centenares de pares de bases hasta kilobases de DNA flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') (véase, v.g., Thomas, K.R., y Capecchi, M.R., 1987 Cell 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga o Strepp *et al.*, 1998 PNAS, 95 (8): 4368-4373 para recombinación basada en cDNA en *Physcomitrella patens*). Sin embargo, dado que el gen IMI difiere normalmente del gen AHAS en muy pocos aminoácidos, no siempre es necesaria una secuencia flanqueante. El vector de

40 recombinación homóloga se introduce en un microorganismo o célula vegetal (v.g., por la vía de DNA mediada por polietilenglicol), y las células en las cuales el gen IMI introducido se ha recombinado homológamente con el gen AHAS endógeno se seleccionan utilizando métodos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, pueden producirse microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen IMI en un vector poniendo el

45 mismo bajo control del operón lac permite la expresión del gen IMI únicamente en presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en la técnica.

Tanto si está presente en un vector extracromosómico no replicante o en un vector que está integrado en un cromosoma, el polinucleótido IMI reside preferiblemente en una casete de expresión de plantas. Una casete de expresión de plantas contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión génica en

50 células de plantas que están enlazadas operativamente de tal modo que cada secuencia puede cumplir su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción por señales de poliadenilación. Señales de poliadenilación preferidas son las originarias de t-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* tales como el gen 3 conocido como octopina-sintasa del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984 EMBO J. 3:835) o equivalentes funcionales del mismo, pero también son adecuados todos los restantes terminadores funcionalmente activos en plantas. Dado que la expresión de genes en

55 plantas no está limitada en muchos casos a niveles transcripcionales, una casete de expresión en plantas contiene preferiblemente otras secuencias enlazadas operativamente como intensificadores de la traducción tales como la secuencia "overdrive" que contiene la secuencia conductora 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco que aumenta la ratio de polipéptido a RNA (Gallie *et al.*, 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión en plantas incluyen los detallados en: Becker, D. *et al.*, 1992 New plant binary vectors with

selectable markers located proximal to the left border, *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984 Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucl. Acid. Res.* 12:8711-8721; y Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, págs. 15-38.

- 5 La expresión de genes en plantas debería estar enlazada operativamente a un promotor apropiado que confiera la expresión génica de una manera oportuna, específica de la célula o el tejido. Promotores útiles en las casetes de expresión incluyen cualquier promotor que sea capaz de iniciar la transcripción en una célula de planta. Tales promotores incluyen, pero sin carácter limitante, aquéllos que pueden obtenerse de plantas, virus de plantas y bacterias que contienen genes que se expresan en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*.
- 10 El promotor puede ser constitutivo, inducible, preferido por etapa del desarrollo, preferido por tipo de célula, preferido por un tejido o preferido por un órgano. Los promotores constitutivos son activos en la mayoría de las condiciones. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores CaMV 19S y 35S (Odell *et al.* 1985 *Nature* 313:810-812), el promotor sX CaMV 35S (Kay *et al.* 1987 *Science* 236:1299-1302), el promotor Sep1, el promotor actina del arroz (McElroy *et al.* 1990 *Plant Cell* 2:163-171), el promotor actina de *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 del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor Smas (Velten *et al.* 1984 *EMBO J.* 3:2723-2730), el promotor GRP1-8, el promotor cinamil-alcohol-deshidrogenasa (Patente U.S. Núm. 5.683.439), los promotores del T-DNA de *Agrobacterium*, tales como manopina-sintasa, nopalina-sintasa, y octopina-sintasa, la subunidad pequeña del promotor ribulosa-bifosfato-carboxilasa (ssuRUBISCO), y análogos.
- 20 Los promotores inducibles son activos en ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque de patógenos, condiciones anaerobias, y análogas. Por ejemplo, el promotor hsp80 de *Brassica* es inducido por el choque térmico, el promotor PPKK es inducido por la luz, el promotor PR-1 por el tabaco, *Arabidopsis* y maíz son inducibles por infección con un patógeno, y el promotor Adh1 es inducido por hipoxia y estrés por frío. La expresión de genes vegetales puede ser facilitada también por un promotor inducible (para revisión véase Gatz, 1997 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea expresión de genes en un momento determinado. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (Solicitud PCT Núm. 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 Núm. WO 93/21334).
- 30 Los promotores preferidos por etapa del desarrollo se expresan preferentemente en ciertas etapas del desarrollo. Promotores preferidos de tejidos y órganos incluyen aquéllos que se expresan preferentemente en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas, o xilema. Ejemplos de promotores preferidos de tejidos y preferidos de órganos incluyen, pero sin carácter limitante, promotores preferidos de fruto, preferidos de óvulo, preferidos de tejido masculino, preferidos de semilla, preferidos de tegumentos, preferidos de tubérculo, preferidos de tallo, preferidos de pericarpio, y preferidos de hoja, preferidos de estigma, preferidos de polen, preferidos de antera, preferidos de pétalo, preferidos de sépalo, preferidos de pedicelo, preferidos de silicua, preferidos de pedúnculo, preferidos de raíz y análogos. Los promotores preferidos de semilla se expresan preferiblemente durante el desarrollo y/o la germinación de la semilla. Por ejemplo, los promotores preferidos de semilla pueden ser preferidos de embrión, preferidos de endospermo y preferidos de la cubierta de la semilla. Véase Thomson *et al.*, 1989 *BioEssays* 10:108.
- 35 Ejemplos de promotores preferidos de semilla incluyen, pero sin carácter limitante, celulosa-sintasa (celA), Cim1, gamma-zeína, globulina-1, zeína de 10 kD del maíz (cZ19B1) y análogos.
- 40 Otros promotores adecuados preferidos de tejido o preferidos de órgano incluyen el promotor del gen napín de la colza (Patente U.S. Núm. 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 Núm. WO 98/45461), el promotor faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente U.S. Núm. 5.504.200), el promotor Bce4 de *Brassica* (Solicitud PCT Núm. WO 91/13980) o el promotor B4 de legumina (LeB4; Baeumlein *et al.*, 1992 *Plant Journal*, 2(2):233-9), así como promotores que confieren expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Promotores adecuados que pueden citarse son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de la cebada (Solicitud PCT Núm. WO 95/15389 y Solicitud PCT Núm. WO 95/23230) o los descritos en la Solicitud PCT Núm.
- 50 WO 99/16890 (promotores del gen hordeína de la cebada, el gen glutelina del arroz, el gen orizina del arroz, el gen prolamina del arroz, el gen gliadina del trigo, el gen glutelina del trigo, el gen glutelina de la avena, el gen kasirina del sorgo y el gen secalina del centeno).
- Otros promotores útiles en las casetes de expresión incluyen, pero sin carácter limitante, el gen principal de la proteína de fijación de las clorofilas a/b, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor conglicina, el promotor napín, el promotor de lectina de soja, el promotor zeína de 15 kD del maíz, el promotor zeína de 22 kD, el promotor zeína de 27 kD, el promotor zeína g, los promotores céreo, shrunken 1, shrunken 2 y bronce, el promotor Zm13 (Patente U.S. Núm. 5.086.169), los promotores de poligalacturonasa (PG) del maíz (Patentes U.S. Núms.
- 55

