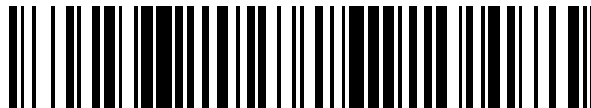


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 088**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2007** **E 12159021 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017** **EP 2511373**

54 Título: **Sorgo resistente a herbicidas de acetolactato sintetasa**

30 Prioridad:

07.12.2006 US 873529 P

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
2005 Research Park Circle, Suite 105
Manhattan, KS 66502-5020, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 641 088 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sorgo resistente a herbicidas de acetolactato sintetasa

- 5 El presente documento reclama prioridad al documento provisional de Estados Unidos No. 60/873,529 registrado el 7 de diciembre de 2006.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención proporciona composiciones y métodos para producir variedades cultivadas de sorgo que sean resistentes a los herbicidas. En particular, la presente invención suministra plantas de sorgo, tejidos de la planta y semillas de la planta que contienen genes alterados de acetolactato sintetasa (ALS) y proteínas que son resistentes a la inhibición por los herbicidas que inhiben normalmente la actividad de la proteína ALS.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 El sorgo es el segundo grano de cereal en importancia, cultivado en los Estados Unidos. La producción es económicamente crítica para las granjas que operan en áreas de pluviosidad marginal, debido a la habilidad del sorgo para tolerar sequía y calor. Tanto el ganado como las industrias de bioenergía utilizan el sorgo como un sustrato energético haciéndolo así un cultivo versátil.

- 20 A nivel mundial, el sorgo es el quinto grano de cereal en importancia. Dado que es tolerante al calor y la sequía, fácilmente es el grano alimenticio más ampliamente cultivado en las regiones semiáridas del África subsahariana y en la región peninsular central seca de India. Como tal, el sorgo es usado en consumo humano en la mayoría de las regiones más secas del mundo, haciéndolo un cultivo alimenticio de importancia crítica en estos sitios.

- 25 El desarrollo de resistencia a los herbicidas en las plantas ofrece significativas ventajas económicas y de producción, como tal el uso de herbicidas para controlar malezas en cultivos se ha convertido una práctica casi universal. Sin embargo, la aplicación de tales herbicidas puede dar como resultado también la muerte o reducción en el crecimiento de la planta de cultivo deseada, haciendo críticos el tiempo y método de aplicación del herbicida o, en algunos casos, inviable.

- 30 Para los agricultores es de particular interés el uso de herbicidas con mayor potencia, efectividad contra un amplio espectro de malezas y rápida degradación en el suelo. Las plantas, tejidos de plantas y semillas con resistencia a estos compuestos suministran una solución atractiva, al permitir que los herbicidas sean usados para controlar el crecimiento de las malezas, con bajo riesgo de daño del cultivo. Una clase tales de herbicidas de amplio espectro son aquellas que inhiben la actividad de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) en la planta. La acetolactato sintetasa es requerida para la producción de aminoácidos esenciales, tales como valina, leucina e isoleucina en plantas (esta ruta bioquímica no está presente en humanos u otros animales). El sorgo es susceptible a muchos herbicidas que inhiben la ALS que tienen como foco las especies monocotiledóneas, haciendo casi imposible el uso de estos herbicidas para el control de malezas herbáceas, dado que ellos también inhiben el crecimiento de la planta de cultivo.

- 35 Los herbicidas de acetolactato sintetasa controlan un amplio espectro de malezas herbáceas y de hoja ancha, con tasas de aplicación muy bajas. Actualmente hay disponibles más de 56 diferentes herbicidas de ALS, hechos de diferentes formulaciones de sulfonilureas (SU), imidazolinonas (TMI), triazolopirimidinas (TP) y pirimidiniltiobenzoatos (PTB). Se ha hallado que las mutaciones en algunas plantas de cultivo, por ejemplo tabaco, maíz (documento de EEUU No. 5,767,361) y soja, confieren resistencia a los herbicidas de ALS, sin embargo, a la fecha, no se ha hallado tal descubrimiento en sorgo (para una revisión, véase Tan et al., 2005, Pest. Manag. Sci. 61:246-257). El documento US5853973 divulga productos resistentes a los herbicidas diseñados con base en la estructura, específicamente variantes de acetohidroxiácido sintetasa, que exhiben resistencia a los herbicidas de imidazolina.

- 40 Debido a la importancia del sorgo en el escenario mundial, lo que se requiere son variedades cultivadas de sorgo que sean resistentes a los efectos inhibidores de los herbicidas de ALS, permitiendo de ese modo un mayor rendimiento del cultivo cuando se usan estos herbicidas para controlar las malezas herbáceas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 45 Aquí se describen composiciones y métodos para producir variedades cultivadas de sorgo que sean resistentes a los herbicidas. En particular, se describen aquí plantas, tejidos de plantas y semillas de plantas de sorgo que contienen genes y proteínas alterados de acetolactato sintetasa (ALS) que son resistentes a la inhibición por herbicidas que normalmente inhiben la actividad de la proteína ALS.

