

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 118**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08705880 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2114125**

54 Título: **Sorgo resistente a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa**

30 Prioridad:

12.01.2007 US 880125 P

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

17.02.2014

73 Titular/es:

**KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
2005 RESEARCH PARK CIRCLE, SUITE 105
MANHATTAN, KS 66502-5020, US**

72 Inventor/es:

**TUINSTR, MITCHELL R. y
AL-KHATIB, KASSIM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 443 118 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

Sorgo resistente a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de patentes de Estados Unidos N° 60/880.125 presentada el 12 de enero de 2007.

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para producir plantas de cultivo que sean resistentes a los herbicidas. En particular, la presente invención proporciona plantas de sorgo, tejidos vegetales y semillas de plantas que contienen genes y proteínas alterados de acetil-CoA-carboxilasa (ACC) que son resistentes a la inhibición por herbicidas que inhiben normalmente la actividad de la proteína ACC.

10 Antecedentes de la invención

El sorgo es el segundo grano de cereales para piensos más importante cultivado en Estados Unidos. La producción es económicamente fundamental para granjas situadas en zonas de escasa pluviosidad debido a la capacidad del sorgo para tolerar la sequía y el calor. Tanto las industrias ganaderas como de bio-energía utilizan sorgo como sustrato energético, convirtiéndolo así en un cultivo versátil.

15 A nivel mundial, el sorgo es el quinto grano de cereal en importancia. Como tolera tanto la sequía como el calor, es fácilmente el grano para piensos más ampliamente cultivado en las regiones semiáridas del África subsahariana y en la región peninsular central seca de la India. Como tal, el sorgo se utiliza para consumo humano en la mayoría de las regiones más secas del mundo, convirtiéndose por ello en un cultivo alimentario fundamentalmente importante en estos lugares.

20 El desarrollo de resistencia a herbicidas en las plantas ofrece ventajas significativas de producción y económicas; en este sentido, el uso de herbicidas inhibidores de controlar malas hierbas o plantas en los cultivos se ha convertido en una práctica casi universal. Sin embargo, la aplicación de dichos herbicidas también puede dar como resultado la muerte o la reducción del crecimiento de la planta de cultivo deseada, haciendo que el tiempo y el método de aplicación de herbicidas sean críticos o en algunos casos inviables.

25 De particular interés para los agricultores es el uso de herbicidas con mayor potencia, eficacia de amplio espectro para malas hierbas y rápida degradación en el suelo. Las plantas, los tejidos vegetales y las semillas con resistencia a estos compuestos proporcionarían una solución atractiva al permitir la utilización de herbicidas inhibidores de controlar el crecimiento de malas hierbas, sin riesgo de daño al cultivo. Una de dichas clases de herbicidas de amplio espectro son los compuestos que inhiben la actividad de la enzima acetil-CoA-carboxilasa (ACC) en una planta. Estos herbicidas están incluidos en las familias químicas ariloxifenoxipropionato (FOP) y ciclohexanodiona (DIM). Por ejemplo, el sorgo es sensible a muchos herbicidas inhibidores de ACC que tienen como objetivo las especies monocotiledóneas, haciendo que el uso de estos herbicidas inhibidores de controlar las malas hierbas gramíneas sea casi imposible.

35 Se ha encontrado que ciertas especies de malas hierbas gramíneas presentan una sensibilidad alterada a los herbicidas FOP y DIM. Una especie de gramínea, la cola de zorra (*A. myosuroides* [Huds.]), es una de las principales malas hierbas gramíneas en Europa. Se han encontrado varias mutaciones en el genoma de algunas plantas de cola de zorra que le confieren resistencia a algunos, pero no a todos, los herbicidas FOP y DIM (Délye, et al., 2005, *Plant Phys.* 137:794-806; Délye, et al., 2002, *Theor. Appl. Genet.* 104:1114-1120). Se encontraron hallazgos similares en malas hierbas gramíneas mutantes como ballico anual (*L. rigidum* [Gaud.]; Délye, et al., 2002, *Pest Manag. Sci.* 58:474-478), almorejo (*S. viridis* [L. Beauv.]; Zhang and Devine, 2000, *Weed Sci. Soc. Am.* 40:33; Délye, et al., 2002, *Planta* 214:421-427) y avena loca (*A. fatua* [L.]; Christoffers et al., 2002, *Genome* 45:1049-1056). Un híbrido de maíz resistente a los herbicidas (DK592 de Dekalb) tiene una mutación en la enzima ACC similar a la encontrada en las malas hierbas gramíneas (Zagnitko et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:6617-22).

45 Debido a la importancia del sorgo como planta de cultivo en el ámbito mundial, lo que se necesita son híbridos de sorgo que sean resistentes a los efectos inhibidores de los herbicidas inhibidores de ACC, permitiendo con ello un mayor rendimiento de los cultivos cuando se usan estos herbicidas inhibidores de controlar las malas hierbas gramíneas.

Sumario de la invención

50 En la presente memoria se describen composiciones y métodos para producir variedades cultivadas de sorgo que son resistentes a los herbicidas. En particular, en la presente memoria se describen plantas de sorgo, tejidos vegetales y semillas de plantas que contienen genes y proteínas alterados de acetil-CoA-carboxilasa (ACC) que son resistentes a la inhibición por herbicidas que inhiben normalmente la actividad de la proteína ACC.

El sorgo cultivado [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es sensible a muchos herbicidas que inhiben la ACC que tienen como objetivo las especies de malas hierbas monocotiledóneas o gramíneas. Sin embargo, como se describe en la

presente memoria se encontró un genotipo de sorgo que presenta tolerancia a los herbicidas inhibidores de ACC. El análisis genético ha identificado diferencias genéticas dentro de un germoplasma de sorgo silvestre que da como resultado un fenotipo de resistencia a herbicidas inhibidores de ACC.

Las realizaciones de la presente invención son como se definen en las reivindicaciones.

- 5 En particular, la presente invención se refiere a un híbrido de sorgo en el que el germoplasma de dicho híbrido de sorgo confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a niveles de dichos uno o más herbicidas que inhibirían normalmente el crecimiento de un híbrido de sorgo, en el que dicho germoplasma de dicho híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa comprende:
- 10 (i) una secuencia que tiene una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO:1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO:1; o
- (ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.
- 15 La presente invención se refiere también a un método para controlar malas hierbas en la proximidad del híbrido de sorgo de la invención, que comprende:
- a) proporcionar uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones,
- b) aplicar dicho uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a un campo que contiene dicho híbrido de sorgo, y
- 20 c) controlar las malas hierbas en la proximidad de dicho híbrido de sorgo tal que el crecimiento de las malas hierbas se vea afectado adversamente por la aplicación de dicho uno o más herbicidas y el crecimiento de dicho híbrido de sorgo no se vea afectado adversamente.
- La presente invención se refiere también a un método para producir una línea de plantas de híbrido de sorgo resistente a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, que comprende:
- 25 a) identificar un germoplasma que confiere dicha resistencia a los herbicidas, en el que dicho germoplasma resistente a los herbicidas procede de un híbrido de sorgo de la invención resistente a herbicidas; y
- b) introducir dicho germoplasma en una línea de plantas de sorgo de élite por transformación.
- La presente invención se refiere también a un método para la identificación de líneas de plantas de sorgo resistentes a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, que comprende:
- 30 a) suministrar una muestra de ácido nucleico a partir de una planta de sorgo, en el que dicha muestra de ácido nucleico comprende:
- 35 (i) una secuencia que tiene una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO:1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO:1; o
- (ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034,
- b) proporcionar cebadores de amplificación para amplificar una región de una planta de sorgo que corresponde a un gen de acetil-CoA-carboxilasa presente en dicha muestra de ácidos nucleicos,
- 40 c) aplicar dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácidos nucleicos, de tal modo que se produzca la amplificación de dicha región de dicho gen de acetil-CoA-carboxilasa, y
- d) identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa basándose en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa presentes en dicha muestra de ácidos nucleicos amplificados.
- 45 La presente invención se refiere también a una semilla, tejido vegetal o parte de una planta del híbrido de sorgo de la invención en la que dicha semilla, tejido vegetal o parte de una planta, comprende:
- (i) una secuencia que tiene una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO:1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO:1; o

(ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.

En una realización, la presente invención proporciona una o más plantas de sorgo cuyo germoplasma comprende una mutación de la invención que hace a la planta tolerante a los herbicidas inhibidores de ACC.

5 Por otra parte, en otras realizaciones la invención se refiere a la descendencia (por ejemplo, F1, F2, F3, etc.) de un cruce de dicha planta en el que el germoplasma de dicha descendencia tiene la misma mutación que la planta progenitora. Por tanto, las realizaciones de la presente invención proporcionan híbridos de sorgo cuyo germoplasma contiene una mutación de la invención, de tal modo que el fenotipo de las plantas sea resistente a herbicidas inhibidores de ACC. En algunas realizaciones, dicha descendencia (por ejemplo, F1, F2, F3, etc.) son el resultado de un
10 cruce entre las líneas de sorgo de élite, al menos una de las cuales contiene un germoplasma que comprende una mutación de la invención que hace a la planta tolerante a herbicidas inhibidores de ACC.

