

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 692**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/60** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2004 E 10180406 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2294913**

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

30 Prioridad:

**29.08.2003 US 498895 P**

**30.12.2003 US 533105 P**

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

**02.09.2015**

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA  
AGROPECUARIA (100.0%)**

**Rivadavia 1439**

**01033 Buenos Aires, AR**

72 Inventor/es:

**LIVORE, ALBERTO B.;**

**PRINA, ALBERTO R.;**

**BIRK, IWONA y**

**SINGH, BIJAY**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 544 692 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a herbicidas de imidazolinona

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

30 La sintasa acetohidroxiácida (AHAS; EC 4.1.3.18, sintasa acetolactato (ALS)), codificada por el ácido nucleico AHAS, es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina, e isoleucina (Singh B. K., 1999, *Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine in: Singh B. K. (Ed) Plant amino acids*. Marcel Dekker Inc. New York, New York. Pg 227-247). El AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicida estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (LaRossa RA and Falco SC, 1984, *Trends Biotechnol.* 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner et al., 1984, *Plant Physiol.* 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian and Gerwick, 1989, *Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in (Ed) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. Pg 277-288*), y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al., 1990, *Plant Physiol.* 94: 239-244.). Se utilizan ampliamente los herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea en la agricultura moderna debido a su efectividad en índices de aplicación muy bajos y sin toxicidad relativa en animales. Al inhibir la actividad AHAS, estas familias de herbicidas evitan el crecimiento y desarrollo adicional de plantas susceptibles que incluyen muchas especies de malezas. Diversos ejemplos de herbicidas de imidazolinona comercialmente disponibles son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas sulfonilurea son clorsulfurón, metil metsulfurón, metil sulfometurón, etil clorimurón, metil tifensulfurón, metil tribenurón, metil bensulfurón, nicosulfurón, metil etametsulfurón, rimsulfurón, metil triflursulfurón, triasulfurón, metil primisulfurón, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, etil pirazosulfurón, y halosulfurón.

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

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

Los cultivos resistentes a las imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas se han producido exitosamente utilizando mutagenia de semillas, microesporas, polen, y callos en *Zea mays*, *Brassica napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (Sebastian et al., 1989, *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson et al., 1989, *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse et al., 1991, *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan et al., 1991, *Plant Physiol.* 97: 1044-1050; Mourand et al., 1993, *J. Heredity* 84:91-96). En todos los casos, un gen nuclear parcialmente dominante, único confiere resistencia. También se aislaron previamente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona luego de mutagenia de semilla de *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse et al., 1992, *Plant Physiol.* 100:882-886). Los estudios confirman que la herencia que un gen parcialmente dominante, único confiere resistencia. Con base en los estudios alélicos, los autores concluyen que las mutaciones en las cuatro estirpes identificadas se ubican en el mismo sitio. Uno de los genes de resistencia al cultivo Fidel se designa FS-4 (Newhouse et al., 1992, *Plant Physiol.* 100:882-886).

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

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

También se han descrito plantas de arroz resistentes al herbicida y transgénicas. Se describe un mutante de arroz resistente a un herbicida sulfonilurea, derivado por presión selectiva en el cultivo de tejido de callo, cuando se atribuye resistencia a una enzima mutante AHAS (Terakawa et al., "Rice Mutant Resistant to the Herbicide Bensulfurón Metil (BSM) by in vitro Selection," *Japan. J. Breed.*, 1992 vol. 42:267-275). Se han descrito otras variedades de planta de arroz resistentes al herbicida en patentes y solicitudes de patente, que incluyen WO 97/41218, WO 01/85970 y Patente Estadounidense Nos. 5,545,822, 5,736,628, 5,773,704, Patente Estadounidense No. 5,773,703, 5,952,553, y 6,274,796. La Patente Estadounidense No. 5,545,822 describe una estirpe de plantas de arroz que tienen una resistencia metabólicamente basada a los herbicidas que interfieren con la sintasa de acetohidroxiácido de enzima de planta; es decir, la resistencia al herbicida de estas plantas de arroz no se debe a una enzima AHAS resistente. La WO 97/41218 describe una estirpe de plantas de arroz que tienen una enzima AHAS variante que es resistente a los herbicidas que interfieren con la sintasa acetohidroxiácido de enzima de planta tipo silvestre. Esta estirpe de plantas de arroz se desarrolla al exponer semillas de arroz al etil éster de ácido metanosulfónico de mutágeno (EMS), y detecta millones de progenie para resistencia al herbicida.

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

#### Resumen de la invención

La presente invención provee plantas de arroz que comprenden ácidos nucleicos AHAS de arroz variante no recombinantes, en donde el ácido nucleico AHAS de arroz variante confiere a la planta de arroz tolerancia

5 aumentada a los herbicidas de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo silvestre de la planta de arroz. el ácido nucleico AHAS de arroz variante comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionados de: la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5; la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 11; secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 12; y secuencias de polinucleótidos complementarias a cualquiera de las secuencias de polinucleótidos anteriormente mencionadas. El ácido nucleico AHAS de arroz variante no recombinante codifica un polipéptido de AHAS de arroz variante que comprende una sustitución de alanina a treonina en una posición equivalente a la posición 96 de un polipéptido de AHAS de arroz tipo silvestre, en donde dicha sustitución de alanina a treonina en una posición equivalente a la posición 96 de un polipéptido de AHAS de arroz tipo silvestre es el resultado de la mutagénesis por el tratamiento de semillas con una solución acuosa de azida de sodio 0.001 M a pH 3. También se proveen partes de plantas y semillas de plantas derivadas de las plantas de arroz descritas aquí.

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

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

#### Breve descripción de los dibujos

35 Las Figuras 1A-B muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 2). Las figuras 1C-D muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 4 (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 4). Las figuras 1E-F muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IMINTA 5 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 6). Las figuras 1G-H muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico AHAS IRGA 417 tipo silvestre (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 8).

45 La Figura 2 muestra la alineación de la secuencia cADN del gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe IMINTA 1 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 1), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe IMINTA 4 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 3), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe IMINTA 5 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 5), el gen AHAS amplificado del ADN genómico de la estirpe de arroz tipo silvestre IRGA 417 (SEQ ID NO: 7), y una secuencia consensus del gen AHAS de arroz (SEQ ID NO: 9). El polimorfismo de nucleótido confiere tolerancia a la imidazolinona a las estirpes IMINTA 1, 4, y 5 que se indica en negrilla.

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

La Figura 4A muestra un ejemplo de un cADN de longitud completa de un ácido nucleico variante AHAS (SEQ ID NO: 11) y la Figura 4B muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada por el

gen AHAS mostrado en la Figura 4A (SEQ ID NO: 12), en donde el polipéptido confiere tolerancia a una imidazolinona en comparación con un polipéptido AHAS tipo silvestre.

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

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

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

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

#### Descripción detallada

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

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

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

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

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

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

- La presente invención incluye plantas de arroz que comprende uno o más alelos AHAS, en donde la planta de arroz ha aumentado la tolerancia a un herbicida de imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo silvestre de la planta. Los alelos AHAS pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; una secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 11; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 6; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido complementario con cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente.
- En una realización, la planta de arroz comprende dos ácidos nucleicos AHAS variantes diferentes. En otra realización, la planta de arroz comprende un ácido nucleico AHAS variante, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, por lo menos uno de los ácidos nucleicos AHAS variantes comprenden una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; y SEQ ID NO: 5.
- El herbicida imidazolinona se puede seleccionar de, pero no se limita a, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, o una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY®). Más específicamente, el herbicida imidazolinona se puede seleccionar de, pero no se limita a, ácido 2-(4- isopropil- 4-metil- 5- oxo- 2- imidiazolin- 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-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin- 2-il)-p-toluato 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.
- Las plantas de arroz descritas aquí pueden ser plantas de arroz transgénicas o plantas de arroz no transgénicas. Como se utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula de planta, callo, tejido de planta, o parte de planta, que contiene todo o parte de por lo menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante se integra establemente dentro de un cromosoma o elemento extracromosómico estable, ya que este se pasa en generaciones sucesivas. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que se ha alterado, redispuesto o modificado por ingeniería genética. Ejemplos incluyen cualquier polinucleótido clonado, o polinucleótidos, que se ligan o se unen a las secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones de los polinucleótidos que resultan de los eventos que ocurren en forma natural, tales como mutaciones espontáneas, o de mutagenia no espontánea seguido por siembra selectiva. Las plantas que contienen mutaciones que surgen debido a la mutagenia no espontánea y la siembra selectiva se denominan aquí como plantas no transgénicas y se incluyen en la presente invención.
- Un ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS variante es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene NCIMB, el Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, designada aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 1. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 1 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 1.
- Otro ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41207, designado aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 4. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 4 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 3.
- Otro ejemplo de una estirpe de planta de arroz no transgénica que comprende un ácido nucleico AHAS es la estirpe de planta depositada con el NCIMB que tiene el Número de Designación NCIMB de Depósito de Patente NCIMB 41208, designado aquí como la estirpe de arroz AHAS IMINTA 5. La secuencia de nucleótidos parcial que corresponde al gen IMINTA 5 AHAS se muestra en la SEQ ID NO: 5.
- Los depósitos separados de aproximadamente 2500 semillas cada una de estirpes de trigo tolerantes a la imidazolinona se hicieron con el NCIMB, Aberdeen, Scotland, Reino Unido en Diciembre 22, 2003. Estos depósitos se hicieron de acuerdo con los términos y provisiones del Tratado de Budapest con relación al depósito de los microorganismos. Los depósitos se hicieron para un término de por lo menos treinta años y por lo menos cinco años después que la mayor parte de solicitudes recientes para presentación de una muestra del depósito es recibida por el NCIMB. Las semillas depositadas se acordaron los Números de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, y NCIMB 41208.

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

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

Los términos "cultivo" y "variedad" se refieren a un grupo de plantas dentro de una especie definida por compartir un conjunto común de características o rasgos aceptados por aquellos expertos en la técnica como suficientes para distinguir un cultivo o variedad de otro cultivo o variedad. No existe implicación en el término que todas las plantas de cualquier cultivo dado o variedad serán genéticamente idénticas al gen completo o nivel molecular o aquel de cualquier planta dada será homocigoto a todos los locus. Un cultivo o variedad se considera "genéticamente puro" para un rasgo particular si, cuando el cultivo genéticamente puro o variedad se auto poliniza, toda la progenie contiene los rasgos. Los términos "estirpe de la progenie" o "estirpe" se refieren a un grupo de plantas dentro de un cultivo definido por el intercambio de un conjunto común de características o rasgos aceptados por aquellos expertos en la técnica como suficientes para distinguir una estirpe de la progenie o estirpe de otra estirpe de la progenie o estirpe. No existe implicación en el término que todas las plantas de cualquier estirpe de la progenie dada o estirpe será genéticamente idéntica al gen completo o nivel molecular o aquel de cualquier planta dada será homocigota en todos los locus. Una estirpe de la progenie o estirpe se considera "genéticamente pura" para un rasgo particular si, cuando la genéticamente pura o estirpe de la progenie se auto poliniza, toda la progenie contiene el rasgo. En la presente invención, el rasgo surge de una mutación en un gen AHAS de la planta de arroz o semilla.