5.412.085 y 5.545.546) y el promotor SGB6 (Patente U.S. Núm. 5.470.359), así como promotores sintéticos y otros promotores naturales.

5 Puede lograrse flexibilidad adicional en el control de la expresión de genes heterólogos en plantas utilizando dominios de fijación del DNA y elementos de respuesta de fuentes heterólogas (es decir, dominios de fijación de DNA de fuentes no vegetales). Un ejemplo de un dominio de fijación de DNA heterólogo de este tipo es el dominio de fijación de DNA LexA (Brent y Ptashne, 1985 Cell 43:729-736).

10 Otro aspecto se refiere a células hospedadoras en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante como se ha descrito arriba. Los términos "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se utilizan intercambiamente en esta memoria. Debe entenderse que dichos términos se refieren no sólo a la célula objeto  
 15 de un ejemplo sino que son aplicables también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Dado que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dichas progenies pueden no ser, de hecho, idénticas a la célula parental, pero se incluyen todavía dentro del alcance del término como se utiliza en esta memoria. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polinucleótido IMI puede expresarse en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células fúngicas, o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células de plantas, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

Una célula hospedadora tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo puede utilizarse para producir (es decir, expresar) un polinucleótido IMI.

20 De acuerdo con lo anterior, la presente memoria descriptiva describe adicionalmente métodos para producir polipéptidos IMI utilizando las células hospedadoras de la invención. En un aspecto, el método comprende cultivar la célula hospedadora (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido IMI, o en cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica un polipéptido de tipo salvaje o IMI) en un medio adecuado hasta que se produce el polipéptido IMI. En otro aspecto, el método comprende adicionalmente aislar  
 25 polipéptidos IMI del medio o la célula hospedadora. Otro aspecto se refiere a polipéptidos IMI aislados, y porciones biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o porción biológicamente activa del mismo está exento de algo del material celular cuando se produce por técnicas de DNA recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión lingüística "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos IMI en las cuales el polipéptido está separado de una parte de los componentes celulares de las células en las cuales se produce natural o recombinantemente. En un  
 30 aspecto, la expresión lingüística "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido IMI que tienen menos de aproximadamente 30% (referido a peso seco) de material distinto de IMI (a lo que se hace referencia también en esta memoria como un "polipéptido contaminante"), con mayor preferencia menos de aproximadamente 20% de material distinto de IMI, con mayor preferencia todavía menos de aproximadamente 10% de material distinto de IMI, y con preferencia máxima menos de aproximadamente 5% de material distinto de IMI.

35 Cuando el polipéptido IMI, o una porción biológicamente activa del mismo, se produce recombinantemente, el mismo está también con preferencia sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, con mayor preferencia menos de aproximadamente 10%, y con preferencia máxima menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación del polipéptido. La expresión lingüística "sustancialmente exento de precursores químicos y otros productos químicos" incluye preparaciones de polipéptido IMI en las cuales el polipéptido está separado de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de polipéptido. En un aspecto, la expresión lingüística "sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de un polipéptido IMI que tienen menos de  
 45 aproximadamente 30% (referido a peso seco) de precursores químicos o productos químicos distintos de IMI, con mayor preferencia menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o productos químicos distintos de IMI, con mayor preferencia todavía menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o productos químicos distintos de IMI, y con preferencia máxima menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o productos químicos distintos de IMI. En aspectos preferidos, los polipéptidos aislados, o porciones biológicamente activas de los mismos, carecen de polipéptidos contaminantes del mismo organismo del que se deriva el polipéptido IMI. Típicamente, tales polipéptidos se producen por expresión recombinante de, por ejemplo, un polipéptido IMI de *Triticum aestivum* en plantas distintas de *Triticum aestivum* o microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliados, algas u hongos.