En una realización, la presente invención proporciona un híbrido de sorgo de la invención en el que dicho germoplasma del híbrido de sorgo confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a niveles de dichos uno o más herbicidas que inhibirían normalmente el crecimiento de un híbrido de
15 sorgo. En algunas realizaciones, dicho uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa son de las familias químicas ariloxifenoxipropionato (FOP) y ciclohexanodiona (DIM). En algunas realizaciones, dicho germoplasma de híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa comprende una o más mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o como las encontradas en ATCC N° PYA-8034.

20 En una realización, la presente invención proporciona un método para controlar malas hierbas en la proximidad de un híbrido de sorgo de la invención, que comprende proporcionar uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, aplicar dichos uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a un campo que contiene un híbrido de sorgo de la invención y controlar las malas hierbas en la proximidad de dicho híbrido de sorgo de tal modo que el crecimiento de las malas hierbas se vea afectado adversamente por la aplicación de dicho uno o más herbicidas
25 y el crecimiento de dicho híbrido de sorgo no se vea afectado adversamente. En algunas realizaciones, dichos uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa son de las familias químicas ariloxifenoxipropionato (FOP) y ciclohexanodiona (DIM). En algunas realizaciones, dicho híbrido de sorgo comprende una o más mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.

En una realización, la presente invención proporciona un híbrido de sorgo de la invención, en el que dicho híbrido de
30 sorgo comprende un germoplasma que contiene una o más mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa tales que la resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa es conferida a dicho híbrido. En algunas realizaciones, el híbrido de sorgo de la invención se crea por introgresión de un germoplasma de sorgo que contiene dicha una o más mutaciones para conferir resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa. En algunas realizaciones, el híbrido de sorgo de la invención se crea por incorporación de un gen heterólogo que contiene una o más mutaciones para conferir resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA carboxilasa.
35

Se describe un método para producir una línea de plantas de híbrido de sorgo resistente a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa que comprende identificar un germoplasma que confiere dicha resistencia a dichos herbicidas, en el que dicho germoplasma resistente a dichos herbicidas procede de una planta de sorgo de la
40 invención resistente a herbicidas e introducir de dicho germoplasma en una línea de plantas de sorgo de élite. También se describe en la presente memoria que dicha introducción de dicho germoplasma en dicha línea de plantas de sorgo de élite se realiza por introgresión. La presente invención proporciona dicho método, en el que la introducción de dicho germoplasma en dicha línea de plantas de sorgo de élite consiste en la introducción de un gen heterólogo.

En una realización, la presente invención proporciona un híbrido de sorgo de la invención en el que el germoplasma
45 de dicho híbrido comprende resistencia conferida a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa y resistencia a uno o más compuestos de uno o más grupos de herbicidas que no son inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa.

También se describe en la presente memoria un método para identificar líneas de plantas de sorgo resistentes a
50 herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa que comprende suministrar una muestra de ácidos nucleicos de una planta de sorgo, proporcionar cebadores de amplificación para amplificar una región de la planta de sorgo que corresponde a un gen de acetil-CoA-carboxilasa presente en dicha muestra de ácidos nucleicos, aplicar dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácidos nucleicos de tal forma que tenga lugar la amplificación de dicha región de dicho gen de acetil-CoA-carboxilasa e identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa basándose en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa presentes en dicha muestra de ácidos nucleicos amplificados.
55

En una realización, la presente invención proporciona semillas de sorgo en las que dicho germoplasma de dichas
semillas comprende un gen mutante de acetil-CoA-carboxilasa de la invención de tal modo que dicha mutación confiere resistencia a la inhibición por herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa. En algunas realizaciones, el

5 germoplasma de dichas semillas de sorgo comprende un gen mutante de acetil-CoA-carboxilasa como el encontrado en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona plantas de sorgo que crecen a partir de dichas semillas y otras partes de las plantas que comprenden dichas plantas de sorgo que crecen a partir de dichas semillas. En algunas realizaciones, el gen mutante de acetil-CoA-carboxilasa es un fragmento funcional del gen como el encontrado en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034, de tal modo que el fragmento de gen codifica un fragmento de proteína que es suficiente para conferir resistencia a la inhibición por herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a una planta de sorgo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona plantas de sorgo que crecen a partir de dichas semillas y otras partes de plantas que comprenden dichas plantas de sorgo que crecen a partir de dichas semillas.

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un híbrido de sorgo que comprende un gen que es al menos 90% homólogo, al menos 95% homólogo, al menos 97% homólogo o al menos 99% homólogo a SEQ ID NO:1 como el encontrado en ATCC N° PTA-8033 y/o ATCC N° PYA-8034, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo Trp₂₀₂₇Cys como la encontrada en SEQ ID NO:1.

15 En una realización, la presente invención proporciona además plantas de híbrido de sorgo que tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de dicha planta de sorgo que crece a partir de dicha semilla de sorgo. En otras realizaciones, la presente invención proporciona cultivos de tejidos y cultivos de tejidos regenerados que surgen de dicha semilla de sorgo o dicha parte de la planta de sorgo que contiene una mutación en dicho gen de acetil-CoA-carboxilasa como la encontrada en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.

20 En la presente memoria se describe un método para producir semilla de sorgo que comprende cruzar una planta que comprende un gen mutante de acetil-CoA-carboxilasa como el encontrado en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034 consigo misma o con una segunda planta de sorgo y recoger dicha semilla de dicho cruce. También se describen en la presente memoria métodos para producir dicha semilla de sorgo que comprenden plantar una línea de sorgo de semillas progenitoras en la que dicha línea de semillas progenitoras comprende un germoplasma que confiere resistencia a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa con una línea de sorgo polinizador progenitora en el que dicho polinizador y/o germoplasma de la línea de semillas comprende un germoplasma que confiere resistencia a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, dejar crecer juntas dichas plantas de semillas progenitoras y de sorgo polinizador, permitir que dichas plantas de semillas progenitoras sean polinizadas por dichas plantas polinizadoras progenitoras y cosechar la semilla que resulta de dicha polinización.

Descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra la mutación de triptófano (TGG) a cisteína (TGC) en el gen de ACC de sorgo que se encuentra asociado con la resistencia a herbicidas inhibidores de ACC.

Definiciones

35 Como se usan en la presente memoria, los términos "variedad" y "variedad cultivada" se refieren a plantas que son definidas por la expresión de las características resultantes de un genotipo o combinación de genotipos dado, distinguiéndose de cualquier otro grupo de plantas por la expresión de al menos una de las características y siendo consideradas como una unidad con relación a su idoneidad para propagarse sin cambios.

Como se usa en la presente memoria, el término "híbrido" se refiere a la descendencia o progenie de progenitoras o pies de plantas genéticamente diferentes producidos como resultado de la polinización cruzada controlada contrariamente a una semilla no híbrida producida como resultado de la polinización natural.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "progenie" se refiere a las generaciones de una planta, en la que el antepasado de la generación puede ser rastreado para dicha planta.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "derivada" de una planta resistente a herbicidas incluye tanto la progenie de dicha planta resistente a herbicidas como cualquier mutante, recombinante o derivado obtenido por ingeniería genética de dicha planta, tanto de la misma especie o de una especie diferente, donde la(s) característica(s) resistente a herbicidas de la planta original resistente a herbicidas ha(n) sido transferida(s) a la planta derivada.

Como se usa en la presente memoria, el término "tejido vegetal" incluye tejidos diferenciados y no diferenciados de plantas, incluyendo los presentes en raíces, brotes, hojas, polen, semillas y tumores, así como células en cultivo (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones, callos, etc.). El tejido vegetal puede estar en plantas, en cultivo de órganos, cultivo tisular o cultivo celular.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "parte de la planta" se refiere a una estructura vegetal o un tejido vegetal, por ejemplo, polen, un óvulo, un tejido, una vaina, una semilla y una célula. En algunas realizaciones de la presente invención plantas transgénicas son plantas de cultivo.

Como se usan en la presente memoria, los términos "cultivo" y "planta de cultivo" se utilizan en su sentido más amplio. El término incluye, aunque sin limitación, cualquier especie de planta comestible por los seres humanos o utili-

zada como pienso para animales o peces o animales marinos, o consumida por seres humanos, o utilizada por seres humanos, o vista por seres humanos, o cualquier planta usada en la industria o el comercio o la educación.