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

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

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

También como se utiliza aquí, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, de hebra doble o de hebra sencilla, o un híbrido de los mismos. El término también abarca los híbridos de ARN/ADN. Estos términos también abarcan la secuencia no traducida en los extremos 3' y 5' de la región codificante del gen: por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos de la secuencia en la dirección 5' del extremo 5' de la región codificante y por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos de la secuencia en la dirección 3' del extremo 3' de la región codificante del gen. Menos bases comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otros también se pueden utilizar para par de ribozima, dsARN y antisentido. Por ejemplo,

los polinucleótidos que contienen análogos propina C-5 de uridina y citidina se ha mostrado que une el ARN con alta afinidad y son inhibidores antisentido potentes de la expresión de gen. Otras modificaciones, tales como la modificación de la estructura principal de fosfodiéster, o también se puede hacer el 2'-hidroxi en el grupo de azúcar de ribosa del ARN. Los polinucleótidos y ribozimas antisentido pueden consistir completamente de ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos mezclados. Los polinucleótidos descritos aquí se pueden producir por cualesquier medios, que incluyen preparaciones genómicas, preparaciones de cADN, síntesis *in vitro*, RT-PCR y transcripción *in vitro* o *in vivo*.

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

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

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

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

AHAS de otras plantas de arroz y especies relacionadas. La porción de la región codificante también puede codificar un fragmento biológicamente activo de una proteína AHAS.

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

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

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

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

60 Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de las dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un polipéptido para alineación óptima con el otro polipéptido). Los residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondientes luego se comparan. Cuando una posición en una secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácido como la posición correspondiente en la otra secuencia, luego las moléculas son idénticas en esta posición. El mismo tipo de comparación se puede hacer entre las dos secuencias de ácido nucleico. El

porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de secuencia = números de posiciones idénticas/números de posiciones totales x 100). Para los propósitos de la invención, el porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido se determina utilizando el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Una penalidad de espacio abierto de 15 y una penalidad de extensión de espacio de 6.66 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Una penalidad de espacio abierto de 10 y una penalidad de extensión de espacio de 0.1 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los otros parámetros se establecen en configuraciones predeterminadas.

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

Adicionalmente, se pueden crear ácidos nucleicos AHAS optimizados. Preferiblemente, un ácido nucleico AHAS optimizado codifica un polipéptido AHAS que modula la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona, y más preferiblemente aumenta la tolerancia de la planta a un herbicida de imidazolinona luego de su sobreexpresión de la planta. Como se utiliza aquí, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que se construye genéticamente por ingeniería para aumentar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar los ácidos nucleicos AHAS optimizados de planta, la secuencia de ADN del gen se puede modificar a 1) comprende codones preferidos por genes de planta altamente expresados; 2) comprende un contenido de A+T en la composición base de nucleótido a aquella sustancialmente encontrada en las plantas; 3) forma una secuencia de inicio de planta, 4) elimina las secuencias que provocan desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o aquella forma de estructura secundaria de horquilla o sitios de empalme de ARN. La expresión aumentada de los ácidos nucleicos AHAS en plantas se puede lograr al utilizar la frecuencia de distribución del uso de codón en plantas en general o una planta particular. Los métodos para optimizar la expresión del ácido nucleico en las plantas se puede encontrar en la EPA 0359472; EPA 0385962; Solicitud PCT No. WO 91/16432; Patente de los Estados Unidos No. 5,380,831; Patente de los Estados Unidos No. 5,436,391; Perlack et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; y Murray et al., 1989, nucleic Acids Res. 17:477-498.

Como se utiliza aquí, "frecuencia del uso de codón preferido" se refiere a la preferencia exhibida mediante una célula anfitriona específica en el uso de codones de nucleótido para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, el número de ocurrencia de este codón en el gen se divide por el número total de ocurrencias de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. De forma similar, la frecuencia del uso de codón preferida que se exhibe mediante una célula anfitriona se puede calcular al promediar la frecuencia del uso de codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula anfitriona. Se prefiere que este análisis se limite a los genes que se expresan altamente por la célula anfitriona. El porcentaje de desviación de la frecuencia del uso de codón preferido para un gen sintético de aquel empleado por una célula anfitriona se calcula primero al determinar el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un codón único de aquel de la célula anfitriona seguido al obtener la desviación promedio sobre todos los codones. Como se define aquí, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATG y TGG), en términos generales, la desviación promedio general del uso de codón de un gen optimizado de aquel de una célula anfitriona se calcula utilizando la ecuación  $1A = n = 1 \sum X_n - Y_n X_n$  veces 100 Z en donde  $X_n$  = frecuencia de uso para codón n en la célula anfitriona;  $Y_n$  = frecuencia de uso para codón n en el gen sintético, n representa un codón individual que especifica un aminoácido y el número total de codones es Z. La desviación general de la frecuencia de uso de codón, A, para todos los aminoácidos preferiblemente debe ser menor de aproximadamente 25%, y más preferiblemente menor de aproximadamente 10%.

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

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos AHAS descritos anteriormente, se describen aquí moléculas de ácido nucleico aisladas que son antisentido. Se considera que los polinucleótidos antisentido inhiben la expresión de gen de un polinucleótido objetivo al unir específicamente el polinucleótido objetivo e interferir con la transcripción, empalme, transporte, traducción y/o estabilidad del polinucleótido objetivo.

Los métodos se describen en la técnica anterior para objetivar el polinucleótido antisentido al ADN cromosómico, en un transcripto de ARN primario o a un mRNA procesado. Preferiblemente, las regiones objetivo incluyen los sitios de empalme, codones de inicio de traducción, codones de terminación de traducción, y otras secuencias dentro de la estructura de lectura abierta.

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

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

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

Los vectores de expresión recombinante descritos allí comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas que se van a utilizar para expresión, que se liga operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Con respecto a un vector de expresión recombinante, "ligado operativamente" está destinado a significar que la secuencia de nucleótidos de interés se liga a las secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una

- célula anfitriona cuando el vector se introduce dentro de la célula anfitriona). El término "secuencia reguladora" está destinada a incluir promotores, mejoradores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) y Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Eds. Glick y Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, que incluyen las referencias allí. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células anfitrionas o bajo ciertas condiciones. Se apreciará por aquellos expertos en la técnica el que diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos aquí se pueden introducir dentro de las células anfitrionas para producir por lo tanto polipéptidos o péptidos, que incluyen los polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos como se describe aquí (por ejemplo, polipéptidos AHAS, polipéptidos de fusión, etc.).
- Los polipéptidos AHAS se pueden expresar en plantas y células de plantas tales como células de plantas unicelulares (tales como algas) (véase Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3):239-251 y referencias allí) y células de planta de plantas mayores (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cultivo). Un polinucleótido AHAS se puede "introducir" dentro de una célula de planta por cualquier medio, que incluye transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo de partícula, agroinfección, biolísticos y similares.
- Los métodos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas que incluyen células de plantas se pueden encontrar en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, Ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Como tolerancia aumentada a los herbicidas de imidazolinona es un rasgo general que se desea heredar en una amplia variedad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, mandioca, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas como papa, tabaco, berenjena, y tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, plantas arborícolas (café, cacao, té), especies de Salix, árboles (aceite de palma, de coco), hierbas perennes y cultivos forrajeros, estas plantas de cultivo también se prefieren plantas objetivo para una ingeniería genética. Los cultivos forrajeros incluyen, pero no se limitan a, Pasto de Trigo, Alpiste, Cebadilla Criolla, Césped de Centeno Silvestre, Poa, Pasto Ovillo, Alfalfa, Salfoin, Loto, Trébol Híbrido, Trébol Rojo, y Trébol de Olor.
- La transfección de un polinucleótido AHAS dentro de una planta se puede lograr mediante la transferencia de gen mediado por *Agrobacterium*. Un método de transformación conocido por aquellos expertos en la técnica es la inmersión de una planta florecida dentro de una solución de *Agrobacteria*, en donde la *Agrobacteria* contiene el ácido nucleico AHAS, seguido por siembra de los gametos transformados. La transformación de la planta mediada por *Agrobacterium* se puede realizar utilizando, por ejemplo, la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz and Schell, 1988, Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Clontech) *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación se puede realizar mediante transformación estándar y técnicas de regeneración (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res.13: 4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. y Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede ser transformados por medio de transformación de cotiledóneas o hipocotiledóneas. (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8: 238-242; De Block et al., 1989, Plant Physiol. 91: 694-701). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y selección de plantas depende del vector binario y la cepa *Agrobacterium* utilizada para transformación. La selección de colza se realiza normalmente utilizando canamicina como marcador de planta seleccionable. Se puede realizar la transferencia del gen mediado por *Agrobacterium* al lino utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova et al., 1994, Plant cell Report 13:282-285. Adicionalmente, la transformación de la soja se puede realizar utilizando por ejemplo una técnica descrita en la Patente Europea No. 0424 047, Patente Estadounidense No. 5,322,783, Patente Europea No. 0397 687, Patente Estadounidense No. 5,376,543, o Patente Estadounidense No. 5,169,770. La transformación del maíz se puede lograr mediante bombardeo de partícula, retoma de AADN mediada por polietilenglicol o por medio de la técnica de fibra de carburo de sílice. (Ver, por ejemplo, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de la transformación de maíz se encuentra en la Patente Estadounidense No. 5,990,387, y un ejemplo específico de la transformación de trigo se puede encontrar en la Solicitud PCT No. WO 93/07256.
- El polinucleótido AHAS introducido se puede mantener en la célula de planta establemente si se incorpora dentro de un replicón autónomo no cromosómico o se integra en los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido AHAS introducido puede estar presente en un vector no replicante extra-cromosómico y puede expresar transitoriamente o ser transitoriamente activo. Se puede crear un microorganismo recombinante homólogo en donde el polinucleótido AHAS se integra dentro de un cromosoma, se prepara un vector que contiene por lo menos una porción de un gen AHAS en el que se ha introducido una eliminación, adición o sustitución para alterar por lo tanto, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen AHAS endógeno y para crear un gen AHAS.

Para crear una mutación puntual por medio de recombinación homóloga, se pueden utilizar híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 y Kmiec, 1999, *Gene therapy American Scientist* 87(3):240-247). Otros procedimientos de recombinación homólogos en las especies *Oryza* también se conocen bien en la técnica y se contemplan para uso aquí.

5 En el vector de recombinación homólogo, el gen AHAS se puede flanquear en sus extremos 5' y 3' mediante una molécula de ácido nucleico adicional del gen AHAS para permitir la recombinación homóloga que ocurre entre el gen AHAS exógeno llevado por vector y un gen AHAS endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula agregada nucleica AHAS flanqueada adicional es de longitud suficiente para recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, varios cientos de pares base hasta kilobases de ADN de flanqueo (ambos en los extremos 10 5' y 3') se incluyen en el vector (Ver, por ejemplo, Thomas, K. R., and Capecchi, M. R., 1987, *Cell* 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homólogos o Strepp et al., 1998, *PNAS*, 95(8): 4368-4373 para recombinación con base en cADN en *Physcomitrella patens*). Sin embargo, debido a que el gen AHAS difiere normalmente del gen AHAS en muy pocos aminoácidos, una secuencia de flanqueo no siempre es necesaria. El vector de recombinación homólogo se introduce dentro de un microorganismo o célula de planta (por ejemplo, por 15 medio de polietilenglicol mediado por ADN), y células en las que el gen AHAS introducido se ha recombinado homológamente con el gen AHAS endógeno se seleccionan utilizando técnicas conocidas en el arte.