- 60 El sorgo cultivado [*sorghum bicolor* (L.) Moench] es susceptible a muchos herbicidas que inhiben la ALS que tienen como objetivo especies monocotiledóneas, o herbáceas. Sin embargo, como se describe aquí, se encontró un

genotipo de sorgo que exhibe resistencia a los herbicidas de ALS. El análisis genético ha identificado diferencias genéticas en el germoplasma de sorgo que da como resultado un fenotipo de resistencia al herbicida de ALS.

5 En las reivindicaciones se definen las realizaciones de la presente invención. En particular, la presente invención se relaciona con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa, en la que dicha secuencia comprende:

(i) una secuencia que comprende el montaje de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia:

10

GTGCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCTCCGAGACAGCCGCCGCA
 ACCATGGCCACCACCGCCGCCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGC
 CACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGCGCACCTCCTGGCCG
 CACGGCGCGCCCTCGCCGCGCCATCAGGTGCTCAGCGGCGCCACCC
 GCCACGCTGACGGTGACGGTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTG
 GGGCCCCACCGATCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTCGAGGCTC
 TTGAGCGCTGCGGGCTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCG
 TCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGTTCCCCCGTCATCGCCAAC
 CACCTCTTCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCTCTGGCTTC
 GCGCGCTCCTCGGGCCGCGTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCC
 GCGGCCACCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTC
 CGTCCCCATGGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGCGCATGATTG
 GCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATCGTCGAGGTCACCCGCTCC
 ATCACAAACATAACTACCTGGTCTCGACGTGACGACATCCCCCG
 CGTCGTGCAGGAGGCTTTCTTCTCCTCGCCTCCTCCGGTCGCCCGGGACC
 GGTGCTTGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGC
 CGGTCTGGGACACGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTC
 CCAAGCTCCTGCGACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTTG
 GTGAATCAAGGCGCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCAT
 CTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTGGAGATGACTGGAATCCCAGTC
 ACAACTACTCTTATGGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGACCCACTG
 TCTCTGCGCATGCTTGGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCA
 GTGGATAAGGCGGATCTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGAT
 CGTGTGACAGGGAAGATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGT
 GCACATTGATATTGATCCCGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCAC
 ATGTGTCCATCTGTGCAGACGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATG
 CTCTTCTGGAAGGAAGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCA
 TGGCAAGCTGAGTTGGATCAGCAGAAGAGAGAGTTCCCCCTTGGGTA
 TAAAACCTTTTGATGACGAGATCCAGCCACAATATGCTATTCAGGTTCT

TGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGC
 AGCACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGG
 CAGTGGTTGTCTTCAGCTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCG
 GCTGCTGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTATCACTGTTGTTGAC
 ATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTAT
 GATCCGAATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACC
 AGCACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCC
 AATAGAGCACACATACTTGGGAAACCCAGAGAATGAAAGTGAGA
 TATATCCAGATTTTCGTGACAATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCA
 GTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCATGCAGCAATCAAGAAGA
 TGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACC
 AGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGAT
 ATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTGATCTAAATTTAG
 CATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACATGCATATGAGCTGGTACAA
 GGGTGATGTGTTATTTATGTGATGTTCTCCTGTGTTCTATCTTTTTGTA
 AGCCGTCAGCTATCTATAGTGTGCTTGTGGATGTACTCTGTTATGGT
 AATCTTAAGTAGTTTCCTACCTTGTAGTGGTGTAGTCTGTTGTTTCGTG
 CTGGCATACTGTTCATCAGAGGTCATGTAAGTGCCTTTTGCTACAGAT
 AAATAAGGAAATAAGCATTGCTATGCAGTGGTTCTG

o una secuencia homóloga a ella en al menos 95%, y que además comprende las sustituciones de nucleótidos de guanina sustituida con adenina en la posición 1641 y guanina sustituida con timina en la posición 1684; o

- 5 (ii) un gen de resistencia de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999, o una secuencia homóloga a ella en al menos 95% que además comprende las sustituciones de nucleótidos de guanina sustituida con adenina en la posición 1641 de TA3960_4558 y guanina sustituida con timina en la posición 1684 de TA3960_4558. Preferiblemente, la secuencia codificada de aminoácidos comprende la secuencia deducida
- 10 aminoácidos del ensamble de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia:

MATTAATAAALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPAT
 LTVTAPPATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCGVVDVFAYPGGASMEI

HQALTRSPVIANHLFRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNL
 VSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLV
 LDVDDIPRVVQEAFLLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTPMSLP
 GYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPVLYVGGGCAASGEELRRFVEM
 TGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFG
 VRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQG
 MNALLEGSTSKKSDFDFGSWQAELDQQKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQV
 LDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLP
 AAAGAAVANPGITVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQH
 LGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVT
 KKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDG
 RTVY

que además comprende las sustituciones de aminoácidos de Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

5 La presente invención se relaciona también con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico definida anteriormente, unida de manera operativa a un promotor y unida de manera operativa a por lo menos una secuencia reguladora.