5 Como se usan en la presente memoria, los términos "generación F" y "generación filial" se refieren a cualquiera de las sucesivas generaciones de plantas, células, tejidos u organismos después de un cruce biparental. La generación resultante de un apareamiento de un cruce biparental (es decir, dos progenitores) es la primera generación filial (designada como "F1" y "F₁") con referencia a una semilla y su planta, mientras que la resultante del cruce del individuo F1 es la segunda generación filial (designada como "F2" o "F₂") con referencia a una semilla y su planta. Por ejemplo, una semilla F2 y su planta resultante son producidas por autopolinización o polinización cruzada de F1, mientras que las generaciones F posteriores se producen por autopolinización o polinización cruzada de la generación anterior inmediata.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "germoplasma" se refiere a cualquier material genético de las plantas que contiene unidades funcionales de la herencia.

Como se usa en la presente memoria, el término "germoplasma de élite" con referencia a una planta se refiere a material hereditario de superioridad genética demostrada.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "planta de élite," se refiere a cualquier planta que ha resultado del cultivo y la selección para un rendimiento agronómico superior.

Como se usa en la presente memoria, el término "rasgo" se refiere a una característica observable y/o medible de un organismo. Por ejemplo, la presente invención describe plantas que son resistentes a herbicidas de FOP y DIM.

20 Como se usan en la presente memoria, los términos "marcador" y "marcador de DNA" y "marcador molecular" con referencia a un "marcador seleccionable" se refieren a un rasgo fisiológico o morfológico que se puede determinar como marcador para su propia selección o para la selección de otros rasgos estrechamente relacionados con ese marcador. Por ejemplo, dicho marcador podría ser un gen o rasgo que se asocie con la tolerancia a los herbicidas incluyendo, aunque sin limitación, repetición de secuencias simples (SSR), polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), inserciones y/o deleciones genéticas y similares.

25 Como se usan en la presente memoria, los términos "introgresar" e "introgresión" se refieren a técnicas de reproducción por polinización convencional (es decir, clásicas) para incorporar material genético extraño en una línea de pie reproductor. Por ejemplo, la presente invención proporciona plantas de sorgo para cultivo introgresadas con un gen mutante de ACC para la tolerancia a herbicidas por el cruce de dos generaciones de plantas.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "de tipo natural" cuando se hace en referencia a un gen se refiere a un gen funcional común en una población de plantas. Un gen de tipo natural funcional es el que se observa con mayor frecuencia en una población y por lo tanto se designa arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo natural" del gen.

35 Como se usan en la presente memoria, los términos "modificado" o "mutante" o "mutante funcional" cuando hacen referencia a un gen o a un producto génico se refieren, respectivamente, a un gen o a un producto génico que muestra modificaciones en las propiedades de las secuencias y/o funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto génico de tipo natural. Por tanto, los términos "modificado" y "mutante" cuando se usan con referencia a una secuencia de nucleótidos se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos que difiere en uno o más nucleótidos de otra secuencia de ácidos nucleicos normalmente relacionada y el término "mutante funcional" cuando se utiliza con referencia a un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico "modificado" o "mutante" se refiere a la proteína o polipéptido que retiene la actividad. En la presente solicitud, la proteína mutante ACC, o su "mutante funcional" es la expresada por un gen de ACC que retiene su actividad natural para crear aminoácidos esenciales. Además, una secuencia de nucleótidos "modificada" se interpreta como la secuencia que se encuentra en el código genético degenerado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el código genético está degenerado cuando hay casos en los que diferentes codones especifican el mismo aminoácido; un código genético en el que algunos aminoácidos pueden cada uno ser codificado por más de un codón. Se considera que la presente invención puede comprender tal degeneración (por ejemplo, cuando un híbrido de sorgo comprende un gen de ACC que es al menos 70% homólogo, al menos 80% homólogo, al menos 85% homólogo, al menos 90% homólogo, al menos 95% homólogo, al menos 97% homólogo o al menos 99% homólogo a la SEQ ID NO:1) como el encontrado, por ejemplo, en el germoplasma de sorgo.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "heterólogo" cuando se utiliza con referencia a un gen o ácido nucleico se refiere a un gen que ha sido de algún modo manipulado.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "porción" o "fragmento funcional" cuando se usa con referencia a una proteína (como en "un fragmento de una proteína dada", "un fragmento de proteína", una "porción de una proteína") se refiere a fragmentos de dicha proteína. Los fragmentos pueden variar de tamaño desde cuatro residuos de aminoácidos hasta toda la secuencia de aminoácidos menos un aminoácido. En la presente invención, el fragmento

de proteína es preferiblemente funcional, de tal modo que el fragmento de proteína confiera resistencia a la inhibición de herbicidas inhibidores de ACC a una planta dada.

Descripción detallada de la invención

5 La acetil-CoA-carboxilasa (ACC) es una enzima biotinilada que cataliza la carboxilación de acetil-CoA produciendo malonil-CoA. Esta carboxilación es una reacción reversible en dos etapas que consiste en la carboxilación dependiente de ATP del grupo biotina en el dominio del portador de carboxilo por la actividad de biotina-carboxilasa seguido por la transferencia del grupo carboxilo de la biotina a acetil-CoA por la actividad de carboxil-transferasa (Nikolau et al., 2003, *Arch. Biochem. Biophys.* 414:211-22). La acetil-CoA-carboxilasa es no sólo una enzima clave en las plantas para la biosíntesis de ácidos grasos, un proceso que se produce en los cloroplastos y las mitocondrias, sino que la ACC también desempeña un papel en la formación de ácidos grasos de cadena larga y flavonoides y en la malonilación que tiene lugar en el citoplasma. Existen dos isoformas de ACC, siendo la ACC cloroplástica responsable de más del 80% de la actividad total de ACC (Herbert et al., 1996, *Biochem. J.* 318:997-1006). El ariloxifenoxipropionato (FOP) y la ciclohexanodiona (DIM) son dos clases de productos químicos que se sabe que inhiben selectivamente la ACC cloroplástica en las gramíneas (Rendina et al., 1990, *J. Agric. Food Chem.* 38:1282-1287).

15 Se plantaron semillas de 83 poblaciones de sorgo silvestre de Bolivia y se evaluó la tolerancia a los herbicidas inhibidores de ACC. Uno de los genotipos de sorgo silvestre, Bol-71, expresó altos niveles de tolerancia a cada uno de los herbicidas ensayados. Se demuestra en la presente memoria que cruzando el sorgo silvestre Bol-71 con líneas de plantas de sorgo progenitoras de élite se obtiene un buen conjunto de semillas y resistencia al herbicida inhibidor de ACC en los híbridos F1. Por ejemplo, las semillas del cruce de Bol-71 y ATx623, designadas KSU 06GHATx623x174 (por ejemplo, la progenie F1), se depositaron en ATCC como se describe en la presente memoria.

25 En este sentido, una realización de la presente invención proporciona un germoplasma de sorgo de la invención que contiene genes y proteínas alterados de ACC. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de herbicidas inhibidores de ACC en campos de plantas de cultivo de sorgo híbrido de la invención para reducir la cantidad de plantas de malas hierbas monocotiledóneas presentes en dicho campo de cultivo, en el que dicho germoplasma de sorgo híbrido comprende una enzima alterada de ACC que confiere resistencia a los herbicidas inhibidores de ACC y dichas plantas de malas hierbas son sensibles a los herbicidas inhibidores de ACC.

30 En una realización, la presente invención proporciona un germoplasma de sorgo de la invención que confiere resistencia a la inhibición por herbicidas inhibidores de ACC, sola o junto con otros rasgos de resistencia, por ejemplo resistencia a los insectos contra el barrenador manchado del tallo *Chilo partellus* (Girijashankar et al., 2005, *Plant Cell Rep.* 24:513-522). Por ejemplo, se describe un híbrido de sorgo cuyo germoplasma que comprende un gen cryI Ac sintético de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es introgresionado en una línea de sorgo de la invención, cuyo germoplasma confiere resistencia a los herbicidas inhibidores de ACC. Según la invención, la incorporación de la resistencia a herbicidas inhibidores de ACC y la resistencia a los insectos se realiza a través de la transgénesis vegetal en el mismo híbrido de sorgo. Un experto en la técnica reconocerá que los diversos métodos descritos en la presente memoria son aplicables a la incorporación de dos o más rasgos de resistencia en el mismo híbrido de sorgo.

40 Se describe la resistencia de ACC a los herbicidas en plantas de sorgo que comprenden, por ejemplo, un germoplasma de ACC denominado KSU 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 depositado en ATCC con los números de acceso: PTA-8033 y PYA-8034, respectivamente, incorporado en las variedades de sorgo de élite mediante la reproducción y la selección de plantas, proporcionando de este modo el desarrollo de híbridos de cultivos de sorgo tolerantes a herbicidas que toleraran el uso de herbicidas inhibidores de ACC para el control de malas hierbas. El desarrollo de esta característica de tolerancia a herbicidas en los híbridos antes mencionados permite el uso de estos herbicidas para controlar las malas hierbas monocotiledóneas que crecen en presencia de estos cultivos.