Se pueden producir microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permite la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen AHAS en un vector puesto bajo el control del operón lac permite la expresión del gen AHAS solo en la presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son 20 bien conocidos en la técnica.

Si está presente en un vector de no replicación extra-cromosómico o un vector que se integra dentro de un cromosoma, el polinucleótido AHAS reside preferiblemente en un casete de expresión de planta. Un casete de expresión de planta contiene preferiblemente las secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de gen en células de plantas que se ligan operativamente ya que cada secuencia puede cumplir su función, por ejemplo, la 25 terminación de la transcripción mediante señales de poliadenilación. La señales de poliadenilación preferidas son aquellas originadas de t-ADN *Agrobacterium tumefaciens* tal como el gen 3 conocido como sintasa octopina del plásmido Ti pTIACH5 (Gielen et al., 1984, *EMBO J.* 3:835) o equivalentes funcionales de los mismos, pero también son adecuados todos los otros terminados funcionalmente activos en las plantas. Como expresión del gen de planta no se limita muy frecuentemente en niveles transcripcionales, un casete de expresión de planta contiene preferiblemente otras secuencias ligadas operativamente como mejoradores traduccionales tales como la secuencia saturada que contiene la secuencia líder no traducida 5 del virus de mosaico de tabaco que mejora el polipéptido por 30 relación de ARN (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión de planta incluyen aquellos detallados en: Becker, D. et al., 1992, *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border*, *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984, *Binary Agrobacterium vectors for plant transformación*, *Nucl. Acid. Res.* 12:8711-8721; and *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Vol.1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

La expresión del gen de planta se debe ligar operativamente a un promotor apropiado que confiere expresión de gen en una forma preferida de tejido o preferida de tipo celular, oportuna. Los promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen cualquier promotor que es capaz de iniciar la transcripción en una célula de 40 planta. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a aquellos que se pueden obtener de plantas, virus de planta y bacterias que contienen genes que se expresan en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, preferido de etapa de desarrollo, preferido de tipo celular, preferido de tejido o preferido de órgano. Los promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de condiciones. Ejemplos de 45 promotores constitutivos incluyen los promotores CaMV 19S y 35S (Odell et al., 1985, *Nature* 313:810-812), el promotor sX CaMV 35S (Kay et al., 1987, *Science* 236:1299-1302) el promotor Sep1, el promotor de actina de arroz (McElroy et al., 1990, *Célula de planta* 2:163-171), el promotor de actina *Arabidopsis*, el promotor ubiquitina (Christensen et al., 1989, *Plant Molec. Biol.* 18:675-689); pEmu (Last et al., 1991, *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588), el promotor 35S mosaico de la escrofularia, el promotor Smas (Velten et al., 1984, *EMBO J.* 3:2723-2730), el promotor GRP1-8, el promotor de deshidrogenasa de alcohol cinnamilo (Patente Estadounidense No. 5,683,439), 50 promotores del T-ADN de *Agrobacterium*, tales como sintasa mannopina, sintasa nopalina, y sintasa octopina, la subunidad pequeña del promotor de carboxilasa debifosfato de ribulosa (ssu-RUBISCO), y similares.

Los promotores inducibles son activos bajo ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, y similares. Por ejemplo, el promotor hsp80 de *Brassica* se induce por choque con calor; el promotor PPK se induce por luz; el promotor PR- 1 de tabaco, *Arabidopsis*, y maíz son inducibles mediante infección con un patógeno; y el promotor Adh1 se induce por hipoxia y tensión por frío. La expresión de gen de planta también se puede facilitar por medio de un promotor inducible (Para revisión, ver Gatz, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea la expresión del gen específico de tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible de ácido salicílico (Solicitud PCT No. WO 95/19443), un 55

promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al., 1992, Plant J. 2:397-404) y un promotor inducible por etanol (Solicitud PCT No. WO 93/21334).

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

Otros promotores preferidos de órgano o preferidos de tejido adecuados incluyen el promotor de gen napina de colza (Patente Estadounidense No. 5,608,152), el promotor USP de Vicia faba (Baeumlein et al., 1991, Mol Gen Genet 225(3):459-67), el promotor oleosina de Arabidopsis (Solicitud PCT No. WO 98/45461), el promotor faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente Estadounidense No. 5,504,200), el promotor Bce4 de Brassica (Solicitud PCT No. WO 91/13980), o el promotor de legúmina B4 (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2):233-9), así como también promotores que confieren expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Los promotores adecuados para notar son el promotor de gen lpt2 o lpt1 de cebada (Solicitud PCT No. WO 95/15389 y Solicitud PCT No. WO 95/23230) o aquellos descritos en la Solicitud PCT No. WO 99/16890 (promotores de gen hordeína de cebada, gen de glutelina de arroz, gen orizina de arroz, gen prolamina de arroz, gen gliadina de trigo, gen glutelina de trigo, gen glutelina de avena, gen kasirin de sorgo, y gen secalina de centeno).

Otros promotores útiles en los casetes de expresión descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, el promotor de proteína de unión a/b de clorofila principal, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor  $\beta$ -conglucina, el promotor napina, el promotor de lectina de soja, el promotor de zeína 15kD de maíz, el promotor de zeína 22kD, el promotor de zeína 27kD, el promotor de g-zeína, los promotores cerosos, reducido 1, reducido 2, y bronce, el promotor Zm13 (Patente Estadounidense No. 5,086,169), los promotores poligalacturonasa de maíz (PG) (Patente Estadounidense Nos. 5,412,085 y 5,545,546), y el promotor SGB6 (Patente Estadounidense No. 5,470,359), así como también promotores sintéticos u otros promotores naturales.

La flexibilidad adicional en controlar la expresión de gen heteróloga en plantas se puede obtener al utilizar los dominios de unión de ADN y los elementos de respuesta de fuentes heterólogas (es decir, dominios de unión de ADN de fuentes de no planta). Un ejemplo de tal dominio de unión de ADN heterólogo es el dominio de unión de ADN LexA (Brent and Ptashne, 1985, Cell 43:729-736).

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

Una célula anfitriona descrita aquí, tal como una célula anfitriona procariótica o eucariótica en cultivo, se puede utilizar para producir (es decir, expresar) un polinucleótido AHAS. De acuerdo con lo anterior, se describen aquí los métodos para producir los polipéptidos AHAS utilizando las células anfitrionas. El método puede comprender cultivar la célula anfitriona descrita aquí (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido AHAS, o dentro del que se ha introducido el genoma de un gen que codifica el polipéptido AHAS o tipo silvestre) en un medio adecuado hasta que se produce el polipéptido AHAS. El método puede comprender adicionalmente aislar los polipéptidos AHAS del medio o la célula anfitriona. Se describen aquí los polipéptidos AHAS aislados adicionales, y las porciones biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o porción biológicamente activa del mismo está libre de algún material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinantes, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido AHAS en el que se separa el polipéptido de algunos de los componentes celulares de las células en las que se produce de forma natural o recombinantemente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" puede incluir

preparaciones de un polipéptido AHAS que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de material no AHAS (también denominado aquí como "polipéptidos contaminantes"). Más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de material no AHAS, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de material no AHAS, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de material no AHAS.

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

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

30 Adicionalmente, se describen aquí los métodos para modificar la tolerancia de una planta a un herbicida de imidazolinona que comprende modificar la expresión de uno o más ácidos nucleicos AHAS variantes. La tolerancia de la planta al herbicida imidazolinona se puede aumentar o reducir cuando se logra al aumentar o reducir la expresión de un polinucleótido AHAS, respectivamente. Preferiblemente, la tolerancia de la planta al herbicida imidazolinona se aumenta al aumentar la expresión de un polinucleótido AHAS. El ácido nucleico AHAS variante puede codificar un polipéptido AHAS variante que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se  
35 compara con un polipéptido AHAS tipo natural. La expresión de un polinucleótido AHAS se puede modificar mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. Se pueden utilizar métodos para aumentar la expresión de los polinucleótidos AHAS cuando la planta es transgénica o no transgénica. En casos cuando la planta sea transgénica, la planta se puede transformar con un vector que contiene cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican AHAS descritos anteriormente, o la planta se puede transformar con un promotor que dirige la expresión de los polinucleótidos AHAS endógenos en la planta, por ejemplo. Tal promotor puede ser específico de tejido o regulado por desarrollo.

40 Alternativamente, las plantas no transgénicas pueden tener expresión de polinucleótido AHAS endógeno modificado por inducir un promotor natural. La expresión de los polinucleótidos que comprenden una secuencia de polinucleótidos como se define en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 11 en plantas objetivo se puede llevar a cabo por, pero no se limita a, uno de los siguientes ejemplos: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducido por químico, y (c) sobreexpresión del promotor construido por ingeniería con por ejemplo los factores de transcripción derivados de dedo de zinc (Greisman & Pabo, 1997, *Science* 275:657).

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

55 Como se describió en más detalles adelante, las plantas producidas por los métodos descritos aquí pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas se pueden seleccionar de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, papa, tabaco, berenjena, tomate, especies *Vicia*, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies *Salix*, aceite de palma, coco, pastos perennes y cultivos forrajeros, por ejemplo. Los cultivos forrajeros incluyen, pero no se limitan a, Pasto de Trigo, Alpiste, Cebadilla Criolla, Césped de Centeno Silvestre, Poa, Pasto Ovillo, Alfalfa, Salfoin, Loto, Trébol

Híbrido, Trébol Rojo, y Trébol de Olor. En cada uno de los métodos descritos anteriormente, la célula de planta incluye, pero no se limita a, un protoplasto, célula que produce gameto, y una célula que se regenera en una planta completa. Como se utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, callo de planta, callos, tejido de planta, o parte de planta, que contiene todo o parte de por lo menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante se integra establemente dentro de un cromosoma o elemento extra-cromosómico estable, ya que se pasa en generaciones sucesivas.

El cultivo de tejido de diversos tejidos de arroz y la regeneración de plantas de los mismos es bien conocida y se publica ampliamente. Por ejemplo, se puede hacer referencia a Chu, Q. R., et al., (1999) "Use of bridging parents with high anther culturability to improve plant regeneration and breeding value in rice", *Rice Biotechnology Quarterly* 38: 25-26; Chu, Q. R., et al., (1998), "A novel plant regeneration medium for rice anther culture of Southern U.S. crosses", *Rice Biotechnology Quarterly* 35:15-16; Chu, Q. R., et al., (1997), "A novel basal medium for embryogenic callus induction of Southern US crosses", *Rice Biotechnology Quarterly* 32:19-20; y Oono, K, "Broadening the Genetic Variability By Tissue Culture Methods", *Jap. J. Breed.* 33 (Suppl.2), 306-307, illus. 1983.