55 El polinucleótido IMI de la invención y las secuencias polipeptídicas tienen una diversidad de usos. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos pueden utilizarse para transformar plantas, modulando con ello la resistencia de la planta a los herbicidas de imidazolinona. De acuerdo con ello, la invención proporciona un método de producción de una planta transgénica que tiene tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona que comprende, (a) transformar una célula vegetal con uno o más vectores de expresión que comprenden uno o más ácidos nucleicos

AHAS mutados, y (b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona comparada con una variedad de tipo salvaje de la planta, en donde al menos dos de los ácidos nucleicos AHAS mutados son como se define en la reivindicación 24. En una realización, los ácidos nucleicos IMI múltiples se derivan de genomas diferentes.

5 La presente invención incluye métodos de modificación de la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona que comprende modificar la expresión de uno o más ácidos nucleicos IMI de acuerdo con el método de la reivindicación 23. Preferiblemente, los ácidos nucleicos están localizados en o se derivan de genomas diferentes. La resistencia de la planta al herbicida de imidazolinona puede aumentarse o reducirse como se logra por  
 10 aumento o disminución de la expresión de un polinucleótido IMI, respectivamente. Preferiblemente, la resistencia a la planta al herbicida de imidazolinona se incrementa por aumento de la expresión de un polinucleótido IMI. La expresión de un polinucleótido IMI puede modificarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Pueden utilizarse métodos para aumentar la expresión de polinucleótidos IMI en los cuales la planta es transgénica o no transgénica. En los casos en que la planta es transgénica, la planta puede transformarse con un vector que contenga cualquiera de los ácidos nucleicos codificantes de IMI arriba descritos, o la planta puede transformarse con  
 15 un promotor que dirige la expresión de polinucleótidos IMI endógenos en la planta, por ejemplo. La invención estipula que un promotor de este tipo puede ser específico de tejido o estar regulado por el desarrollo. Alternativamente, las plantas no transgénicas pueden tener la expresión de polinucleótidos IMI endógenos modificada por inducción de un promotor nativo. La expresión de polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5 en las plantas diana puede conseguirse, pero sin carácter limitante, por uno de los  
 20 ejemplos siguientes: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducido por productos químicos, y (c) sobreexpresión de un promotor modificado por ingeniería genética con, por ejemplo, factores de transcripción derivados de dedos de cinc (Greisman y Pabo, 1997 Science 275:657).

En una realización preferida, la transcripción del polinucleótido IMI se modula utilizando factores de transcripción derivados de dedos de cinc (ZFPs) como se describe en Greisman y Pabo, 1997 Science 275:657 y fabricados por  
 25 Sangamo Biosciences, Inc. Estos ZFPs comprenden a la vez un dominio de reconocimiento de DNA y un dominio funcional que causa activación o represión de un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico IMI. A este fin, pueden crearse ZFPs activadores y represores que reconocen específicamente los promotores de polinucleótidos IMI arriba descritos y utilizarse para aumentar o reducir la expresión de los polinucleótidos IMI en una planta, modulando con ello la resistencia de la planta a los herbicidas.

30 Como se describe con mayor detalle anteriormente, las plantas producidas por los métodos de la presente invención pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas pueden seleccionarse de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimiento, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de  
 35 Sálix, palma de aceite, cocotero, grama perenne y cosechas forrajeras, por ejemplo. En una realización preferida, la planta es una planta de trigo. Cosechas forrajeras incluyen, pero sin carácter limitante, grama oficial, alpiste, bromo, centeno silvestre, grama azul, grama de huerto, alfalfa, salfoina, trébol de pata de pájaro, trébol híbrido, trébol rojo y meliloto. En una realización preferida, la planta es una planta de trigo. En cada uno de los métodos arriba descritos, la célula vegetal incluye, pero sin carácter limitante, un protoplasto, una célula productora de gametos, y una célula que se regenera en una planta entera. Como se utiliza en esta memoria, el término  
 40 "transgénico" hace referencia a cualquier planta, célula de planta, callo, tejido de planta o parte de planta, que contiene la totalidad o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, la totalidad o parte del polinucleótido recombinante está integrada de manera estable en un cromosoma o elemento extracromosómico estable, de tal modo que el mismo se transmite a generaciones sucesivas.

Como se ha descrito arriba, la presente invención da a conocer composiciones y métodos para aumentar la  
 45 resistencia a la imidazolinona de una planta o semilla de trigo en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta o semilla. En una realización preferida, la resistencia a la imidazolinona de una planta o semilla de trigo se incrementa de tal modo que la planta o semilla puede resistir una aplicación de herbicida de imidazolinona de, con preferencia, aproximadamente 10-400 g i.a. ha<sup>-1</sup>, más preferiblemente 20-160 g i.a. ha<sup>-1</sup>, y con preferencia máxima 40-80 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Como se utiliza en esta memoria, "resistir" la aplicación de un herbicida significa que la planta no se  
 50 destruye ni se deteriora por dicha aplicación.