45 En algunas realizaciones de la invención, la incorporación del gen de resistencia a la ACC en líneas de élite se realiza por medio de transgénesis de genes heterólogos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un híbrido de sorgo, en el que al menos un antepasado del híbrido de sorgo comprende un gen de ACC resistente procedente del germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 depositado en ATCC con los números de acceso: PTA-8033 y PYA-8034, respectivamente. En algunas realizaciones, el gen de ACC resistente a los herbicidas es al menos 90% homólogo, al menos 95% homólogo, al menos 97% homólogo o al menos 99% homólogo al gen de ACC resistente a los herbicidas encontrado en el germoplasma KSU 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 que comprende una sustitución de aminoácido Trp₂₀₂₇Cys.

50 En una realización, dicho gen de ACC resistente a los herbicidas se introduce en el genoma de la planta por medio de transgénesis usando vectores y tecnologías conocidos en la técnica. Dicha planta de sorgo proporciona alimentos para el consumo humano o pienso para el ganado (por ejemplo, aves de corral, ganado vacuno, cerdos, ovejas, etc.).

55 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un germoplasma de ACC resistente de una parte de la planta de sorgo de la línea Bol-71 y Atx623, en el que la semilla de dicha planta de sorgo ha sido depositada en ATCC con los números de acceso: PTA-8033 y PYA-8034, respectivamente, y dicha parte de planta de sorgo es uno

o más de un polen, un óvulo, un tejido, una vaina, una semilla y una célula. En una realización, la presente invención proporciona un híbrido F1 cuyo germoplasma comprende un gen de ACC resistente de la invención. En algunas realizaciones, el híbrido F1 es un cruce entre dos líneas de sorgo de élite, al menos una de las cuales contiene un germoplasma que comprende un gen de ACC resistente de la invención.

5 En una realización, la presente invención proporciona métodos para controlar malas hierbas en un campo de plantas de cultivo de sorgo híbrido de la invención. En algunas realizaciones, el control de las malas hierbas comprende aplicar un herbicida inhibidor de ACC a dicho campo de plantas de sorgo, de tal modo que se inhiba el crecimiento de las malas hierbas pero que no se vea afectado adversamente el crecimiento del sorgo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de ACC que se aplica es de la familia de herbicidas ariloxifenoxipropionato (FOP) incluyendo, aunque sin limitación, los compuestos clodinafop-propargilo, cihalofop-butilo, diclofop-metilo, fenoxaprop-P-etilo, fluazifop-P-butilo, haloxifop-etoxietilo, haloxifop-etilo, haloxifop-R-metilo, propaquizafop, quizalofop-P-etilo y quiza-
10 lofop-P-tefurilo. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de ACC que se aplica es de la familia de herbicidas ciclohexanodionas (DIM) incluyendo, aunque sin limitación, los compuestos aloxidim, butroxidim, clefoxidim, cletodim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim y tralcoxidim. En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de ACC que se aplica comprende una combinación de compuestos de familias de herbicidas inhibidores de ACC tanto FOP como DIM, como se describe en la presente memoria. Sin embargo, la presente solicitud no está limitada al herbicida inhibidor de ACC usado y un experto en la técnica apreciará que en un momento dado se descubren nuevos herbicidas inhibidores de ACC que inhiben la enzima ACC.

En una realización, la presente invención proporciona un híbrido de sorgo de la invención (por ejemplo, F1, F2, F3, F4, etc.), cuyo germoplasma confiere resistencia a los herbicidas inhibidores de ACC y resistencia a uno o más herbicidas adicionales de uno o más grupos diferentes de herbicidas. Por ejemplo, otros grupos de herbicidas usados para inhibir el crecimiento de malas hierbas incluyen, aunque sin limitación, inhibidores de la síntesis de lípidos (por ejemplo, ariloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, benzofuranos, ácidos cloro-carbónicos, fosforodtioatos, tiocarbamatos), inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II (por ejemplo, fenil-carbamatos, piridazinonas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, uracilos, amidas, ureas, benzotiadiazinonas, nitrilos, fenil-piridinas), inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema I (por ejemplo, bipiridilios), inhibidores de la protoporfirinógeno-oxidasa (por ejemplo, difeniléteres, N-fenilftalimidas, oxadiazoles, oxazolidindionas, fenilpirazoles, pirimidindionas, tiadiazoles), inhibidores de la biosíntesis de carotenoides (por ejemplo, piridazinonas, piridincarboxamidas, isoxazolidinonas, triazoles), inhibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (por ejemplo, calistemonas, isoxazoles, pirazoles, tricetonas), inhibidores de la EPSP-sintasa (por ejemplo, glicinas), inhibidores de la glutamina-sintetasa (por ejemplo, ácidos fosfínicos), inhibidores de la dihidropteroato-sintasa (por ejemplo, carbamatos), inhibidores del sistema de microtúbulos (por ejemplo, benzamidas, ácidos benzoicos, dinitroanilinas, fosforamidatos, piridinas), inhibidores de la división celular (por ejemplo, acetamidas, cloroacetamidas, oxiacetamidas), inhibidores de la síntesis de la pared celular (por ejemplo, nitrilos, triazolocarboxamidas) e inhibidores del transporte de auxinas (por ejemplo, ftalamatos, semicarbazonas). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona híbridos F1 de las líneas de sorgo de élite que comprenden resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de ACC solos, o junto con, resistencia a los herbicidas de uno o más de los grupos de herbicidas antes mencionados.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un transgén que comprende un gen heterólogo de la invención que codifica una proteína ACC mutante para proporcionar el rasgo agronómico seleccionado de resistencia a los herbicidas inhibidores de ACC. En una realización, el transgén comprende un gen mutante de ACC como el encontrado en el germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 depositado en ATCC con los números de acceso: PTA-8033 y PYA-8034, respectivamente. En algún gen es al menos 70%.

Reproducción clásica de Sorgo

Los cultivos agrícolas se han reproducido clásicamente por técnicas que aprovechan el(los) método(s) de polinización de las plantas. Una planta se considera "autopolinizante" si el polen de una flor puede ser transmitido a la misma o a otra flor, mientras que las plantas se consideran de "polinización cruzada" si el polen procede de una flor de una planta diferente con el fin de que se produzca la polinización.

Las plantas que son auto-polinizadas y seleccionadas durante muchas generaciones llegan a ser homocigóticas en la mayoría, sino todos, los locus de sus genes, produciendo de este modo una población uniforme de progenie reproductora verdadera. Un cruce entre dos plantas homocigóticas de antecedentes diferentes o dos líneas homocigóticas diferentes producirá una población uniforme de plantas híbridas que serán más probablemente heterocigóticas en un número de los locus de sus genes. Un cruce de dos plantas que son cada una heterocigótica en un número de locus de sus genes producirá una generación de plantas híbridas que son genéticamente diferentes y no son uniformes.

Las plantas de sorgo son plantas auto-polinizantes, pero también se pueden reproducir por polinización cruzada. El desarrollo de híbridos de sorgo requiere el desarrollo de progenitores polinizadores (restauradores de la fertilidad) y progenitores de semilla que se reproduzcan endogámicamente utilizando el sistema restaurador de la esterilidad-fertilidad masculina citoplásmica, el cruce de los progenitores de semilla y de los progenitores polinizadores y la evaluación de los cruces. Los programas de reproducción de calidad combinan rasgos deseables, siendo en la presente solicitud el rasgo deseable la resistencia de las plantas a los herbicidas inhibidores de ACC. Este rasgo está

incluido en la mezcla para reproducción de una o más líneas, de tal modo que se creen nuevas líneas endogámicas por cruce, seguido por la selección de plantas con el rasgo deseado, seguido por más cruce, etc. Nuevas líneas endogámicas se cruzan con otras líneas endogámicas (por ejemplo, líneas de plantas de élite como las descritas en la presente memoria).

- 5 La reproducción de calidad comienza con el cruce de dos genotipos, tal como Bol-71 y una línea de sorgo de élite (por ejemplo, Tx430, 00MN7645, BTx623, ATx623, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 y Tx643, Tx2737, Tx2783 y HP 162). Por ejemplo, el progenitor de sorgo silvestre Bol-71 se cruzó con líneas progenitoras de sorgo de élite incluyendo Tx430, 00MN7645, BTx623 y ATx623. Si los dos progenitores originales no proporcionan todas las características deseadas, se pueden incluir entonces otras fuentes en la población reproductora. Por ejemplo, si se requiere un híbrido de tal modo que fuera deseable tanto la resistencia a herbicidas inhibidores de ACC como la resistencia a otro grupo de herbicidas, como se ha descrito en la presente memoria, entonces podrían cruzarse plantas con estos atributos utilizando técnicas de reproducción clásicas. En el método de calidad, las plantas superiores se autofecundan y seleccionan en generaciones sucesivas. En las generaciones venideras, la condición heterocigótica da paso a líneas homogéneas, como resultado de la auto-polinización y la selección. Típicamente, en el método de calidad, se ensayan cinco o más generaciones de autofecundación y selección (por ejemplo, S1, S2, S3, S4, S5, etc.).