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

Adicionalmente se proporciona aquí un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende aplicar un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de arroz, en donde la planta de arroz ha aumentado la tolerancia el herbicida imidazolinona cuando se compara con una variedad tipo natural de la planta de arroz y en donde la planta de arroz tolerante a la imidazolinona comprende por lo menos un ácido nucleico AHAS de arroz variante no recombinante. El ácido nucleico AHAS variante codifica un polipéptido AHAS variante que comprende una mutación de alanina a treonina cuando se compara con un polipéptido AHAS tipo natural. La mutación está en el residuo de aminoácido que corresponde la posición 96 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12. Al proporcionar plantas de arroz que tienen tolerancia aumentada a la imidazolinona, se pueden emplear una amplia variedad de formulaciones para proteger las plantas de arroz de las malezas, con el fin de mejorar el crecimiento de la planta y reducir la competición para los nutrientes. Un herbicida de imidazolinona se puede utilizar en sí mismo para el control de malezas pro-emergencia, post-emergencia, preplantación, y controlando la plantación de malezas en áreas que rodean las plantas de arroz descritas aquí o se puede utilizar una formulación del herbicida imidazolinona que contiene otros aditivos. También se puede utilizar el herbicida imidazolinona como un tratamiento de semilla. Los aditivos encontrados en una formulación de herbicida de imidazolinona incluyen otros herbicidas, adyuvantes, agentes de rociado, agentes de pegajosidad, agentes estabilizantes, o similares. La formulación de herbicida imidazolinona puede ser una preparación húmeda o seca o y puede incluir, pero no se limita a, polvos que pueden fluir, concentrados emulsificables y concentrados líquidos. El herbicida imidazolinona y las formulaciones de herbicida se pueden aplicar de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, mediante rociado, irrigación, pulverización, o similares.

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

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Mutagenia y selección de estirpes de arroz tolerantes a la imidazolinona

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

Las semillas M1 se plantan en el vivero con un plantador de semilla experimental Wintersteiger en un índice de 50 plantas por metro cuadrado. Las estirpes revisadas de una variedad tipo silvestre IRGA 417 se plantan con un plantador de tipo de empuje. Las estirpes se cultivan bajo condiciones de inundación hasta madurez (26 % de

humedad de grano) y se cosechan a granel. La semilla recolectada (M2) se seca en un secador convectivo durante 14 horas a 45° C. Las semillas M2 se mantienen en almacenamiento cerrado hasta la siguiente estación.

- 5 La semilla de las plantas M1 (semilla M2) se planta con un plantador de semilla experimental para grandes áreas (AVEC) en un índice de 50 kg/ha. Un estimado de 3 ha., que se ha establecido finalmente comprende una población de  $6 \times 10^6$  plantas. Las estirpes revisadas de una variedad tipo silvestre IRGA 417 se plantan con un plantador de tipo de empuje. El área completa se somete a una presión de selección con una mezcla de dos herbicidas imidazolinona. Se realizan tres aplicaciones separadas de los herbicidas imidazolinona con un rociador comercial en diferentes direcciones para evitar cualquier escape y dar como resultado un tratamiento 3X. Un volumen total de 222 l/ha se rocía a 50 psi, con boquillas Teejets 8002, en cada aplicación de herbicidas imidazolinona.
- 10 El índice del tratamiento 1X es una mezcla de Arsenal (imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (imazapic 24.85 g a.i/ha) en una solución de agua con un surfactante no iónico (Citowet) en un índice de 0.25% (v/v). Las aplicaciones se realizan en la cuarta etapa de hoja de las plantas de arroz. No se registra lluvia durante los 7 días después de los tratamientos.
- 15 Se hacen observaciones en momentos regulares para supervisar el área completa. Después de 90 días, los individuos que sobreviven se marcan y se trasplantan al invernadero para multiplicación asexual y producción de semilla aumentada. Se cultivan un total de 10 plantas individuales, y la semilla se cosecha y se seca en un incubador de semilla durante 7 días a 50 °C. No sobreviven plantas de las estirpes revisadas después de tratamiento con herbicida.
- 20 La semilla de las plantas M2 seleccionadas se plantan en recipientes individuales bajo condiciones de invernadero. Se aplica un tratamiento 2X con un Rociador portátil R&D, dividido en dos aplicaciones de un índice 1X de Arsenal (Imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (Imazapic 24.85 g a.i/ha) en una solución de agua con un surfactante no iónico (Citowet) en el índice de 0.25 % (v/v). Las plantas se cultivan hasta madurez (26 % de humedad de grano) y se cosecha manualmente. La semilla recolectada se somete a un tratamiento de reposo ruptura de 7 días a 50° C y se prepara para una plantación de estación tardía en la región norte.
- 25 La semilla de las poblaciones de tres plantas tolerantes seleccionadas que crecen en invernadero se planta en el campo en Las Palmas Chaco para aumentar la semilla. Las tres poblaciones identificadas como tolerantes a los herbicidas de imidazolinona se nombran IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5. Estas se plantan con una planta de arroz comercial en el índice de 50 kg/ha. Se aplica un tratamiento de 2X herbicidas de imidazolinona, Arsenal (Imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (Imazapic 24 g a.i/ha) en una solución de agua con un surfactante no iónico (Citowet)
- 30 en el índice de 0.2 5% (v/v) se aplica de cuatro a cinco etapas de hoja de las plantas de arroz. No se observan síntomas fitotóxicos en ninguna de las tres poblaciones. Las tres poblaciones produjeron la parcela tratada con un herbicida para pasto regular. No se observan segregantes y se produce una población altamente homogénea en rasgos tolerantes y agronómicos.

## Ejemplo 2

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

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

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

## Ejemplo 3

- 55 Tolerancia a los herbicidas AHAS proporcionados por IMINTA 1

- 5 Se realiza un ensayo de campo con la estirpe mutante IMINTA 1 y la estirpe IRGA 417, que compara el desempeño en la presencia y ausencia de tratamiento de imidazolinona. El tratamiento de imidazolinona 1 X consiste de Arsenal (Imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (Imazapic 24,85 g a.i/ha) en una solución de agua con un surfactante no iónico (Citowet) en el índice de 0.25 %. Las variedades y tratamientos se establecen como se indica en la Figura 5 como un diseño de bloque aleatorio con tres replicaciones.
- Los resultados del tratamiento se establecen en figura 6. No existe diferencia estadística entre los tratamientos en el número de plantas/m<sup>2</sup>, mostrando así que la aplicación del herbicida 3X no tiene efecto perjudicial. Las estirpes de revisión susceptibles se siembran a lo largo de las parcelas que no sobreviven a tratamiento herbicida. El mayor valor en las parcelas IMINTA 3X después de tratamiento puede ser debido al ahijamiento.
- 10 La producción de grano y los componentes de producción se evalúan para entender el efecto del tratamiento en las diferentes etapas fisiológicas, y se muestran en las figuras 7 y 8, respectivamente. No se encuentran diferencias estadísticas entre los tratamientos, aunque los valores absolutos muestran un mejor desempeño del IMINTA 1 3X. El análisis de los componentes de producción muestra un número mayor de panículas por metro cuadrado y espiguillas/panícula en las parcelas IMINTA 1 3X que han determinado una producción mayor que los otros
- 15 tratamientos. Adicionalmente, se observa un porcentaje de blanqueo fuerte debido a las bajas temperaturas antes y durante florecimiento. Los días y las noches frías reducen la producción de la semilla y son la razón para las producciones promedio bajas.
- Aunque no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, existe un valor de producción de grano mayor de IMINTA 1 3X. Como se mencionó, se encuentran más panículas y espiguillas/ panícula en estas parcelas.
- 20 Observaciones en otras estirpes tolerantes bajo tratamientos de aplicación mayores muestran mayor ahijamiento y el número de espiguillas/ panícula sugiere un efecto posible de los herbicidas en el proceso de diferenciación de tallos y flores.
- Las variedades IMINTA 4 y IMINTA 5 también se prueban en el campo en la misma forma como la variedad IMINTA 1. La producción de grano y los componentes de producción se encuentra que son comparables con la variedad
- 25 IMINTA 1.
- Debido a que la tolerancia en IMINTA 1, IMINTA 4, y IMINTA 5 se debe a una mutación en la enzima AHAS que la hace tolerante a la inhibición mediante los herbicidas de imidazolinona, la actividad *in vitro* del AHAS extraído de plantas tipo silvestre (no tienen la mutación para tolerancia) se compara con la actividad *in vitro* de AHAS extraído de plantas tolerantes en la presencia de diversas concentraciones de un herbicida de imidazolinona.
- 30 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA
- LIVORE, ALBERTO B.
- PRINA, ALBERTO R.
- BIRK, IWONA
- 35 SINGH, BIJAY
- <120> PLANTAS DE ARROZ QUE TIENEN TOLERANCIA AUMENTADA A HERBICIDAS DE IMIDAZOLINONA
- <130> PF 55841
- <150> 60/498,895
- <151> 2003-08-29
- 40 <150> 60/533,105
- <151> 2003-12-30
- <160> 12
- <170> PatentIn Ver. 3.2
- <210> 1
- 45 <211> 1940

ES 2 544 692 T3

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 1

```

ccttgtccgc cgccgcgacg gccaaagaccg gccgtaagaa ccaccagcga caccacgtct 60
tccccgctcg aggccgggtg ggggcggcgg cggtcagggtg ctcggcgggtg tccccgggtca 120
ccccgcgctc cccggcgccc cccggccacgc cgctccggcc gtgggggccc gccgagcccc 180
gcaagggcgc ggacatcctc gtggaggcgc tggagcgggtg cggcgtcagc gacgtgttcg 240
cctaccgggg cggcacgtcc atggagatcc accaggcgtc gacgcgctcc ccggtcatca 300
ccaaccacct cttccgccac gagcagggcg aggcgttcgc ggcgtccggg tacgcgcgcg 360
cgtccggccc cgctgggggtc tgcgtcgcca cctccggccc cggggcaacc aacctcgtgt 420
ccgcgctcgc cgacgcgctg ctcgactccg tcccgatggt cgccatcacg ggccaggctc 480
cccgcgcat gatcggcacc gacgccttc aggagacgcc catagtcgag gtcacccgct 540
ccatcaccaa gcacaattac cttgtccttg atgtggagga catccccgcg gtcatacagg 600
aagccttctt cctcgcgtcc tcgggcccgc ctggccgggt gctggtcgac atccccagg 660
acatccagca gcagatggct gtgccagtct gggacacctc gatgaatcta ccgggggtaca 720
ttgcacgcct gcccaagcca cccgcgacag aattgcttga gcaggctctg cgtctggttg 780
gcgagtcacg gcgccgatt ctctatgctg gtggggctg ctctgcatct ggtgatgaat 840
tgcgcgggtt tgttgagctg accggcatcc cagttacaac cactctgatg ggcctcggca 900
atctccccag tgatgatccg ttgtccctgc gcatgcttgg gatgcatggc acggtgtacg 960
caaattatgc ggtggataag gctgacctgt tgcttgcat tggcgtgcgg tttgatgatc 1020
gtgtgacagg gaaaattgag gcttttgcaa gcagggccaa gattgtgcac attgacattg 1080
atccagcggg gattggaaag aacaagcaac cacatgtgtc aatttgcgca gatgttaagc 1140
ttgctttaca ggccttgaat gctctgctag accagagcac aacaaagaca agttctgatt 1200
ttagtgcgtg gcacaatgag ttggaccagc agaagagggg gtttcctctg ggggtacaaga 1260
cttttggtga agagatccca ccgcaatatg ctattcaggt gctggatgag ctgacgaaag 1320
gggaggcaat catcgctact ggtgttggac agcaccagat gtgggcggca caatattaca 1380
cctacaagcg gccacggcag tggctgtctt cggctggtct gggcgcaatg ggatttgggc 1440
tgcctgctgc agctgggtgt tctgtggcta acccaggtgt cacagttgtt gatattgatg 1500
gggatggtag cttcctcatg aacattcagg agttggcatt gatccgcatt gagaacctcc 1560
cggtgaaggt gatgggttg aacaaccaac atttgggtat ggttgtgcaa tgggaggata 1620
ggttttacaa ggcaaatagg gcgcatacat acttgggcaa cccagaatgt gagagtgaga 1680
tatatccaga tttgtgact attgctaaag ggttcaatat tcctgcagtc cgtgtaacaa 1740
agaagagtga agtccgtgcc gccatcaaga agatgctcga taccacaggg ccatacttgt 1800
tggatatcat cgtcccacac caggagcatg tgctgcctat gatcccaagt gggggcgcgt 1860
tcaaggacat gatcctggat ggtgatggca ggactgtgta ttaatctata atctgtatgt 1920
tggcaagca ccagcccggc