Se describe adicionalmente en esta memoria un método de control de las malezas cercanas a una planta de trigo, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de trigo, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada al herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta de trigo, y en donde la planta comprende uno o más ácidos nucleicos IMI. En un aspecto, la planta  
 55 comprende ácidos nucleicos IMI múltiples localizados en o derivados de genomas diferentes. En otro aspecto, la planta comprende un ácido nucleico distinto de lmi1. Por el hecho de proporcionar plantas de trigo que exhiben resistencia incrementada a la imidazolinona, puede emplearse una gran diversidad de formulaciones para proteger las plantas de trigo contra las malezas, a fin de mejorar el crecimiento de la planta y reducir la competencia por los nutrientes. Puede utilizarse un herbicida de imidazolinona en sí mismo para control de las malezas antes del brote,

- después del brote, antes de la plantación y durante la plantación en áreas situadas alrededor de las plantas de trigo descritas en esta memoria, o puede utilizarse una formulación de herbicida de imidazolinona que contiene otros aditivos. El herbicida de imidazolinona puede utilizarse también como tratamiento de semillas. Los aditivos que se encuentran en una formulación herbicida de imidazolinona incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de propagación, agentes adherentes, agentes estabilizadores o análogos. La formulación herbicida de imidazolinona puede ser una preparación húmeda o seca y puede incluir, pero sin carácter limitante, polvos fluidificables, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida de imidazolinona y las formulaciones herbicidas pueden aplicarse de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo por rociado por aspersión, irrigación, espolvoreo o análogos.
- 10 Debe entenderse también que lo que antecede se refiere a realizaciones preferidas de la presente invención y que pueden hacerse numerosos cambios en ella sin desviarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse en modo alguno como limitantes.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### 15 *Mutagénesis y Selección de Líneas de Trigo Gunner Resistentes*

La cepa resistente a imidazolinona se obtuvo por mutación y selección y generación convencionales. La mutagénesis inicial de la semilla se condujo como sigue:

1. Semillas de la variedad de trigo duro rojo de primavera Gunner se remojaron previamente en agua del grifo.
- 20 2. Después de decantar el agua del grifo, se añadió por vertido una solución de sulfonato de etilmetano (EMS) al 0,03% y sulfato de dietilo (DES) al 0,02% en el recipiente de las semillas. El recipiente se agitó tras 10-15 minutos durante el curso de un tratamiento de 2 horas.
3. La solución en EMS y DES se decantó y se añadió una solución de azida de sodio al 0,02% en tampón de fosfato 0,001 M.
- 25 4. Se repitió el paso 3.
5. Las semillas se enjuagaron en agua del grifo y se secaron. Después del secado, se plantaron las semillas.
6. Las semillas plantadas representaban la generación M1. La semilla cosechada de las plantas M1 representaba la generación M2.
- 30 Se plantaron las semillas M2 y las plantas que brotaron se trataron con el herbicida imazamox aproximadamente en la etapa 2-3 hojas a tasas que podrían destruir el trigo sensible. Se seleccionaron un total de nueve plantas tolerantes al herbicida y se plantaron de nuevo en un invernadero. Se recogieron semillas de la progenie de cada una de las nueve plantas. Esta semilla se plantó en un invernadero. Se rociaron por aspersión las plantas con el herbicida imazamox a 80 g i.a./ha.+1,0% de adyuvante Sun-It (v/v) y se evaluaron respecto a tolerancia. Un total de doce plantas de dos líneas, designadas HRS198205 y HRS198208, se identificaron como muy tolerantes. La segregación respecto a tolerancia al herbicida en cada línea era coherente con un solo gen semi-dominante. Se recogieron semillas de la progenie de las 24 plantas y se replantaron en un invernadero para evaluación y selección posteriores. Las plantas se rociaron por aspersión con el herbicida imazamox a 80 g i.a./ha.+1,0% de adyuvante Sun-It (v/v) dando como resultado la identificación de sub-líneas que exhibían el nivel máximo de tolerancia.
- 40 Adicionalmente, se determinó que las sub-líneas tenían las características fenotípicas de Gunner.

Se recogieron semillas de la progenie de HRS198205 y HRS198208 y se plantaron en el campo. Se rociaron por aspersión parcelas de campo con el herbicida imazamox a 80 g i.a./ha.+1,0% de adyuvante Sun-It (v/v). Todas las plantas de cada línea exhibían el mismo nivel de tolerancia aceptable al herbicida imazamox. Basándose en estos resultados, semillas cosechadas de las parcelas de cinco de las sub-líneas HRS198205 se combinaron en un solo lote que se designó AP205CL (al que se hace referencia anteriormente como Gunner IMI 205). Adicionalmente, las semillas cosechadas de parcelas de cinco de las sublíneas HRS198208 se combinaron en un solo lote que se designó AP202CL (al que se hace referencia anteriormente como Gunner IMI 208). Se generaron progenies de semillas en varias localizaciones. Todas las progenies de semillas se rociaron por aspersión con el herbicida imazamox a 40 g i.a./ha.+0,25% (v/v) de un agente tensioactivo no iónico. No se observó planta alguna sensible al herbicida. Adicionalmente, todas las plantas eran comparables a las plantas de la variedad Gunner.