Se utiliza retrocruzamiento para mejorar una línea de plantas. El retrocruzamiento transfiere un rasgo deseable específico de una fuente a otra que carece de dicho rasgo. Esto se logra, por ejemplo, cruzando un donante (por ejemplo, Bol-71) con una línea endogámica (por ejemplo, una línea de élite como se describe en la presente memoria). La progenie de este cruce se cruza de nuevo (es decir, retrocruzamiento) con la línea endogámica de élite, seguido por selección en la progenie resultante del rasgo deseado (por ejemplo, resistencia a los herbicidas inhibidores de ACC). Después de cinco o más generaciones de retrocruzamiento con selección del rasgo deseado, la progenie es típicamente heterocigótica para el locus (los locus) que controla el fenotipo deseado, pero será similar al progenitor de élite en cuanto a los otros rasgos genéticos. El último retrocruzamiento es entonces típicamente auto-fecundado con el fin de obtener una progenie reproductora pura para el gen que se está transfiriendo.

- 25 En los actuales programas de reproducción de sorgo híbrido, se desarrollan nuevas líneas progenitoras para líneas progenitoras de semillas (por ejemplo, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 y Tx643) o líneas progenitoras de polen (por ejemplo, Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645 y HP162) dependiendo de si contienen o no genes restauradores de la fertilidad; las líneas progenitoras de semillas no tienen genes restauradores de la fertilidad y son androestériles en ciertos citoplasmas (también conocidas como plantas de la línea "A") y androfértiles en otros citoplasmas (también conocidas como plantas de la línea "B"), mientras que las líneas progenitoras de polen no son androestériles y contienen genes restauradores de la fertilidad (también conocidas como plantas de la línea "R"). Las líneas progenitoras de semillas se crean típicamente para ser citoplasmáticamente androestériles, de tal modo que las anteras sean mínimas o inexistentes en estas plantas por lo que requieren polinización cruzada. Las líneas progenitoras de semillas sólo producirán semillas y el citoplasma se transmite únicamente a través del huevo. El polen para la polinización cruzada es suministrado por las líneas progenitoras de polen que contienen los genes necesarios para la restauración completa de la fertilidad en el híbrido F1, y el cruce se combina con el progenitor de semilla androestéril para producir un híbrido de un solo cruce de alto rendimiento con buena calidad de grano.

Típicamente, este sistema restaurador de la esterilidad-fertilidad masculina citoplásmica se realiza para la producción de semillas híbridas mediante la plantación de bloques de filas de plantas androestériles (progenitoras de semillas) y bloques de filas de plantas restauradoras de la fertilidad (progenitoras de polen), de tal modo que las plantas progenitoras de semillas sean polinizadas por el viento con el polen de la planta progenitora de polen. Este proceso produce un híbrido vigoroso de un solo cruce que es cosechado y sembrado por el consumidor.

- Las plantas progenitoras de semillas androestériles también pueden ser creadas reproduciendo genéticamente genes nucleares androestériles recesivos en una población particular, sin embargo el sistema restaurador de la esterilidad-fertilidad masculina citoplásmica es típicamente el sistema utilizado para reproducir sorgo híbrido. Sleper and Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops*, Fifth Ed., Blackwell Publishing proporcionan una buena revisión de los procedimientos actuales de reproducción de sorgo.

Transgénicos vegetales

- Los genes heterólogos destinados a la expresión en plantas se ensamblan en primer lugar en vectores de expresión que contienen un gen heterólogo y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados, siendo muy conocidos dichos métodos por los expertos en la técnica. Los métodos incluyen técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Métodos ilustrativos están ampliamente descritos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY., y Ausubel, F.M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY).

En general, estos vectores comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen heterólogo unido operativamente a un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores, señales de poliadenilación, etc.) requeridas para la expresión en una planta.

Los promotores incluyen, aunque sin limitación, promotores constitutivos, promotores específicos de tejidos, órganos y del desarrollo y promotores inducibles. Ejemplos de promotores incluyen, aunque sin limitación: el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor; un promotor inducible por herida del tomate, leucina-amino-peptidasa (Chao et al., 1999, *Plant Physiol* 120:979-992); un promotor químicamente inducible del tabaco, relacionado con la patogénesis 1 (inducido por ácido salicílico y éster S-metilico del ácido benzotriazol-7-carbotioico); un promotor de choque térmico (Patente de EE.UU. Nº 5.187.267); un promotor inducible por tetraciclina (Patente de EE.UU. Nº 5.057.422); y promotores específicos de semillas.

Los casetes de expresión pueden comprender además cualquiera de las secuencias requeridas para la expresión de mRNA. Dichas secuencias incluyen, aunque sin limitación, terminadores de la transcripción, potenciadores, tales como intrones, secuencias virales y secuencias destinadas al direccionamiento del producto génico a orgánulos específicos y compartimentos celulares.

Una variedad de terminadores de la transcripción está disponible para su uso en la expresión de secuencias que usan promotores tales como los descritos en la presente memoria. Los terminadores de la transcripción son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transcrito y de su correcta poliadenilación. Terminadores de la transcripción apropiados y los que se sabe que actúan en plantas incluyen, aunque sin limitación, el terminador 35S del CaMV, el terminador tml, el terminador rbcS E9 del guisante y el terminador de nopalina- y octopina-sintasa (Odell et al., 1985, *Nature* 313:810; Rosenberg et al., 1987, *Gene*, 56:125; Guerineau et al., 1991, *Mol. Gen. Genet.* 262:141; Proudfoot, 1991, *Cell*, 64:671; Sanfacon et al., 1990, *Genes Dev.* 5:141; Mogen et al., 1990, *Plant Cell*, 2:1261; Munroe et al., 1990, *Gene*, 91:151; Ballas et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:7891; Joshi et al., 1987, *Nucleic Acid Res.*, 15:9627).

En algunas realizaciones, las construcciones para la expresión del gen heterólogo de interés incluyen una o más de las secuencias encontradas para potenciar la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional. Estas secuencias se pueden utilizar junto con la secuencia de ácidos nucleicos de interés para aumentar la expresión en las plantas. Se ha demostrado que varias secuencias intrónicas potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Habitualmente se han incorporado secuencias intrónicas en vectores de transformación de plantas, típicamente dentro de la secuencia delantera no traducida.

En algunas realizaciones, una construcción para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga de interés incluye también un regulador, tal como una señal de localización nuclear (Kalderon et al., 1984, *Cell* 39:499; Lassner et al., 1991, *Plant Molecular Biology* 17:229), una secuencia de consenso de la traducción para plantas (Joshi, 1987, *Nucleic Acids Research* 15:6643), un intrón (Luehrsen and Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225:81) y similares, unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen heterólogo.

En la preparación de la construcción que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen heterólogo, o que codifica una secuencia diseñada para disminuir la expresión de genes heterólogos, se pueden manipular varios fragmentos de DNA con el fin de proporcionar las secuencias de DNA en la orientación deseada (por ejemplo, sentido o antisentido) y, según proceda, en el marco de lectura deseado. Por ejemplo, se pueden emplear adaptadores o conectores para unir los fragmentos de DNA, o se pueden utilizar otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de DNA superfluo, eliminación de sitios de restricción y similares. Para este fin, se emplean preferiblemente mutagénesis *in vitro*, reparación con cebadores, restricción, asociación, resección, ligamiento y similares, cuando están implicadas inserciones, deleciones o sustituciones (por ejemplo, transiciones y transversiones).

Para la transformación de plantas están disponibles numerosos vectores de transformación. La selección de un vector para su uso dependerá de la técnica de transformación preferida y la especie diana para la transformación. Para ciertas especies diana, se prefieren diferentes marcadores de selección de antibióticos o herbicidas. Los marcadores de selección usados habitualmente en la transformación incluyen el gen nptII que confiere resistencia a la kanamicina y a los antibióticos relacionados (Messing and Vierra, 1982, *Gene* 19:259; Bevan et al., 1983, *Nature* 304:184), el gen bar que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White et al., 1990, *Nucl Acids Res.* 18:1062; Spencer et al., 1990, *Theor. Appl. Genet.* 79:625), el gen hph que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochlinger and Diggelmann, 1984, *Mol. Cell. Biol.* 4:2929) y el gen dhfr que confiere resistencia al metotrexato (Bourouis et al., 1983, *EMBO J.*, 2:1099).

En algunas realizaciones, el vector plasmídico Ti (T-DNA) se adapta para su uso en un proceso de transfección mediado por *Agrobacterium*, tal como en la Patente de EE.UU. 6.369.298 (sorgo) y en las Patentes de EE.UU. 5.981.839, 6.051.757, 5.981.840, 5.824.877 y 4.940.838. La construcción de los plásmidos Ti y Ri recombinantes aplica en general métodos usados típicamente con los vectores más comunes, tales como pBR322. Pueden realizarse otros usos de elementos genéticos accesorios encontrados algunas veces en los plásmidos naturales y algunas veces construidos a partir de secuencias extrañas. Estos pueden incluir como genes de selección, aunque sin limitación, genes estructurales para resistencia a los antibióticos.