```

5 <210> 2

<211> 633

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

ES 2 544 692 T3

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

ES 2 544 692 T3

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

<210> 3

<211> 1925

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 3

```

ccttgtccgc cgccgcgacg gccaaagaccg gccgtaagaa ccaccagcga caccacgtct 60
ttcccgcctc aggcgcgggtg ggggcggcgg cggtcagggtg ctccggcggtg tccccgggtca 120
ccccgcctgc cccggcgcgg cccggccacgc cgctccggcc gtggggggccg gccgagcccc 180
gcaaggcgcg ggacatcctc gtggagggcg tggagcgggtg cggcgtcagc gacgtgttcg 240
cctaccgggg cggcacgtcc atggagatcc accaggcgtc gacgcgctcc ccggtcatca 300
ccaaccacct cttccgccac gagcaggcgg aggcgttcgc ggcgtccggg tacgcgcgcg 360
cgtccggcgg cgtccggggc tgcgtcgcca cctccggccc cggggcaacc aacctcgtgt 420
ccgcgctcgc cgacgcgctg ctcgactccg tcccgatggt cgccatcacg ggccaggctc 480
cccgcgcgat gatcggcacc gacgccttcc aggagacgcc catagtccgag gtcacccgct 540
ccatcaccaa gcacaattac cttgtccttg atgtggagga catccccgcg gtcatacagg 600
aagccttctt cctcgcgtcc tcggggcgtc ctggcccgtt gctggtcgac atccccagg 660
acatccagca gcagatggct gtgccagtct gggacacctc gatgaatcta ccggggtaca 720
ttgcacgcct gcccaagcca cccgcgacag aattgcttga gcaggctctg cgtctggttg 780
gcgagtcacg gcgcccgat ctctatgtcg gtgggtgctg ctctgcatct ggtgatgaat 840
tgcgcggggt tgttgagctg accggcatcc cagttacaac cactctgatg ggctcggca 900
atccccag tgatgatccg ttgtccctgc gcatgcttgg gatgcatggc acggtgtacg 960
caaattatgc ggtggataag gctgacctgt tgcttgcat tggcgtgagg tttgatgatc 1020
gtgtgacagg gaaaattgag gcttttgcaa gcaggggcaa gattgtgcac attgacattg 1080
atccagcggg gattgaaag aacaagcaac cacatgtgtc aatttgcgca gatgttaagc 1140
ttgctttaca gggcttgaat gctctgctag accagagcac aacaaagaca agttctgatt 1200
ttagtgcgtg gcacaatgag ttggaccagc agaagaggga gtttcctctg gggtaacaaga 1260
cttttggtga agagatccca ccgcaatag ctattcaggt gctggatgag ctgacgaaag 1320
gggaggcaat catcgtact ggtgttgac agcaccagat gtggggcggca caatattaca 1380
cctacaagcg gccacggcag tggctgtctt cggctggtct gggcgcaatg ggatttgggc 1440
tgcctgctgc agctgggtct tctgtggcta acccagggtg cacagttgtt gatattgatg 1500
gggatggtag cttcctcatg aacattcagg agttggcatt gatccgcatt gagaacctcc 1560
cggtgaaggat gatggtgttg aacaaccaac atttgggtat ggttgtgcaa tgggaggata 1620
ggttttacaa ggcaaatagg gcgcatacat acttgggcaa cccagaatgt gagagtgaga 1680
tatatccaga ttttgtgact attgctaaag ggttcaatat tcctgcagtc cgtgtaacaa 1740
agaagagtga agtccgtgcc gccatcaaga agatgctcga taccacagg ccatacttgt 1800
tggatatcat cgtcccacac caggagcatg tgctgcctat gatcccaagt gggggcgcgt 1860
tcaaggacat gatcctggat ggtgatggca ggactgtgta ttaatctata atctgtatgt 1920
tgga 1925

```

<210> 4

<211> 633

10 <212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 4

ES 2 544 692 T3

Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg  
 1 5 10 15  
 His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg  
 20 25 30  
 Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala  
 35 40 45  
 Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp  
 50 55 60  
 Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala  
 65 70 75 80



ES 2 544 692 T3

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

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

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro  
 450 455 460

Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu  
 465 470 475 480

Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val  
 485 490 495

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala  
 500 505 510

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

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala  
 530 535 540

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile  
 545 550 555 560

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

Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu  
 580 585 590

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu  
 595 600 605

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile  
 610 615 620

Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr  
 625 630

<210> 5

<211> 1916

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 5

ES 2 544 692 T3

gcggccgcgg cccccacctt gtccgcccgc gcgacggcca agaccggccg taagaaccac 60  
 cagcgacacc acgtctttcc cgctcgaggc cgggtggggg cggcggcggg caggtgctcg 120  
 gcggtgtccc cggtcacccc gccgtccccg gcgcccggcg ccacgccgct ccggccgtgg 180  
 gggccggccg agccccgcaa gggcgcgagc atcctcgtgg aggcgctgga gcggtgcggc 240  
 gtcagcgacg tgttcgccta cccgggcggc acgtccatgg agatccacca ggcgctgacg 300  
 cgctccccgg tcatcaccaa ccacctcttc cgccacgagc agggcgaggc gttcgcggcg 360  
 tccgggtacg cgcgcgcgtc cggccgcgtc ggggtctgcg tcgccacctc cggccccggg 420  
 gcaaccaacc tcgtgtccgc gtcgcccgac gcgctgctcg actccgctcc gatggtcgcc 480  
 atcacgggcc aggtcccccg ccgcatgatc ggcaccgacg ccttccagga gacgcccata 540  
 gtcgaggtca cccgctccat caccaagcac aattaccttg tccttgatgt ggaggacatc 600  
 cccgcgctca tacaggaagc cttcttcctc gcgtcctcgg gccgtcctgg cccggtgctg 660  
 gtcgacatcc ccaaggacat ccagcagcag atggctgtgc cagtctggga cacctcgatg 720  
 aatctaccgg ggtacattgc acgcctgccc aagccaccgg cgacagaatt gcttgagcag 780

gtcttgcgtc tggttggcga gtcacggcgc cegattctct atgtcgggtg tggctgctct 840  
 gcatctgggtg atgaattgcy ccggtttggt gagctgaccg gcatcccagt tacaaccact 900  
 ctgatgggccc tcggcaatth ccccagtgat gatccgttgt ccctgcgcat gcttgggatg 960  
 catggcacgg tgtacgcaaa ttatgcgggtg gataaggctg acctgttgct tgcatttggc 1020  
 gtgcggtttg atgatcgtgt gacagggaaa attgaggctt ttgcaagcag ggccaagatt 1080  
 gtgcacattg acattgatcc agcggagatt ggaaagaaca agcaaccaca tgtgtcaatt 1140  
 tgcgcagatg ttaagcttgc ttacagggc ttgaatgctc tgctagacca gagcacaaca 1200  
 aagacaagtt ctgattttag tgcgtggcac aatgagttgg accagcagaa gagggagttt 1260  
 cctctggggg acaagacttt tggtagaag atccccaccg aatatgctat tcaggtgctg 1320  
 gatgagctga cgaaggggga ggcaatcadc gctactggtg ttggacagca ccagatgtgg 1380  
 gcggcacaat attacaccta caagcggcca cggcagtggt tgtcttcggc tggctctggc 1440  
 gcaatgggat ttgggctgcc tgctgcagct ggtgcttctg tggctaacc aggtgtcaca 1500  
 gttggtgata ttgatgggga tggtagcttc ctcataaaca ttcaggagtt ggcattgatc 1560  
 cgcattgaga acctcccggg gaaggtgatg gtgttgaaca accaacattt gggataggtt 1620  
 gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggca aatagggcgc atacatactt gggcaacca 1680  
 gaatgtgaga gtgagatata tccagattht gtgactattg ctaaagggtt caatattcct 1740  
 gcagtcctg taacaaagaa gagtgaagtc cgtgccgcca tcaagaagat gctcgatacc 1800  
 ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccacaccagg agcatgtgct gcctatgatc 1860  
 ccaagtgggg gcgcattcaa ggacatgatc ctggatggtg atggcaggac tgtgta 1916

<210> 6

<211> 638

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 6

ES 2 544 692 T3

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

ES 2 544 692 T3

Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe  
 195 200 205  
 Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro  
 210 215 220  
 Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile  
 260 265 270  
 Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg  
 275 280 285  
 Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu  
 290 295 300  
 Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met  
 305 310 315 320  
 His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu  
 325 330 335  
 Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu  
 340 345 350  
 Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala  
 355 360 365  
 Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val  
 370 375 380  
 Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Asp Gln Ser Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp Gln Gln  
 405 410 415  
 Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu Ile Pro  
 420 425 430  
 Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala  
 435 440 445  
 Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr  
 450 455 460  
 Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn  
 485 490 495  
 Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met  
 500 505 510  
 Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys  
 515 520 525