### EJEMPLO 2

#### *Mutagénesis y Selección de Líneas de Trigo Madsen Resistentes*

55 Semillas de la variedad de trigo de invierno blando blanco Madsen se remojaron previamente en agua del grifo. Después de decantar el agua del grifo, se vertió en el recipiente de las semillas una solución de EMS al 0,03% y DES al 0,02%. El recipiente se agitó cada 10-15 minutos durante el curso de un tratamiento de 2 horas. La solución

en EMS y DES se decantó y se añadió una solución de azida de sodio al 0,02% en tampón de fosfato 0,001 M. El recipiente se agitó de nuevo cada 10-15 minutos durante el curso de un tratamiento de 2 horas. Las semillas se enjuagaron luego en agua del grifo y se secaron. Después del secado, se plantaron las semillas. Las semillas plantadas representaban la generación M1. Se dejó que las plantas M1 se autopolinizaran y se cosecharon las semillas M<sub>2</sub> como un todo. Se plantaron aproximadamente 0,2 hectáreas de semillas M<sub>2</sub> en el campo y las plantas resultantes se trataron con una tasa de imazamox de 40 g/i.a./ha. Se identificaron doce plantas M<sub>2</sub> como tolerantes. Estas plantas se extrajeron, y se enviaron a Pullman, WA para vernalización y producción de semillas M<sub>3</sub>. Las semillas M<sub>3</sub> de cada una de las plantas M<sub>2</sub> se plantaron en el invernadero y las plantas resultantes de vernalizaron durante 8 semanas, y se trataron luego con 80 g i.a./ha de imazamox. Las plantas se seleccionaron sobre la base de los niveles de tolerancia observados y se plantaron de nuevo en tiestos para producción de semillas. La línea M<sub>2:3</sub> designada Madsen 1 se seleccionó como tolerante a 40 g/ha imazamox al igual que una M<sub>2</sub> se confirmó como tolerante a imazamox a la tasa de 80 g/ha aplicada a la progenie M<sub>3</sub>. La caracterización molecular subsiguiente determinó que Madsen 1 tenía una mutación en el gen *Als2* de AHAS conocido por conferir tolerancia a los herbicidas de imidazolinona.

### 15 EJEMPLO 3

#### *Tolerancia de las Plantas de Trigo AP205CL y AP602CL a los Herbicidas de Imidazolinona*

Tanto las plantas de trigo AP205CL como las AP602CL son tolerantes a los herbicidas de imidazolinona debido a una mutación de la enzima AHAS que es resistente a la inhibición por estos herbicidas *in vitro*. Esto se demuestra por comparación de la actividad de la enzima AHAS extraída de trigo de tipo salvaje con la actividad de AHAS extraída de las plantas AP205CL (Figura 5A) y las plantas AP602CL (Figura 5B) tolerantes a los herbicidas. Los valores de la Figura 4 se expresan como porcentaje de actividad no inhibida. La enzima AHAS del trigo Gunner de tipo salvaje exhibe una reducción de 1 a 35% de la actividad en presencia de una baja concentración (1M) del herbicida de imidazolinona imazamox. Esta actividad continúa disminuyendo hasta cerca de 100% de inhibición de la enzima para concentraciones mayores de herbicida (100 M). En contraste, la enzima AHAS extraída de las plantas AP205CL tolerantes al herbicida retiene aproximadamente 90% de su actividad a la concentración de imazamox 1 M, y aproximadamente un tercio de su actividad a las concentraciones mayores (50 M a 100 M). La enzima AHAS extraída de las plantas AP602CL tolerantes al herbicida retiene aproximadamente 80-100% de su actividad a la concentración 1 M de imazamox, y cerca de la mitad de su actividad a las concentraciones mayores (50 M a 100 M). Estos niveles de actividad son suficientes para permitir que las plantas de trigo tolerantes sobrevivan a la aplicación de imazamox, como se observó durante el proceso de selección (Ejemplo 1).

### EJEMPLO 4

#### *Tolerancia de las Plantas de Trigo Madsen a los Herbicidas de Imidazolinona*

Se evaluó Madsen1 en cuanto a tolerancia al herbicida de imidazolinona imazamox a 40 y 80 g/ha en una prueba de invernadero. Como control se utilizó la variedad cultivada de trigo sensible Teal. La evaluación se realizó 14 días después del tratamiento. El deterioro se registró en una escala de 0 a 9, representando 0 ausencia de deterioro y representando 9 la muerte de la planta. Los datos presentados en la Figura 6A demuestran que Madsen1 exhibía tolerancia a imazamox.

Dado que la tolerancia en Madsen1 es debida a una mutación en la enzima AHAS que la hace resistente a la inhibición por los herbicidas de imidazolinona, la actividad *in vitro* de AHAS extraída de las plantas de tipo salvaje (que no tenían la mutación para tolerancia) puede compararse con la actividad *in vitro* de AHAS extraída de plantas tolerantes en presencia de concentraciones variables de un herbicida de imidazolinona (IMI). Se comparó Madsen1 con la variedad de tipo salvaje Madsen. Los resultados se muestran en la Figura 6B. La Figura 6B demuestra que, a medida que aumenta la concentración de imazamox, la actividad de la enzima AHAS no inhibida disminuía más rápidamente en las líneas de tipo salvaje que en Madsen1. Para imazamox 100 µM, la AHAS no inhibida residual es suficiente para proporcionar una respuesta tolerante al herbicida en Madsen1.