Actualmente se usan dos sistemas de vectores plasmídicos Ti y Ri recombinantes. El primer sistema se denomina sistema "cointegrado". En este sistema, el vector lanzadera que contiene el gen de interés se inserta por recombinación genética en un plásmido Ti no oncogénico que contiene tanto los elementos que actúan en cis como los que

actúan en trans requeridos para la transformación de plantas como, por ejemplo, en el vector lanzadera pMLJ1 y el plásmido Ti no oncogénico pGV3850. El uso de T-DNA como una región flanqueante en una construcción para la integración en un plásmido Ti o Ri ha sido descrito en la Patente Europea Nº 116718 y las Solicitudes PCT Nos. WO 84/02913, 02919 y 02920; Herrera-Estrella, 1983, *Nature* 303:209-213; Fraley et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807; Horsch et al., 1984, *Science* 223:496-498; y DeBlock et al., 1984, *EMBO J.* 3:1681-1689.

El segundo sistema se denomina el sistema "binario" en el que se utilizan dos plásmidos y el gen de interés se inserta en un vector lanzadera que contiene los elementos que actúan en cis requeridos para la transformación de plantas. Las otras funciones necesarias son proporcionadas en trans por el plásmido Ti no oncogénico ilustrado por el vector lanzadera pBIN19 y el plásmido Ti no oncogénico PAL4404. Algunos de estos vectores están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos de interés es dirigida a un locus particular en el genoma de la planta. La integración dirigida al sitio de la secuencia de ácidos nucleicos de interés en el genoma de la célula vegetal puede lograrse mediante, por ejemplo, recombinación homóloga utilizando secuencias derivadas de *Agrobacterium*. Generalmente, las células vegetales se incuban con una cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector de direccionamiento en el que las secuencias que son homólogas a una secuencia de DNA del interior del locus diana están flanqueadas por secuencias del DNA transferido (T-DNA) de *Agrobacterium*, como ha sido descrito previamente (Patente de EE.UU. Nº 5.501.967). Los expertos en la técnica saben que la recombinación homóloga puede conseguirse usando vectores de direccionamiento que contienen secuencias que son homólogas a cualquier parte del gen vegetal diana, siempre que pertenezcan a los elementos reguladores del gen o a las regiones codificadoras del gen. La recombinación homóloga se puede lograr en cualquier región de un gen vegetal siempre y cuando se conozca la secuencia de ácidos nucleicos de las regiones que flanquean el sitio diana. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad tumor del cuello transfiriendo alguno de sus DNA a la planta hospedante. El DNA transferido (T-DNA) se integra de modo estable en el genoma de la planta, donde su expresión conduce a la síntesis de hormonas vegetales y por lo tanto al crecimiento tumoral de las células. Se forma un supuesto complejo macromolecular en el proceso de transferencia de T-DNA fuera de la célula bacteriana en la célula vegetal.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se utilizan para construir vectores derivados de virus (+) RNA de plantas (por ejemplo, virus del mosaico del bromo, virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico del tomate y sus combinaciones e híbridos). Generalmente, el polinucleótido heterólogo insertado puede ser expresado a partir de estos vectores como una proteína de fusión (por ejemplo, proteína de fusión de proteínas de recubrimiento) o a partir de su propio promotor subgenómico u otro promotor. Los métodos para la construcción y el uso de dichos virus están descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.846.795; 5.500.360; 5.173.410; 5.965.794; 5.977.438; y 5.866.785.

En algunas realizaciones, una secuencia heteróloga de ácidos nucleicos de interés que comprende un transgén mutante de ACC, por ejemplo, como el encontrado en el germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 depositado en ATCC con los números de acceso: PTA-8033 y PYA-8034, respectivamente, se introduce directamente en una planta. En algunas realizaciones, el transgén es al menos 90% homólogo, al menos 95% homólogo, al menos 97% homólogo o al menos 99% homólogo al gen de ACC resistente a herbicidas como el encontrado en el germoplasma 06GH701-715bk o KSU 06GHATx623x714 que comprende una sustitución de aminoácidos Trp₂₀₂₇Cys.

Un vector útil para las técnicas de transferencia directa de genes en combinación con la selección por el herbicida *Basta* (o fosfinotricina) es una versión modificada del plásmido pCIB246, con un promotor 35S de CaMV en fusión operativa con el gen GUS de *E. coli* y el terminador de la transcripción 35S de CaMV (documento de patente WO 93/07278).

Una vez que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el gen heterólogo está unida operativamente a un promotor apropiado e insertada en un vector adecuado para la técnica de transformación particular utilizada (por ejemplo, uno de los vectores descritos anteriormente), el DNA recombinante antes descrito se puede introducir en la célula vegetal por un número de métodos reconocidos en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que la elección del método depende del tipo de planta diana para la transformación. En algunas realizaciones, el vector se mantiene en el episoma. En algunas realizaciones, el vector se integra en el genoma. En algunas realizaciones, se usa la transformación directa en el genoma del plasto para introducir el vector en la célula vegetal (por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. Nº 5.451.513; 5.545.817; 5.545.818; y la solicitud de patente PCT WO 95/16783).

La técnica básica para la transformación de cloroplastos implica la introducción de regiones del DNA clonado de plastos que flanquean un marcador seleccionable junto con el ácido nucleico que codifica las secuencias de interés en un tejido diana adecuado (por ejemplo, usando biolística o transformación de protoplastos con cloruro de calcio o PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1,5 kb, denominadas secuencias de direccionamiento, facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plasto y por lo tanto permiten la sustitución o modificación de regiones específicas del plastoma. Inicialmente, se utilizan mutaciones puntuales en el rRNA de 16S de cloroplastos y en genes rps12 que confieren resistencia a la espectinomomicina y/o estreptomomicina como marcadores seleccionables para la transformación (Svab et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:8526; Staub and Maliga, 1992, *Plant Cell*, 4:39). La

presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permite la creación de un vector de direccionamiento de plastos para la introducción de moléculas de DNA extrañas (Staub and Maliga, 1993, *EMBO J.*, 12:601). Se obtienen aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación por sustitución de los genes recesivos de resistencia a antibióticos rRNA o r-proteína por un marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima detoxificante de espectinomycin, aminoglicósido-3'-adeniltransferasa (Svab and Maliga, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:913). Se conocen en la técnica otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plastos que están abarcados por el alcance de la presente invención. Se obtienen plantas homoplásmicas para genomas de plastos que contienen las dos secuencias de ácidos nucleicos separadas por un promotor de la presente invención, y son preferiblemente capaces de una alta expresión de los RNA codificados por la molécula de DNA.

En una realización, los vectores útiles en la práctica de la presente invención se microinyectan directamente en células vegetales (Crossway, 1985, *Mol. Gen. Genet.*, 202:179). En algunas realizaciones, el vector se transfiere a la célula vegetal usando polietilenglicol (Krens et al., 1982, *Nature*, 296:72; Crossway et al., 1986, *Biotechniques*, 4:320); fusión de protoplastos con otras entidades, tales como minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos con superficie lipídica fusible (Fraley et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79:1859) y transformación de protoplastos (EP 0292435); transferencia directa de genes (Paszowski et al., 1984, *EMBO J.*, 3:2717; Hayashimoto et al., 1990, *Plant Physiol.* 93:857).

En algunas realizaciones, el vector también puede ser introducido en las células vegetales por electroporación (Fromm, et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824; Riggs et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:5602). En esta técnica, los protoplastos vegetales se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan reversiblemente las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales que han sido sometidos a electroporación reforman la pared celular, se dividen y forman callos vegetales.

Además de la transformación directa, en algunas realizaciones, los vectores que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen heterólogo se transfieren utilizando transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee et al., 1988, *Biotechnology*, 6:915; Ishida et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:745). El *Agrobacterium* es un género representativo de la familia gram negativa *Rhizobiaceae*. Sus especies son responsables de los tumores de plantas, tales como las enfermedades tumor del cuello y raíz pilosa. En la característica de tejido indiferenciado de los tumores, se producen y catabolizan derivados de aminoácidos conocidos como opinas. Los genes bacterianos responsables de la expresión de las opinas son una fuente conveniente de elementos de control para casetes de expresión quiméricos. Se pueden introducir en células vegetales apropiadas secuencias genéticas heterólogas (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos unidas operativamente a un promotor de la presente invención) por medio del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (descrito anteriormente). El plásmido Ti se transmite a las células vegetales mediante la infección por *Agrobacterium tumefaciens* y se integra de forma estable en el genoma de la planta (Schell, 1987, *Science*, 237:1176). Las especies que son sensibles a la infección por *Agrobacterium* pueden ser transformadas *in vitro*. Los métodos de transformación para producir plantas de sorgo transgénicas utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium* están descritos en la Patente de EE.UU. 6.369.298.