ES 2 544 692 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 1986

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 7

ES 2 544 692 T3

```

atggctacga cccgccgggc cgcggccggc acctgtgctg ccgccgcgac ggccaagacc 60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc ttcccgctc gaggcgggt gggggcggcg 120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgcggt ccccggcgcc gccggccacg 180
ccgctccggc cgtggggggc ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg 240
ctggagcggg gcggcgctcag cgacgtgttc gcctaccggg ggggcgcgct catggagatc 300
caccagggcg tgacgcgctc cccggtcac accaaccacc tcttcgcca cgagcagggc 360
gagcgcttcg cggcgctccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420
acctccggcc ccggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc ccccgccgca tgatcggcac cgacgccttc 540
caggagacgc ccatagtcca ggtcaccgcg tccatcacca agcacaatta ccttgcctt 600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgct ctcgggcggc 660
cctggcccgg tgctggtcga catccccaa agacatccagc agcagatggc tatggcagtc 720
tgggacacct cgatgaatct accggggtac attgcacgcc tgccaagcc acccgcgaca 780
gaattgcttg agcaggctct gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
ggtggtggct gctctgcac tggatgaa ttgcgcgggt ttgttgagct gaccggcatc 900
ccagttacaa ccaactctgat gggcctcggc aatttcccc gtgatgatcc gttgtccctg 960
cgatgcttg ggatgcatgg cacgggtgtc gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg 1020
ttgcttgcat ttggcgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
agcagggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag ctgtcttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
gaccagagca caacaagac aagtctctgat tttagtgcgt ggcacaatga gttggaccag 1260
cagaagagg agtttctct ggggtacaag acttttggg aagagatccc accgcaatat 1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtttgga 1380
cagcaccaga tgtggggcgc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtg tctctgtggc 1500
aaccagggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagtgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtccgtgc cgccatcaag 1800
aagatgctcg ataccaccag gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca tccaaggaca tgatcctgga tggatgggc 1920
aggactgtgt attaacttat aatctgtatg ttggcaaagc accagcccgg cctatgtttg 1980
acctga

```

<210> 8

<211> 644

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 8

ES 2 544 692 T3

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

ES 2 544 692 T3

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

Arg Thr Val Tyr

<210> 9

<211> 1956

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia consenso Oryza

<400> 9

```

gcggccgcg  ccgccacct  gtcgcgcgc  gcgacggcca  agaccggccg  taagaaccac  60
cagcgacacc  acgtctttcc  cgctcgaggc  cgggtggggg  cggcggcggg  caggtgctcg  120
gggtgtccc  cgttcacccc  gccgtccccg  gcgcgcggg  ccacgcggct  ccggccgtgg  180
gggccggccg  agccccgcaa  gggcgcgga  atcctcgtgg  aggcgctgga  gcggtgcggc  240
gtcagcgacg  tgttcgccta  cccgggcggc  acgtccatgg  agatccacca  ggcgctgacg  300
cgctccccgg  tcatcaccaa  ccacctcttc  cgccacgagc  agggcgaggc  gttcgcggcg  360
tccgggtacg  cgcgcgcgtc  cggecgcgtc  ggggtctgcg  tcgccacctc  cggccccggg  420
gcaaccaacc  tcgtgtccgc  gctgcgcgac  gcgtgctcg  actccgtccc  gatggtcgcc  480
atcacgggcc  aggtcccccg  ccgatgatc  ggcaccgacg  cttccagga  gacgcccata  540
gtcgaggtca  cccgctccat  caccaagcac  aattacctg  tccttgatgt  ggaggacatc  600
ccccgcgtca  tacaggaagc  cttcttcctc  gcgtcctcgg  gccgtcctgg  cccggtgctg  660
gtcgacatcc  ccaaggacat  ccagcagcag  atggctgtgc  cagtctggga  cacctcgatg  720
aatctaccgg  ggtacattgc  acgctgccc  aagccaccg  cgacagaatt  gcttgagcag  780
gtcttgctc  tggttggcga  gtcacggcgc  ccgattctct  atgtcgggtg  tggctgctct  840
gcatctgggt  atgaattgcg  ccggtttgtt  gagctgaccg  gcatcccagt  tacaaccact  900
ctgatgggcc  tcggcaattt  ccccagtgat  gatccgttgt  ccctgcgcat  gcttgggatg  960
catggcacgg  tgtacgcaa  ttatgcggtg  gataaggctg  acctgttgct  tgcatttggc  1020
gtgcggtttg  atgatcgtgt  gacagggaaa  attgaggctt  ttgcaagcag  ggccaagatt  1080
gtgcacattg  acattgatcc  agcggagatt  ggaaagaaca  agcaaccaca  tgtgtcaatt  1140
tgcgagatg  ttaagcttgc  tttacagggc  ttgaatgctc  tgctagacca  gagcacaaca  1200
aagacaagtt  ctgattttag  tgcgtggcac  aatgagttgg  accagcagaa  gaggagttt  1260
cctctggggt  acaagacttt  tgggtgaagag  atcccaccgc  aatatgctat  tcaggtgctg  1320
gatgagctga  cgaaaggggg  ggcaatcacc  gctactggtg  ttggacagca  ccagatgtgg  1380
gcggcacaat  attacaccta  caagcggcca  cggcagtgcc  tgtcttcggc  tggctggggc  1440
gcaatgggat  ttgggctgcc  tgctgcagct  ggtgcttctg  tggctaacc  aggtgtcaca  1500
gttgttgata  ttgatgggga  tggtagcttc  ctcatgaaca  ttcaggagtt  ggcatgatc  1560
cgcattgaga  acctcccggg  gaaggtgatg  gtgttgaaca  accaacattt  gggatggtt  1620
gtgcaatggg  aggatagggt  ttacaaggca  aataggcgc  atacatactt  gggcaacca  1680
gaatgtgaga  gtgagatata  tccagatttt  gtgactattg  ctaaagggtt  caatattcct  1740
gcagtcgctg  taacaaagaa  gagtgaagtc  cgtgccgcca  tcaagaagat  gctcgatacc  1800
ccagggccat  acttgttgg  tatcatcgtc  ccacaccagg  agcatgtgct  gcctatgatc  1860
ccaagtggg  gcgcattcaa  ggacatgatc  ctggatggtg  atggcaggac  tgtgtattaa  1920
tctataatct  gtatgttggc  aaagcaccag  cccggc  1956
    
```

10 <210> 10

<211> 639

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de consenso Oryza

<400> 10

ES 2 544 692 T3

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

ES 2 544 692 T3

Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val  
 20 25 30  
 Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu  
 50 55 60  
 Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly  
 65 70 75 80  
 Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His  
 85 90 95  
 Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe Arg His  
 100 105 110  
 Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly  
 115 120 125  
 Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu  
 130 135 140  
 Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala  
 145 150 155 160  
 Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln  
 165 170 175  
 Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr  
 180 185 190  
 Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe  
 195 200 205  
 Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro  
 210 215 220  
 Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile  
 260 265 270  
 Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg  
 275 280 285  
 Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu  
 290 295 300  
 Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met  
 305 310 315 320  
 His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu  
 325 330 335  
 Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu  
 340 345 350

ES 2 544 692 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 1936

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 11

ES 2 544 692 T3

```

atggctacga cgcgccgcg cgcggccgccc accttgtccg ccgcccgcgac ggccaagacc 60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc ttcccgcctc gaggccgggt gggggcggcg 120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgcctt ccccgggcgc gccggccacg 180
ccgctccggc cgtgggggccc ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggagggc 240
ctggagcggg gcggcgctcag cgacgtgttc gcctaccggg gcggcacgct catggagatc 300
caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcctc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc 360
gaggcgttcg cggcgctccgg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420
acctccggcc ccggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgcctcc 480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc ccccgcgca tgatcggcac cgacgccttc 540
caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgct tccatcacca agcacaatta ccttgcctt 600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tctcgcgctc ctccggccgt 660
cctggcccgg tgctggtcga catccccaa gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc 720
tgggacacct cgatgaatct accgggggtac attgcacgcc tgcccgaagc acccgcgaca 780
gaattgcttg agcaggtctt gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
ggtggtggct gctctgcata tggatgaa ttgcgcccgt ttggtgagct gaccggcctc 900
ccagttacaa ccactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg 960
cgcatgcttg ggatgcatgg cacgggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg 1020
ttgcttgcat ttggcgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
agcagggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
ccacatgtgt caatttgccg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
gaccagagca caacaaagac aagttctgat ttagtgctg ggcacaatga gttggaccag 1260
cagaagagg agtttccctc ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
gctattcagg tcctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggttgga 1380
cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtc ttctgtggct 1500
aaccagggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatgggtgt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagtgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
gggttcaata ttctgagcgt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcctgct cgccatcaag 1800
aagatgctcg ataccacagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccagg tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
aggactgtgt acctga 1936

```

<210> 12

<211> 644

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 12

ES 2 544 692 T3

Met	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala
1				5					10					15	
Thr	Ala	Lys	Thr	Gly	Arg	Lys	Asn	His	Gln	Arg	His	His	Val	Phe	Pro
			20					25					30		
Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Cys	Ser	Ala	Val	Ser
		35					40					45			
Pro	Val	Thr	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro
	50					55					60				
Trp	Gly	Pro	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ala
65					70					75					80
Leu	Glu	Arg	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Thr
				85					90					95	
Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Thr	Asn
			100					105					110		

ES 2 544 692 T3

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr  
 115 120 125  
 Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro  
 130 135 140  
 Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly  
 165 170 175  
 Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile  
 180 185 190  
 Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val  
 195 200 205  
 Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val  
 210 215 220  
 Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val  
 225 230 235 240  
 Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu  
 260 265 270  
 Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly  
 275 280 285  
 Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr  
 290 295 300  
 Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp  
 325 330 335  
 Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val  
 340 345 350  
 Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile  
 355 360 365  
 Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser  
 370 375 380  
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn  
 405 410 415  
 Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe  
 420 425 430  
 Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu  
 435 440 445

ES 2 544 692 T3

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met  
 450 455 460  
 Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly  
 485 490 495  
 Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp  
 500 505 510  
 Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu  
 515 520 525  
 Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met  
 530 535 540  
 Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr  
 545 550 555 560  
 Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val  
 565 570 575  
 Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys  
 580 585 590  
 Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro  
 595 600 605  
 Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met  
 610 615 620  
 Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly  
 625 630 635 640  
 Arg Thr Val Tyr

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta de arroz que comprende un ácido nucleico AHAS de arroz no recombinante comprendiendo una secuencia de polinucleótido seleccionada de:
  - (a) la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5;
  - 5 (b) la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO:11;
  - (c) secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:6;
  - (d) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:12; y
  - (e) secuencia de polinucleótido complementaria a la secuencia de cualquiera de (a) a (d) anteriores,
- 10 en donde la secuencia de polinucleótido de ácido nucleico AHAS codifica un polipéptido AHAS de arroz variante que comprende una sustitución de alanina a treonina en una posición equivalente a la posición 96 de un polipéptido AHAS de arroz tipo silvestre; en donde dicha sustitución de alanina a treonina en una posición equivalente a la posición 96 de un polipéptido AHAS de arroz tipo silvestre es el resultado de la mutagénesis por tratamiento de las semillas con una solución acuosa de azida de sodio 0.001 M a pH 3; y en donde la expresión de dicho polipéptido
  - 15 AHAS de arroz variante confiere a la planta de arroz aumento de la tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación con la de una variedad tipo silvestre de la planta de arroz.
2. La planta de arroz de la reivindicación 1, en donde el polipéptido AHAS de arroz variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
3. La planta de arroz de la reivindicación 1, en donde el polipéptido AHAS de arroz variante comprende la secuencia
  - 20 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
4. La planta de arroz de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico AHAS de arroz comprende la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 1.
5. La planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la planta de arroz es no transgénica.
6. Una planta de arroz progenie de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la planta de
  - 25 arroz progenie comprende el ácido nucleico AHAS de arroz, en donde la expresión del polipéptido AHAS de arroz variante confiere a la planta de arroz progenie tolerancia aumentada al herbicida de imidazolinona en comparación con la de la variedad tipo silvestre de la planta de arroz.
7. Un mutante, recombinante, o planta de arroz manipulada genéticamente derivada de la planta de una cualquiera
  - 30 de las reivindicaciones 1-5, en donde el mutante, recombinante, o planta de arroz manipulada genéticamente comprende el ácido nucleico AHAS de arroz, en donde la expresión del polipéptido AHAS de arroz variante confiere en el mutante, recombinante, o planta de arroz manipulada genéticamente tolerancia aumentada al herbicida de imidazolinona en comparación con el de la variedad tipo silvestre de la planta de arroz.
8. Una semilla de arroz de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la semilla comprende el ácido nucleico AHAS de arroz.
9. Una parte de la planta o célula de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la parte o
  - 35 célula comprende el ácido nucleico AHAS de arroz.
10. Un método para el cultivo de la planta de arroz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, mientras que el control de maleza en la vecindad de dicha planta, comprendiendo el método: aplicar un herbicida de imidazolinona a la maleza y a la planta de arroz, en donde la planta ha aumentado la tolerancia al herbicida de imidazolinona en
  - 40 comparación con el de una variedad tipo silvestre de la planta de arroz.