### EJEMPLO 4

#### *Retroinhibición de la Actividad de la Enzima AHAS por Leucina y Valina*

Es sabido que AHAS es retroinhibida por los aminoácidos de cadena ramificada. Valina y leucina en combinación son inhibidores especialmente eficaces. Cuando se examinaron, las enzimas AHAS extraídas de la variedad de tipo salvaje Gunner, AP205CL y AP602CL exhibían todas ellas patrones de inhibición comparables por la combinación de valina y leucina (Figuras 7A y 7B).

## REIVINDICACIONES

1. Una planta de trigo que comprende ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, y (I) en donde al menos dos de los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples se seleccionan del grupo constituido por:
- 5
- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;
  - b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;
  - c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;
  - d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y
  - e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);
- 10 o (II) en donde dichos al menos dos ácidos nucleicos AHAS mutados comprenden una combinación seleccionada del grupo constituido por:
- f) combinaciones de (i) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 y (ii) polinucleótidos que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5;
  - g) combinaciones de (i) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 2 y (ii) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; y
  - h) combinaciones de polinucleótidos complementarios para cualquier combinación de polinucleótidos de f) hasta g); y
- 15
- 20 donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta h) codifica una proteína AHAS.
2. La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde uno de los ácidos nucleicos AHAS mutados comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1.
3. La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde uno de los ácidos nucleicos AHAS mutados comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3.
- 25 4. La planta de trigo de la reivindicación 1, en donde uno de los ácidos nucleicos AHAS mutados comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 5.
5. La planta de trigo de la reivindicación 1, que comprende dos ácidos nucleicos AHAS mutados.
6. La planta de trigo de la reivindicación 1, que comprende tres ácidos nucleicos AHAS mutados.
7. La planta de trigo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la planta no es transgénica.
- 30 8. La planta de trigo de la reivindicación 7, en donde la planta es una progenie generada a partir de la planta de una cualquiera de las líneas Gunner 205, Gunner 208, o Madsen IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de la semilla de cada línea respectivamente con la ATCC bajo el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4213, PTA-4214, PTA-4255; en donde la planta de la progenie comprende los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples.
- 35 9. Una parte de planta de la planta de trigo de la reivindicación 1, en donde la parte de planta comprende los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples.
10. Una célula vegetal de la planta de trigo de la reivindicación 1, en donde la célula vegetal comprende los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples.
11. Una semilla producida por la planta de trigo de la reivindicación 1, en donde la semilla comprende los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples.
- 40 12. Una planta de trigo que comprende un ácido nucleico AHAS mutado, en donde la planta de trigo exhibe resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona comparada con una variedad de tipo salvaje de la planta, y en donde el ácido nucleico AHAS mutado se selecciona del grupo constituido por:
- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;
  - b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;
  - c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;
  - d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y
  - e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);
- 45 en donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta e) codifica una proteína AHAS.
- 50 13. La planta de trigo de la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico AHAS mutado comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3.

14. La planta de trigo de la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico AHAS mutado comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 5.
15. Una parte de planta de la planta de trigo de la reivindicación 12, en donde la parte de planta comprende el ácido nucleico AHAS mutado.
- 5 16. Una célula vegetal de la planta de trigo de la reivindicación 12, en donde la célula vegetal comprende el ácido nucleico AHAS mutado.
17. Una semilla producida por la planta de trigo de la reivindicación 12, en donde la semilla comprende el ácido nucleico AHAS mutado.
18. La planta de trigo de la reivindicación 12, la planta no es transgénica.
- 10 19. La planta de trigo de la reivindicación 18, en donde la planta es una progenie generada a partir de la planta de una cualquiera de las líneas Gunner 208, o Madsen IMI, habiéndose depositado respectivamente una muestra representativa de la semilla de cada línea con la ATCC bajo el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4214 o PTA-4255; en donde la planta de la progenie comprende el ácido nucleico AHAS mutado.
- 15 20. Un ácido nucleico AHAS mutado aislado, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:
- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;
- b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;
- c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;
- d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y
- 20 e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);  
en donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta e) codifica una proteína AHAS.
21. El ácido nucleico AHAS mutado aislado de la reivindicación 20, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 3.
- 25 22. El ácido nucleico AHAS mutado aislado de la reivindicación 20, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 5.
23. Un método de modificación de la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona que comprende modificar la expresión de ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples, en donde al menos dos de los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples se seleccionan del grupo constituido por:
- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;
- 30 b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;
- c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;
- d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y
- e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);
- 35 o (II) en donde dichos al menos dos ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples comprenden una combinación seleccionada del grupo constituido por:
- f) combinaciones de (i) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 y (ii) polinucleótidos que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5;
- g) combinaciones de (i) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 2 y (ii) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; y
- 40 h) combinaciones de polinucleótidos complementarios para cualquier combinación de polinucleótidos de f) hasta g); y  
en donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta h) codifica una proteína AHAS.
24. Un método de producción de una planta transgénica que exhibe resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona que comprende:
- i) transformar una célula de la planta con uno o más vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos AHAS mutados; y
- ii) generar a partir de la célula de la planta una planta transgénica con resistencia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta;
- 50 en donde al menos dos de los ácidos nucleicos AHAS mutados múltiples se seleccionan del grupo constituido por:
- a) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 3;