En algunas realizaciones, el vector se introduce a través de la aceleración balística de partículas (Patente de EE.UU. Nº 4.945.050; Casas et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11212).

En algunas realizaciones, después de seleccionar el material vegetal transformado que puede expresar un gen heterólogo que codifica una proteína heteróloga o su variante, se regeneran las plantas completas. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados está descrita por Evans et al., *Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1: (MacMillan Publishing Co. NewYork, (1983); Vasil IR (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, vol. I (1984) y Vol. III, (1986)). Se sabe que muchas plantas pueden ser regeneradas a partir de células o tejidos cultivados, incluyendo, aunque sin limitación, todas las especies principales de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, frutas y otros árboles, legumbres y verduras, y monocotiledóneas (por ejemplo, las plantas descritas anteriormente). Los medios para la regeneración varían entre especies de plantas, pero generalmente se proporciona en primer lugar una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma el tejido del callo y a partir del callo se pueden inducir brotes y posteriormente provocar el arraigo.

Alternativamente, se puede inducir la formación de embriones a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan y forman plantas maduras. Los medios de cultivo contendrán generalmente varios aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. Normalmente se desarrollan de forma simultánea los brotes y las raíces. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo y de los antecedentes del cultivo. La reproducibilidad de la regeneración depende del control de estas variables.

55 Ejemplos

Ejemplo 1.- Resistencia a herbicidas en el genotipo de sorgo silvestre.

Se plantaron en un invernadero semillas de 83 poblaciones de sorgo silvestre de Bolivia para comparación con Tx2783, un genotipo de sorgo de élite sensible a herbicidas. Se plantaron genotipos de sorgo silvestre en bandejas

planas que contenían tierra para tiestos Metromix 360 (Sun Gro) y se dejaron crecer en el invernadero. Se plantó Tx2783 con plantas silvestres en cada bandeja plana para comparación. En una selección usando cletodim, 18 días después de la siembra, las plantas se pulverizaron con 0,10 kg del ingrediente activo cletodim/hectárea (0,09 libras/acre). Tx2783 y muchos de los sorgos silvestres murieron, pero las plantas tolerantes al herbicida se trasplantaron a tiestos para aumento de las semillas. En una selección usando fluoazifop-P, bandejas planas con Tx2783 y plantas silvestres, 18 días después de la siembra se pulverizaron con una tasa de 0,13 kg de fluazifop-P/hectárea (0,12 libras/acre) y 32 días después de la siembra con 0,40 kg de fluazifop-P/hectárea (0,36 libras/acre). Tx2783 y muchos de los sorgos silvestres murieron, pero las plantas tolerantes al herbicida se trasplantaron a tiestos para aumento de semillas. En un tercer experimento, 18 días después de la siembra las plantas se pulverizaron con una tasa de 0,06 kg de quizalofop/hectárea (0,05 libras/acre) y 32 días después de la siembra con 0,12 kg de quizalofop/hectárea (0,11 libras/acre). Tx2783 y muchos de los sorgos silvestres murieron, pero las plantas tolerantes al herbicidas se trasplantaron a tiestos para aumento de semillas. Uno de los genotipos de sorgo silvestre, Bol-71, expresó altos niveles de tolerancia para cada uno de los herbicidas.

Ejemplo 2 .- Cruces del genotipo de sorgo silvestre Bol-71 con líneas de sorgo de élite y determinación de la herencia

Se cruzó Bol-71 con líneas progenitoras de sorgo de élite incluyendo Tx430, 00MN7645, BTx623 y ATx623. El conjunto de semillas fue excelente en cada cruce lo que indica que el genotipo silvestre era sexualmente compatible con el sorgo cultivado y podía ser utilizado en un programa de reproducción de plantas para producir variedades de sorgo tolerantes a herbicidas.

El modo de herencia de la tolerancia a herbicidas se determinó plantando semillas de Bol-71, la generación F1 del cruce ATx623 x Bol-71 y Pioneer 84G62 (control sensible a herbicidas) en bandejas planas que contenían tierra para tiestos Metromix 360 en un invernadero utilizando un diseño de bloques completo al azar (n = 3). Las plantas se pulverizaron, 14 días después de la siembra, con 0,504 kg de fluazifop-P/hectárea (0,45 libras/acre). La variedad Pioneer 84G62 murió entre los días 12 y 16 días después de la pulverización. Los genotipos ATx623xBol-71 y Bol-71 no mostraron daños por el herbicida, lo que indica que el rasgo de tolerancia a herbicidas se transmitió al sorgo cultivado y que la tolerancia a herbicidas era al menos parcialmente dominante en los híbridos F1.

Ejemplo 3.- Secuenciación génica del gen de resistencia a ACC

Se iniciaron esfuerzos de secuenciación de genes para determinar si una mutación genética podía explicar el fenotipo de tolerancia a herbicidas. Se extrajo DNA de los genotipos tolerantes a herbicidas Bol-71 y R91 y los genotipos sensibles a herbicidas Bol-36, ATx623 y Tx430. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores descritos por Délye and Michel (*Weed Research*, 2005, 45: 323-330) se utilizó para amplificar las regiones del gen ACC asociadas a la expresión de la tolerancia a herbicidas. La secuenciación del DNA (instalación de secuenciación de DNA de la Universidad del Estado de Kansas (*Kansas State University*)) de los productos resultantes de la PCR de genotipos de sorgo tolerantes y sensibles a herbicidas reveló que los genotipos sensibles contenían la secuencia de tipo natural para el gen ACC como la indicada para sorgo (secuencia de la base de datos *The Institute for Genomic Research (TIGR) Plant Transcript Assemblies* denominada TA3768_4558; véase también la Tabla 1 siguiente) y otras especies de cultivos de cereales; sin embargo, los genotipos tolerantes a herbicidas contenían una mutación genética de TGG a TGC que da como resultado una conversión del aminoácido Trp2027Cys (SEQ ID NO: 1) en la enzima (Fig. 1; véase Délye and Michel, *Weed Research* 2005 para la numeración de los aminoácidos). Esta mutación es similar a la descrita en la cola de zorra (*Alopecurus myosuroides* Huds.) tolerante a herbicidas por Délye et al. *Plant Physiology* 2005). La cola de zorra es una especie de mala hierba y el único lugar en la naturaleza donde está documentada de esta mutación, y la mutación no ha sido descrita en el sorgo ni en otras especies de cultivo, ni se ha descrito como una diana para desarrollar cultivos tolerantes a herbicidas.

Tabla 1.- Secuencia de la ACC-carboxilasa de sorgo (SEQ ID NO:1)

TGGCAGAGCAAANCTTGGAGGAATTCCTGTGGGTGTCATAGCTGTGGAGACACAGAC
 CATGATGCAGCTTGTCCCTGCTGATCCAGGTCAGCTTGATTCCCATGAGCGATCCGT
 TCCTCGGGCTGGACAAGTGTGGTTCCAGATTCTGCAACCAAGACAGCTCAGGCATT
 ATTAGACTTCAACCGTGAAGGATTGCCCTCTGTTTATCCTGGCTAACTGGAGAGGTTT
 CTCTGGTGGACAGAGAGATCTCTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGGTCAACAATTGT
 CGAGAACCTTAGGACATATAATCAGCCTGCGTTTGTCTACATTCCCTATGGCTGGAGA
 GCTTCGTGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTTCGATAGCAAAATAAATCCAGACCGCATTGA
 GTGTTATGCTGAGAGGACTGCCAAAGGTAATGTTCTCGAACCCTCAAGGGTAAATGA
 AATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAAGACTGTATGGGTAGGCTTGACCCCGAGTT
 GATAAATCTGAAAGCAAAACTCCAAGATGTAAAGCATGGAATGGAAGTCTACCAGA