FIGURA 1A

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

CCTTGTCCGCCGCCGCGAC

GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC  
GAGGCCGGGTGGGGCGCGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC  
ACCCCGCGTCCCCGGCGCGCGGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGCC  
GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT  
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGCGCGCACGTCCATGGAGATC  
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCACCACCTCTCCGCCA  
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGCC  
GCGTCGGGGTCTGCGTCCGACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG  
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC  
GGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC  
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAGCACAAATTACCTTGTCCTT  
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTC  
CTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGCTGGTGCACATCCCAAGGACATCCAGC  
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGTAC  
ATTGCACGCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT  
GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCT  
GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC  
CCAGTTACAACCACTCTGATGGCCCTCGGCAATTTCCCAGTGATGATCC  
GTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAAATTATG  
CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGGGTTTGATGAT  
CGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA  
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA  
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGCGGC  
ACAAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGCTTCCGCTGGTC  
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCCTTGTGGCT  
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCCTCAT  
GAACATTCAGGAGTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCCTCCCGGTGAAGG  
TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
AGGTTTTACAAGGCAAAATAGGGCGCATACTATTGGGCAACCCAGAATG  
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
TTCTGCGAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCA  
CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGCGCATTCGAAGGACA  
TGATCCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG  
TTGGCAAAGCACCAGCCCCGC

**Figura 1B**

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

LSAAATAKTGRKKNHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV  
TPPSPAPPATFLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGTSMEI  
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV  
SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV  
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY  
IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI  
PVTFTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD  
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL  
DQSTTKTS SDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK  
GEAIIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSAGLGAMGFGLPAAAGASVA  
NPGVTVVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED  
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTTAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK  
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 1C

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

CCTTGTCGCGCCGCGCGAC

GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC  
GAGGCCGGGTGGGGCGCGCGCGGTCAAGTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTC  
ACCCCGCCGTCCCCGGCGCCCGCCGACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC  
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT  
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC  
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACC AACCACCTCTTCCGCCA  
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC  
GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGCAACCAACCTCGTG  
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC  
GGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC  
CCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACC AAGCACAATTACCTTGTCTT  
GATGTGGAGGACATCCCCCGCTCATA CAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC  
CTCGGGCCGTCCTGGCCCCGCTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC  
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC  
ATTGCACGCC TGCC AAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT  
GCGTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCCGTGGTGGCT  
GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC  
CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC  
GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG  
CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA  
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTGTGCGTGGCACAATGA  
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGCGCGGC  
ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGCTTCCGGCTGGTC  
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCCTCTGTGGCT  
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCAGAATG  
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
TTCTGCACTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCA  
CCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACA  
TGATCCTGGATGGTGTATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG  
TTGGCA

Figura 1D

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

**LSAAATAKTGRKNHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV  
TPPSPAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGTSMEI  
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV  
SALADALDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNLYLV  
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPY  
IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI  
PVTTTLMGLGNFPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD  
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL  
DQSTTKTSSDFSAWHNELDQQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK  
GEAIIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGASVA  
NPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED  
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK  
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY**

Figura 1E

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

GCGGCCGCGGCCGCGCCACCTTGTCCGCGCCGCGGAC  
GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCFTTCCCGCTC  
GAGGCCGGGTGGGGGCGGCGCGGTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGTC  
ACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCGGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC  
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT  
GCGGCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC  
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCA  
CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCC  
GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG  
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC  
GGGCCAGGTCCCCCGCCATGATCGGCACCGACGCCFTTCCAGGAGACGC  
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCTTT  
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTC  
CTCGGGCCGTCTGGCCCCGTGCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC  
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC  
ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGCAGGTCTT  
GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCCGTGGTGGCT  
GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC  
CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCAAGTGATGATCC  
GTTGTCTCCGTCGATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATG  
CGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTCCGGTTTGTGAT  
CGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGC AAGCAGGGCCAAGATTGTGCA  
CATTGACATGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGC TTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTAGTCCGTGGCACAATGA  
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTA TTTAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGCGGC  
ACAAATTTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCCGGCTGGTC  
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCC TGTGCAGCTGGTGTCTTGTGGCT  
AACCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCTCAT  
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
TGATGGTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
AGGTFTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG  
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
TTCCGTGAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATCTTGTGATATCATCGTCCCA  
CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA  
TGATCCTGGATGGTGTGAGGACCTGTGTA

Figura 1F

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

AAAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV  
TPPSPAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGTSMEI  
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV  
SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL  
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY  
IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI  
PVTTLMLGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD  
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL  
DQSTTKTSSDFSAAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK  
GEAIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSAGLGAMGFGLPAAAGASVA  
NPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED  
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK  
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTV

Figura 1G

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

ATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCGCCACCTTGTCCGCCGCCGCGAC  
 GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC  
 GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGCGGTTCAGGTGCTCGGCGGTGTCCCGGT  
 ACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCACGCCGTCCGGCCGTGGGGGCC  
 GGCCGAGCCCCGAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT  
 GCGGCGTCAGCGACGTGTTCGCCACCCGGGCGGCGCGTCCATGGAGATC  
 CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA  
 CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCCGGCC  
 GCGTCCGGGTCTGCGTCCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG  
 TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCGCCATCAC  
 GGGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCCCTCCAGGAGACGC  
 CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAGCACAATTACCTGTCCCTT  
 GATGTGGAGGACATCCCCCGGTTCATACAGGAAGCCCTTCTTCCGCGTC  
 CTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGCTGGTTCGACATCCCCAAGGACATCCAGC  
 AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC  
 ATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAAATGCTTGAGCAGGTCTT  
 GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCCGTGGTGGCT  
 GCTCTGCATCTGGTGATGAATTCGCGCCGTTTGTGAGCTGACCGGCATC  
 CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCAGTGATGATCC  
 GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG  
 CGGTGGATAAAGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGTGTGATGAT  
 CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTTGTGCA  
 CATTTGACATTGATCCAGCGGAGATTGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
 CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
 GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTGTGCGTGGCACAATGA  
 GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
 AAGAGATCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
 GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 ACAATATTACACCTACAAGCGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTGTGGCT  
 AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 TGATGGTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTGTGCAATGGGAGGAT  
 AGGTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACTACTTTGGGCAACCCAGAATG  
 TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 TTCTGCAAGTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCACA  
 CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACA  
 TGATCCTGGATGGTGTGTCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG  
 TTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGA

## Figura 1H

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

MATTAATAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV  
TPPSPAPPATPLRPWGPAEPRKGDILVEALERCVSDFAYPGGASMEI  
HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV  
SALADALLDSPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL  
DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY  
IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI  
PVTTLMLGNGFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFD  
RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL  
DQSTTKTSSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTK  
GEAIIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGASVA  
NPGVTVVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED  
RFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK  
KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 2

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

1		50
I1_arroz	(1)	-----CCTTGTCCGCCGCCGCGAC
I4_arroz	(1)	-----CCTTGTCCGCCGCCGCGAC
I5_arroz	(1)	-----GCGGCCGCCGCCGCCACCTTGTCCGCCGCCGCGAC
wt_I47	(1)	ATGGCTACGACCCGCCGCCGCCGCCGCCACCTTGTCCGCCGCCGCGAC
Consensus	(1)	GCGGCCGCCGCCGCCACCTTGTCCGCCGCCGCGAC
		51 100
I1_arroz	(20)	GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
I4_arroz	(20)	GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
I5_arroz	(36)	GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
wt_I47	(51)	GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
Consensus	(51)	GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCPTTCCCGCTC
		101 150
I1_arroz	(70)	GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGGTACAGTGTCTCGGCGGTGTCCCCGGTC
I4_arroz	(70)	GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGGTACAGTGTCTCGGCGGTGTCCCCGGTC
I5_arroz	(86)	GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGGTACAGTGTCTCGGCGGTGTCCCCGGTC
wt_I47	(101)	GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGGTACAGTGTCTCGGCGGTGTCCCCGGTC
Consensus	(101)	GAGGCCGGGTGGGGGGCGCGCGGTACAGTGTCTCGGCGGTGTCCCCGGTC
		151 200
I1_arroz	(120)	ACCCCGCCGTCCTCCCGGCCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
I4_arroz	(120)	ACCCCGCCGTCCTCCCGGCCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
I5_arroz	(136)	ACCCCGCCGTCCTCCCGGCCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
wt_I47	(151)	ACCCCGCCGTCCTCCCGGCCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
Consensus	(151)	ACCCCGCCGTCCTCCCGGCCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCC
		201 250
I1_arroz	(170)	GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGAGGCGCTGGAGCGGT
I4_arroz	(170)	GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGAGGCGCTGGAGCGGT
I5_arroz	(186)	GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGAGGCGCTGGAGCGGT
wt_I47	(201)	GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGAGGCGCTGGAGCGGT
Consensus	(201)	GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGAGGCGCTGGAGCGGT
		251 300
I1_arroz	(220)	GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
I4_arroz	(220)	GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
I5_arroz	(236)	GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
wt_I47	(251)	GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
Consensus	(251)	GCGGCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCACGTCATGGAGATC
		301 350
I1_arroz	(270)	CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
I4_arroz	(270)	CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
I5_arroz	(286)	CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
wt_I47	(301)	CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
Consensus	(301)	CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCA
		351 400
I1_arroz	(320)	CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
I4_arroz	(320)	CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
I5_arroz	(336)	CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
wt_I47	(351)	CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
Consensus	(351)	CGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC
		401 450
I1_arroz	(370)	GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCTGTG
I4_arroz	(370)	GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCTGTG

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

Consensus (851) GCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGTGAGCTGACCGGCATC  
901 950

I1\_arroz (870) CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC

I4\_arroz (870) CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC

I5\_arroz (886) CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC

wt\_I47 (901) CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC

Consensus (901) CCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC  
951 1000

I1\_arroz (920) GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGGTACGCAAATTATG

I4\_arroz (920) GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGGTACGCAAATTATG

I5\_arroz (936) GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGGTACGCAAATTATG

wt\_I47 (951) GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGGTACGCAAATTATG

Consensus (951) GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGGTACGCAAATTATG  
1001 1050

I1\_arroz (970) CCGTGGATAAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGTATGAT

I4\_arroz (970) CCGTGGATAAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGTATGAT

I5\_arroz (986) CCGTGGATAAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGTATGAT

wt\_I47 (1001) CCGTGGATAAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGTATGAT

Consensus (1001) CCGTGGATAAAGGCTGACCTGTGCTTGCATTTGGCGTGC GGTTTGTATGAT  
1051 1100

I1\_arroz (1020) CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA

I4\_arroz (1020) CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA

I5\_arroz (1036) CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA

wt\_I47 (1051) CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA

Consensus (1051) CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA  
1101 1150

I1\_arroz (1070) CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT

I4\_arroz (1070) CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT

I5\_arroz (1086) CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT

wt\_I47 (1101) CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT

Consensus (1101) CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
1151 1200

I1\_arroz (1120) CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA

I4\_arroz (1120) CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA

I5\_arroz (1136) CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA

wt\_I47 (1151) CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA

Consensus (1151) CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
1201 1250

I1\_arroz (1170) GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA

I4\_arroz (1170) GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA

I5\_arroz (1186) GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA

wt\_I47 (1201) GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA

Consensus (1201) GACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGA  
1251 1300

I1\_arroz (1220) GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG

I4\_arroz (1220) GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG

I5\_arroz (1236) GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG

wt\_I47 (1251) GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG

Consensus (1251) GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
1301 1350

I1\_arroz (1270) AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA

I4\_arroz (1270) AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA

I5\_arroz (1286) AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA

wt\_I47 (1301) AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA

Consensus (1301) AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
1351 1400

I1\_arroz (1320) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 I4\_arroz (1320) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 I5\_arroz (1336) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 wt\_I47 (1351) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 Consensus (1351) GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
 1401 1450  
 I1\_arroz (1370) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 I4\_arroz (1370) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 I5\_arroz (1386) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 wt\_I47 (1401) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 Consensus (1401) ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC  
 1451 1500  
 I1\_arroz (1420) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTCGTGGCT  
 I4\_arroz (1420) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTCGTGGCT  
 I5\_arroz (1436) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTCGTGGCT  
 wt\_I47 (1451) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTCGTGGCT  
 Consensus (1451) TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTTCGTGGCT  
 1501 1550  
 I1\_arroz (1470) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 I4\_arroz (1470) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 I5\_arroz (1486) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 wt\_I47 (1501) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 Consensus (1501) AACCCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCAT  
 1551 1600  
 I1\_arroz (1520) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 I4\_arroz (1520) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 I5\_arroz (1536) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 wt\_I47 (1551) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 Consensus (1551) GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
 1601 1650  
 I1\_arroz (1570) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
 I4\_arroz (1570) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
 I5\_arroz (1586) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
 wt\_I47 (1601) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
 Consensus (1601) TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
 1651 1700  
 I1\_arroz (1620) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG  
 I4\_arroz (1620) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG  
 I5\_arroz (1636) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG  
 wt\_I47 (1651) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG  
 Consensus (1651) AGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTACTTGGGCAACCCAGAATG  
 1701 1750  
 I1\_arroz (1670) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 I4\_arroz (1670) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 I5\_arroz (1686) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 wt\_I47 (1701) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 Consensus (1701) TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
 1751 1800  
 I1\_arroz (1720) TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 I4\_arroz (1720) TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 I5\_arroz (1736) TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 wt\_I47 (1751) TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 Consensus (1751) TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG  
 1801 1850  
 I1\_arroz (1770) AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA  
 I4\_arroz (1770) AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACA

ES 2 544 692 T3

```

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

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

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

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

```

Figura 3

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

		1	50
I1_arroz	(1)	-----LSAAATAKTGRKQHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
I4_arroz	(1)	-----LSAAATAKTGRKQHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
I5_arroz	(1)	-----AAAAATLSAAATAKTGRKQHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
arroz_wt_I47	(1)	MATTAATAATAKTGRKQHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
Consensus	(1)	AAAAATLSAAATAKTGRKQHQRHHVFPARGRVGAAAVRCSAVSPV	
		51	100
I1_arroz	(40)	TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFPYGGQSMEI	
I4_arroz	(40)	TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFPYGGQSMEI	
I5_arroz	(46)	TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFPYGGQSMEI	
arroz_wt_I47	(51)	TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFPYGGQSMEI	
Consensus	(51)	TPPSAPPATPLRPWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFPYGGQSMEI	
		101	150
I1_arroz	(90)	HQALTRSPVITNMLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
I4_arroz	(90)	HQALTRSPVITNMLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
I5_arroz	(96)	HQALTRSPVITNMLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
arroz_wt_I47	(101)	HQALTRSPVITNMLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
Consensus	(101)	HQALTRSPVITNMLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV	
		151	200
I1_arroz	(140)	SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL	
I4_arroz	(140)	SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL	
I5_arroz	(146)	SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL	
arroz_wt_I47	(151)	SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL	
Consensus	(151)	SALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL	
		201	250
I1_arroz	(190)	DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGVPLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
I4_arroz	(190)	DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGVPLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
I5_arroz	(196)	DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGVPLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
arroz_wt_I47	(201)	DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGVPLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
Consensus	(201)	DVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGVPLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY	
		251	300
I1_arroz	(240)	IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI	
I4_arroz	(240)	IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI	
I5_arroz	(246)	IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI	
arroz_wt_I47	(251)	IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI	
Consensus	(251)	IARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGCCSASGDELRRFVELTGI	
		301	350
I1_arroz	(290)	PVTTTLMGLGNFSSDDPLSLRMLGSHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
I4_arroz	(290)	PVTTTLMGLGNFSSDDPLSLRMLGSHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
I5_arroz	(296)	PVTTTLMGLGNFSSDDPLSLRMLGSHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
arroz_wt_I47	(301)	PVTTTLMGLGNFSSDDPLSLRMLGSHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
Consensus	(301)	PVTTTLMGLGNFSSDDPLSLRMLGSHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDD	
		351	400
I1_arroz	(340)	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
I4_arroz	(340)	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
I5_arroz	(346)	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
arroz_wt_I47	(351)	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
Consensus	(351)	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKQKQPHVSIKADVKLALQGLNALL	
		401	450
I1_arroz	(390)	DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTK	
I4_arroz	(390)	DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTK	
I5_arroz	(396)	DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTK	
arroz_wt_I47	(401)	DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTK	
Consensus	(401)	DQSTTKTSDFSAWHNELDQKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTK	
		451	500
I1_arroz	(440)	GEAI IATGVGQHQMWAQYTYTKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGASVA	
I4_arroz	(440)	GEAI IATGVGQHQMWAQYTYTKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGASVA	
I5_arroz	(446)	GEAI IATGVGQHQMWAQYTYTKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGASVA	
arroz_wt_I47	(451)	GEAI IATGVGQHQMWAQYTYTKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGASVA	
Consensus	(451)	GEAI IATGVGQHQMWAQYTYTKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGASVA	
		501	550
I1_arroz	(490)	NPGVTVVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVQWED	
I4_arroz	(490)	NPGVTVVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVQWED	
I5_arroz	(496)	NPGVTVVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVQWED	
arroz_wt_I47	(501)	NPGVTVVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVQWED	
Consensus	(501)	NPGVTVVVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLRNQHLMVQWED	
		551	600
I1_arroz	(540)	RFYKANRAHTYLGNEPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK	
I4_arroz	(540)	RFYKANRAHTYLGNEPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK	
I5_arroz	(546)	RFYKANRAHTYLGNEPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK	
arroz_wt_I47	(551)	RFYKANRAHTYLGNEPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK	
Consensus	(551)	RFYKANRAHTYLGNEPECESEIYPDFVTIAGFNI PAVRVTKKSEVRAAIK	
		601	644
I1_arroz	(590)	KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMIPSGGAFKDMILDGDRIVY	
I4_arroz	(590)	KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMIPSGGAFKDMILDGDRIVY	
I5_arroz	(596)	KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMIPSGGAFKDMILDGDRIVY	
arroz_wt_I47	(601)	KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMIPSGGAFKDMILDGDRIVY	
Consensus	(601)	KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLFMIPSGGAFKDMILDGDRIVY	

Figura 4A

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

ATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCGCCACCTTGTCGCGCCGCGCGAC  
GGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAGCGACACCACGTCTTTCCCGCTC  
GAGGCCGGGTGGGGCGGGCGGGTCAGGTGCTCGGCCGGTGTCCCGGTC  
ACCCCGCGTCCCGCGCCGCGGCCACGCGCTCCGGCCGTGGGGGCC  
GGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT  
GCGGCGTCAGCGACTGTTTCGCCATACCCGGGCGGCACGTCCATGGAGATC  
CACCAGGCGCTGACGCGCTCCCGGTCATCACC AACACCTCTTCCGCCA  
CGAGCAGGCGGAGGCTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCC  
GCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG  
TCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCGATGGTCCCATCAC  
GGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGC  
CCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACC AAGCACAATTACCTTGTCCTT  
GATGTGGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCGCGTC  
CTCGGGCGTCCGCGCCGGTGGTGCATCCCAAGGACATCCAGC  
AGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGGTAC  
ATTGCACGCCGCCCCAAGCCACCCGCGACAGAAATGCTTGAGCAGGTCTT  
GCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCT  
GCTCTGCATCTGGTGATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC  
CCAGTTACAACCACTCTGATGGCCCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC  
GTTGTCCCTGCCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAAATATG  
CGGTGGATAAAGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGGTTGATGAT  
CGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTGTGCA  
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGT  
CAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA  
GACCAGAGCACAACAAGACAAGTTCTGATTTTGTAGTGGTGGCACAATGA  
GTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTG  
AAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA  
GGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC  
ACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGCTTCCGGCTGGTC  
TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTGTGGCT  
AACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCTCAT  
GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG  
TGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT  
AGGTTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCAGAATG  
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATA  
TTCTGCACTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCCCATCAAG  
AAGATGCTCGATACCCAGGGCCATAC TTGTTGGATATCATCGTCCACA  
CCAGGAGCATGTGCTGCCATGATCCCAAGTGGGGCGCATCAAGGACA  
TGATCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTACCTGA

**Figura 4B**

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

MATTAATAAATLSAAATAKTGRKNHQRRHVF PARGRVGAAAVRC SAVSPV  
 TPPSPAPPATPLRFWGPAPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGTSMEI  
 HQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLV  
 SALADALDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVL  
 DVEDIPRVIEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGY  
 IARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRRFVELTGI  
 PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDD  
 RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALL  
 DQSTTKTS SDFSAWHNELDQOKREFPLGYKTFGEEIPPYAIIQVDELTK  
 GEAIATGVGQHQMWAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGASVA  
 NPGVTVVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWED  
 RIFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK  
 KMLDTPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY

Figura 5

I	II	III
Iminta 1 No tratado	Irga 417	Iminta 1 No tratado
Iminta 1 3X	Iminta 1 No tratado	Iminta 1 3X
Irga 417	Iminta 1 3X	Irga 417

Figura 6

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

Figura 7

14% de humedad de Producción de Grano

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

Figura 8

## Componentes de producción

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