- b) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 5;  
 c) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 4;  
 d) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 6; y  
 e) polinucleótidos complementarios para cualquier polinucleótido de a) hasta d);  
 5 o (II) en donde dichos al menos dos ácidos nucleicos AHAS mutados comprenden una combinación seleccionada del grupo constituido por:  
 f) combinaciones de (i) polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 1 y (ii) polinucleótidos que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5;  
 g) combinaciones de (i) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda SEQ ID NO: 2  
 10 y (ii) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que comprenda cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; y  
 h) combinaciones de polinucleótidos complementarios para cualquier combinación de polinucleótidos de f) hasta g); y  
 en donde cada uno de los polinucleótidos de a) hasta h) codifica una proteína AHAS.
- 15 25. Una planta de trigo que comprende, en su locus Als2, un ácido nucleico Imi que codifica un polipéptido IMI que comprende una mutación en el Dominio E que da como resultado una sustitución de serina a asparagina en la proteína IMI en comparación con una proteína AHAS de tipo salvaje, en donde el ácido nucleico Imi confiere a la planta tolerancia incrementada a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, y en donde la planta de trigo es una progenie generada a partir de una planta de una cualquiera de las líneas Gunner 208 o Madsen IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semillas de cada línea con la ATCC bajo el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4214 o PTA-4255, respectivamente, y dicho ácido nucleico Imi se obtiene con ello a partir de una cualquiera de dichas líneas, respectivamente.
- 20 26. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico Imi es una secuencia de polinucleótidos Imi2 que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos 90% con una secuencia entera de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
27. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico Imi es una secuencia de polinucleótidos Imi2 que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos 95% con una secuencia entera de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
28. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico Imi es una secuencia de polinucleótidos Imi2 que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia entera de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
- 30 29. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico Imi es una secuencia de polinucleótidos Imi2 que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
- 35 30. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico Imi comprende un polinucleótido de Imi2 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.
31. La planta de trigo de la reivindicación 25, en donde la planta es una planta recombinante o modificada por ingeniería genética, preparada a partir de una planta de una cualquiera de las líneas Gunner 208, o Madsen IMI, habiéndose depositado una muestra representativa de semilla de cada línea con la ATCC bajo el Número de Designación en el Depósito de Patentes PTA-4214 o PTA-4255, respectivamente.
- 40 32. Un ácido nucleico AHAS mutado aislado, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido
- a) que se selecciona del grupo constituido por:
- 45 i) polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido que tiene una identidad de al menos 90% con una secuencia entera de aminoácidos representada en cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, en donde el polipéptido comprende una sustitución de serina a asparagina en el Dominio E comparado con una proteína AHAS de tipo salvaje y en donde el polipéptido confiere resistencia incrementada a imidazolinona a una planta, célula de planta, parte de planta, semilla de planta o tejido de planta cuando el polipéptido se expresa en los mismos; y
- 50 ii) polinucleótidos complementarios para los mismos; y
- b) codifica una proteína AHAS.
33. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32, en donde dicho polipéptido codificado tiene una identidad de al menos 95% con dicha secuencia entera de aminoácidos.
34. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32, en donde dicho polipéptido codificado tiene una identidad de al menos 99% con dicha secuencia entera de aminoácidos.

35. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32, en donde dicho polipéptido codificado comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

36. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32, en donde los polinucleótidos de dicho grupo (i) comprenden la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

5

# ES 2 417 012 T3

Figura 1 A

Secuencia parcial de nucleótidos de Gunner IMI1 205 (SEQ ID NO:1)

```
(3)   TGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGT
(51)  AGTTTCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAGAACCT
(101) CCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGC
(151) AGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTTGGC
(201) AACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAA
(251) AGGATTCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTG
(301) CAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATC
(351) ATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACGGTGGTGC
(401) TTTCAAGGACAT (412)
```

Figura 1 B

Secuencia parcial de aminoácidos deducida de Gunner IMI1 205 (SEQ ID NO:2)

```
(1)   AQYYTYKRPRQWLSSSGLGAMGFLPAAAGAAVANPGVTVVVDIDGDGSFL
(51)  MNIQELALIRIENLPVKVMI LNNQHLMVQWEDRFYKANRAHTYLG NPE
(101) NESEIYPDFVTIAKGFNVPVAVRVTKKSEVTAAIKKMLETPGPYLLDI IVP
(151) HQEHLPMIPNGGAFKDM
```

# ES 2 417 012 T3

Figura 2 A

Secuencia parcial de nucleótidos de Gunner IMI2 208 (SEQ ID NO:3)