CATAGAATCCCTTCAGAAGAGTATAGAAGCACGTACGAAACAGTTGCTGCCTTTATA
 TACCCAGATTGCAATACGGTTTGTGTAATGTCATGATACTTCCCTAAGAATGGCAGC
 TAAAGGCGTGATTAAGAAAGTTGTAGACTGGGAAGAATCACGCTCTTTCTTCTATAA
 AAGGCTACGGAGAAGGATCTCTGAAGATGTTCTTGCAAAAAGAAATAAGACATATAGT
 CGGTGACAACCTTCACTCACCAATCAGCAATGGAGCTCATCAAGGAATGGTACCTGGC
 TTCTCCAGCCACAGCAGGAAGCACTGGATGGGATGACGATGATGCATTTGTTGCCTG
 GAAGGACAGTCTGAAAAC TACAATGGATATATCCAAGAGCTAAGGGCTCAAAAAGT
 GTCTCAGTCGCTCTCTGATCTCACTGACTCCAGTTCAGATCTACAAGCATTCTCGCA
 GGGTCTTTCTACGCTATTAGATAAGATGGATCCCTCTCAAAGAGCGAAGTTTGTTC
 GGAAGTCAAGAAGGTCCTTGGTTGATGATATGATAACACATCCAACACTATGTG
 CATGCTACATGTTTTTGTTC AAGTACATACATAGAAGGATATTGCTTGGCCCTCGTTT
 GCTTGGCCGTTTGTATCATGTCTGATCTAAGTCGACCATTATTTGTTGAAACTTCCTT
 TTTGGACCTGGTGTATGGTTGATGAATGTATATTGGACGTGTGCGACTGTGCGTTC
 TGCCAGGTGTAAGCTCAAATGTTTAGACAGACCGAGTTATGGTTAGGAAGAGCACGA
 GTGAACATGTTCTGGTTTTGCAGTGGTT CAGGAAGGCAGAAAGTTGTTTCACTGTAG
 TTCTGAGATGTACTACCAGCGGCCCTGCTGTAATTTTAGGGTGTATAATGCGGAT
 ACTAGTAAAACAATTGAGTGGTT CATTAAATTTTGAACCTCGAATAATGTTTTTCTAG
 GCATATGTACCGTACCTCTACGTGAAATAAATGCTGTTGAAATAGCATTCGACACCA
 GAATATATGTACCTTACCTAAGAGCTAAGTATTATAATACAACAAGTTGCTGGCCGT
 AAGATTTCTTT

5 SEQ ID NO: 2.- Secuencia de la ACC-carboxilasa de sorgo que incorpora la mutación TGC que confiere resistencia a herbicidas

TGGCAGAGCAAANCTTGGAGGAATTCCTGTGGGTGTCATAGCTGTGGAGACACAGAC
 CATGATGCAGCTTGTCCCTGCTGATCCAGGTCAGCTTGATTCCCATGAGCGATCCGT
 TCCTCGGGCTGGACAAGTGTGGTTCCAGATTCTGCAACCAAGACAGCTCAGGCATT
 ATTAGACTTCAACCGTGAAGGATTGCCCTCTGTTTATCCTGGCTAACTGCAGAGGTTT
 CTCTGGTGGACAGAGAGATCTCTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGGTCAACAATTGT
 CGAGAACCTTAGGACATATAATCAGCCTGCGTTTGTCTACATTCCCTATGGCTGGAGA
 GCTTCGTGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTTCGATAGCAAAATAAATCCAGACCGCATTGA
 GTGTTATGCTGAGAGGACTGCCAAAGGTAATGTTCTCGAACCCTCAAGGGTAAATGA
 AATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAAGACTGTATGGGTAGGCTTGACCCCGAGTT
 GATAAATCTGAAAGCAAAACTCCAAGATGTAAAGCATGGAATGGAAGTCTACCAGA
 CATAGAATCCCTTCAGAAGAGTATAGAAGCACGTACGAAACAGTTGCTGCCTTTATA
 TACCCAGATTGCAATACGGTTTGTGTAATGTCATGATACTTCCCTAAGAATGGCAGC
 TAAAGGCGTGATTAAGAAAGTTGTAGACTGGGAAGAATCACGCTCTTTCTTCTATAA
 AAGGCTACGGAGAAGGATCTCTGAAGATGTTCTTGC AAAAGAAATPAAGACATATAGT
 CGGTGACAACCTTCACTCACCAATCAGCAATGGAGCTCATCAAGGAATGGTACCTGGC
 TTCTCCAGCCACAGCAGGAAGCACTGGATGGGATGACGATGATGCATTTGTTGCCTG
 GAAGGACAGTCTGAAAAC TACAATGGATATATCCAAGAGCTAAGGGCTCAAAAAGT
 GTCTCAGTCGCTCTCTGATCTCACTGACTCCAGTTCAGATCTACAAGCATTCTCGCA
 GGGTCTTTCTACGCTATTAGATAAGATGGATCCCTCTCAAAGAGCGAAGTTTGTTC
 GGAAGTCAAGAAGGTCCTTGGTTGATGATATGATAACACACATCCAACACTATGTG
 CATGCTACATGTTTTTGTTC AAGTACATACATAGAAGGATATTGCTTGGCCCTCGTTT
 GCTTGGCCGTTTGTATCATGTCTGATCTAAGTCGACCATTATTTGTTGAAACTTCCTT
 TTTGGACCTGGTGTATGGTTGATGAATGTATATTGGACGTGTGCGACTGTGCGTTC
 TGCCAGGTGTAAGCTCAAATGTTTAGACAGACCGAGTTATGGTTAGGAAGAGCACGA
 GTGAACATGTTCTGGTTTTGCAGTGGTT CAGGAAGGCAGAAAGTTGTTTCACTGTAG
 TTCTGAGATGTACTACCAGCGGCCCTGCTGTAATTTTAGGGTGTATAATGCGGAT
 ACTAGTAAAACAATTGAGTGGTT CATTAAATTTTGAACCTCGAATAATGTTTTTCTAG
 GCATATGTACCGTACCTCTACGTGAAATAAATGCTGTTGAAATAGCATTCGACACCA
 GAATATATGTACCTTACCTAAGAGCTAAGTATTATAATACAACAAGTTGCTGGCCGT
 AAGATTTCTTT

REIVINDICACIONES

1. Un híbrido de sorgo en el que el germoplasma de dicho híbrido de sorgo confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a niveles de dicho uno o más herbicidas que normalmente inhibirían el crecimiento de un híbrido de sorgo, en el que dicho germoplasma de dicho híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, comprende:
- 5 (i) una secuencia que tiene una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO: 1: o
- 10 (ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.
2. El híbrido de sorgo de la reivindicación 1, en el que dicho uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa son ariloxifenoxipropionatos.
3. El híbrido de sorgo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa se introduce en dicho germoplasma de dicho híbrido de sorgo por transgénesis de genes heterólogos.
- 15 4. El híbrido de sorgo de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia comprende la SEQ ID NO: 1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO: 1.
5. Un método para controlar malas hierbas en la proximidad del híbrido de sorgo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
- 20 a) proporcionar uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
- b) aplicar dicho uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa a un campo que contiene dicho híbrido de sorgo, y
- 25 c) controlar las malas hierbas en la proximidad de dicho híbrido de sorgo de tal modo que el crecimiento de las malas hierbas se vea afectado adversamente por la aplicación de dicho uno o más herbicidas y el crecimiento de dicho híbrido de sorgo no se vea afectado adversamente.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho híbrido de sorgo es creado por la incorporación de un gen heterólogo que comprende una o más mutaciones para conferir resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa.
- 30 7. Un método para producir una línea de planta de híbrido de sorgo resistente a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, que comprende:
- a) identificar un germoplasma que confiere dicha resistencia a los herbicidas, en el que dicho germoplasma resistente a los herbicidas procede de un híbrido de sorgo resistente a los herbicidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y
- 35 b) introducir dicho germoplasma en una línea de plantas de sorgo de élite por transformación de genes heterólogos.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho germoplasma resistente a los herbicidas comprende resistencia a uno o más herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa y resistencia a uno o más compuestos de uno o más grupos de herbicidas que no son herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa.
- 40 9. Un método para identificar líneas de plantas de sorgo resistentes a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa, que comprende:
- a) suministrar una muestra de ácidos nucleicos de una planta de sorgo, en el que dicha muestra de ácidos nucleicos comprende:
- 45 (i) una secuencia que tiene al menos una homología del 90% con la SEQ ID NO: 1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO: 1, o
- (ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034,

- b) proporcionar cebadores de amplificación para amplificar una región de una planta de sorgo correspondiente a un gen de acetil-CoA-carboxilasa presente en dicha muestra de ácidos nucleicos,
- c) aplicar dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácidos nucleicos de tal modo que se produzca dicha amplificación de dicha región de dicho gen de acetil-CoA-carboxilasa, y
- 5 d) identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa basándose en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa presentes en dicha muestra de ácidos nucleicos amplificado.
10. Una semilla, tejido vegetal o parte de planta del híbrido de sorgo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha semilla, tejido de planta o parte de planta comprende:
- 10 (i) una secuencia que tiene una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1, siempre que dicha secuencia comprenda una sustitución de nucleótidos de guanina sustituida con citosina en la posición 220 en comparación con la SEQ ID NO: 1, o
- (ii) mutaciones en el gen de acetil-CoA-carboxilasa como las encontradas en ATCC N° PTA-8033 o ATCC N° PYA-8034.
- 15 11. El híbrido de sorgo de la reivindicación 2, en el que dichos herbicidas inhibidores de acetil-CoA-carboxilasa se seleccionan del grupo que consiste en: clodinafop-propargilo, cihalofop-butilo, diclofop-metilo, fenoxaprop-P-etilo, fluazifop-P-butilo, haloxifop-etoxietilo, haloxifop-etotilo, haloxifop-R-metilo, propaquizafop, quizalofop-P-etilo, quizalofop-P-tefurilo y sus combinaciones.

FIGURA 1