(3) GCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCAT  
(51) CCGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCT  
(101) GTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT  
(151) CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAG  
(201) TGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGG  
(251) GAGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCC  
(301) AGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT  
(351) TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCA  
(401) ATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGT  
(451) CCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACGGTGGTGGCTTTTA  
(501) AGGACATGATCC (512)

Figura 2 B

Secuencia parcial de aminoácidos deducida de Gunner IMI2 208 (SEQ ID NO:4)

(1) AQYYTYKRPRQWLSSSGLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSF  
(50) LMNIQELALIRIENLPVKVMILNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNP  
(100) ENESEIYPDFVTIAKGFNVPVAVRVTKKSEVTAAIKKMLETPGPYLLDIIV  
(150) PHQEHVLPMPINGGAFKDM

# ES 2 417 012 T3

Figura 3 A

Secuencia parcial de nucleótidos de Madsen IMI2 (SEQ ID NO:5)

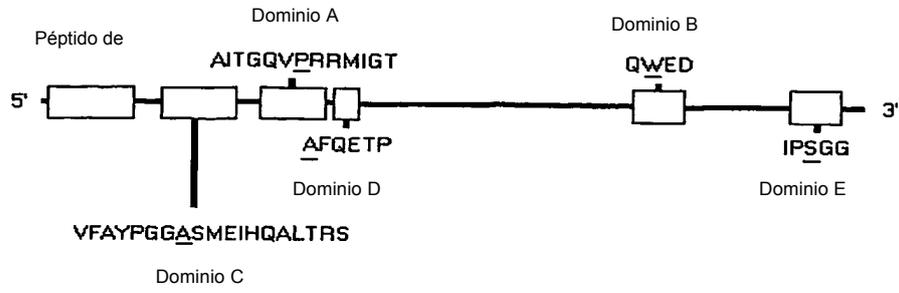
```
(3)      GGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCATC
(51)     CGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTG
(101)    TGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTC
(151)    CTCATGAACATTACAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCCTCCAGT
(201)    GAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGG
(251)    AGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCA
(301)    GAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
(351)    CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAA
(401)    TCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTGTC
(451)    CCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACGGTGGTGTCTTTTAA
```

Figura 3 B

Secuencia parcial de aminoácidos deducida de Madsen IMI2 (SEQ ID NO:6)

```
(1)      AQYYTYKRPRQWLSSSGLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSF
(51)     LMNIQELALIRIENLPVKVMILNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNP
(101)    ENESEIYPDFVTIAKGFNVPVRVTKKSEVTAAIKKMLETPGPYLLDIIV
(151)    PHQEHVLEMPIPNGGAFKDM
```

Figura 4



# ES 2 417 012 T3

Figura 5 A

Inhibición de la Actividad de la Enzima AHAS en trigo de tipo salvaje (variedad Gunner) y AP205CL

Conc. de imazamox (µM)	Gunner tipo salvaje	AP205CL
100.0	4	28
50.0	7	36
25.0	8	37
13.0	12	41
6.0	19	47
3.0	34	58
2.0	53	70
1.0	77	87

Figura 5 B

Inhibición de la Actividad de la Enzima AHAS en trigo de tipo salvaje (variedad Gunner) y AP602CL

Conc. de imazamox (µM)	Gunner tipo salvaje	AP602CL
100.0	15.1	43.5
50.0	16.5	46.3
25.0	25.4	49.6
12.5	43.4	53.7
6.3	59.6	61.9
3.1	83.6	71.8
1.6	99.8	84.3

Figura 5 C

Inhibición de la Actividad de la Enzima AHAS en trigo de tipo salvaje (variedad Madsen) y Madsen1

µM de Herbicida IMI	Actividad de AHAS no Inhibida , %	
	Madsen Tipo Salvaje Madsen w 1	Madsen1
100.0	0.0	22.2
50.0	1.7	24.5
25.0	2.7	25.3
12.5	6.0	27.7
6.3	12.0	34.8
3.1	25.4	42.0
1.6	42.3	53.6
0.8	64.2	72.2

Figura 6

Disminución de la Lesión de Madsen1 por imazamox Comparada con el Control de Trigo Teal

Cultivar de Trigo	Registro de Lesión	
	imazamox 40 g/ha	imazamox 80 g/ha
<b>Madsen1</b>	<b>3.3</b>	<b>5.1</b>
Control de Teal	<b>8.9</b>	<b>9.0</b>

Figura 7 A

Retroinhibición de la Actividad de la Enzima AHAS por Leucina y Valina en Trigo de Tipo Salvaje (variedad Gunner) y AP205CL

Conc. de Leucina y Valina ( $\mu\text{M}$ )	Gunner Tipo Salvaje	AP205CL
1000.0	42	44
500.0	48	48
250.0	56	50
125.0	65	58
63.0	75	70
31.3	83	82
15.6	92	90
7.8	98	95

Figura 7 B

Retroinhibición de la Actividad de la Enzima AHAS por Leucina y Valina en Trigo de Tipo Salvaje (variedad Gunner) y AP602CL

Conc. de Leucina y Valina ( $\mu\text{M}$ )	Gunner Tipo Salvaje	AP602CL
1000.0	46.9	48.7
500.0	53.6	49.4
250.0	65.9	56.7
125.0	74.5	68.2
63.0	82.4	79.5
31.3	89.3	86.6
15.6	98.6	93.1
7.8	102.8	98.7