10 La presente invención se relaciona también con una célula que comprende el vector definido anteriormente, en el que la célula es una célula de planta.

La presente invención se relaciona también con un virus de ARN que comprende la molécula de ácido nucleico definida anteriormente.

15 La presente invención se relaciona también con una parte de la planta de sorgo que comprende la molécula de ácido nucleico definida anteriormente. Preferiblemente, la parte de la planta de sorgo es una semilla o tejido de planta.

20 La presente invención se relaciona también con un método para transformar una célula de planta, que comprende la transformación de dicha célula con el vector definido anteriormente. Preferiblemente, el método comprende además el paso de regeneración de una planta transgénica desde la célula de la planta transformada.

25 La presente invención se relaciona también con un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico definida anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido comprende la secuencia deducida de aminoácidos del ensamble de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research, la cual tiene la secuencia delineada anteriormente que comprende además las sustituciones de aminoácidos de Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

30 En una realización, la invención suministra una o más partes de la planta de sorgo cuyo germoplasma comprende una mutación de la invención, que genera la planta resistente a herbicidas de ALS. Aquí se describe la descendencia (por ejemplo F1, F2, F3, etc.) de un cruce de dicha planta, en el que el germoplasma de dicha descendencia tiene la misma mutación de la planta progenitora. Por ello, las realizaciones de la presente invención suministran partes de la planta de sorgo cuyo germoplasma contiene una mutación de la invención, tal que el fenotipo de las plantas es la resistencia a los herbicidas de ALS.

35 Aquí se divulga un híbrido de sorgo en el que dicho germoplasma de híbrido de sorgo confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa, a niveles de dicho uno o más herbicidas que normalmente inhibirían el crecimiento de un híbrido de sorgo. En algunas realizaciones, dicho uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa son de un grupo consistente en sulfonilureas, imidazolinonas, trazolopirimidas y pirimidiniltiobenzosatos. En algunas realizaciones, dicho germoplasma de híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa comprende mutaciones en el gen de acetolactato como se encuentra en ATCC No. PTA-7999. En algunos casos, las semillas de dicho híbrido de sorgo están recubiertas con un herbicida de acetolactato sintetasa.

45 Aquí se divulga un método para el control de malezas en la vecindad de un híbrido de sorgo como se describe aquí, que comprende el suministro de uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa, la aplicación de dicho uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa a un campo que comprende un híbrido de sorgo como se describe aquí, y el control de malezas en la vecindad de dicho híbrido de sorgo, tal que se afecta de manera adversa el crecimiento de la maleza, mediante la aplicación de dicho uno o más herbicidas y no se afecta adversamente el crecimiento de

dicho híbrido de sorgo. Divulgado aquí, dicho híbrido de sorgo comprende una o más mutaciones en el gen de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999.

5 Se divulga aquí un híbrido de sorgo, en el que dicho híbrido de sorgo comprende un germoplasma que comprende una o más mutaciones en el gen de acetolactato sintetasa, tal que se confiere a dicho híbrido la resistencia a uno o herbicidas de acetolactato sintetasa. Divulgado aquí, dicho híbrido de sorgo es creado por la introgresión de un germoplasma de sorgo que comprende dicha una o más mutaciones para conferir resistencia a uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa. Divulgado aquí, dicho híbrido de sorgo es creado por la incorporación de un gen heterólogo que comprende una o más mutaciones para conferir resistencia a uno o herbicidas de acetolactato sintetasa.

15 Se divulga aquí un método para producir una línea de la planta de sorgo híbrida, resistente a uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa, que comprende la identificación de un germoplasma que confiere dicha resistencia a los herbicidas, en la que dicho germoplasma resistente a los herbicidas se deriva de una planta de sorgo resistente a los herbicidas, e introducción de dicho germoplasma dentro de una línea de la planta élite de sorgo mediante la introducción de un gen heterólogo.

20 Se divulga aquí un híbrido de sorgo en el que el germoplasma de dicho híbrido comprende resistencia conferida a uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa y resistencia a uno o más compuestos de uno o más grupos de herbicidas que no son inhibidores de acetolactato sintetasa.

25 Se divulga aquí un método para identificar líneas de la planta de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintetasa, que comprende el suministro de una muestra de ácido nucleico para una planta de sorgo, el suministro de cebadores de amplificación para amplificar una región de una planta de sorgo que corresponde a un gen de acetolactato sintetasa presente en dicha muestra de ácido nucleico, la aplicación de dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácido nucleico, tal que ocurre la amplificación de dicha región de dicho gen de acetolactato sintetasa, e identificación de las plantas de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintetasa, basada en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a herbicidas de acetolactato sintetasa presentes en dicha muestra de ácido nucleico amplificado.

30 En una realización, la presente invención suministra semillas de sorgo en la que dicho germoplasma de dichas semillas comprende un gen mutante de acetolactato sintetasa de la presente invención, tal que dicha mutación confiere resistencia a la inhibición por herbicidas de acetolactato sintetasa. En algunas realizaciones, el germoplasma de dichas semillas de sorgo comprende un gen mutante de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999. En algunas realizaciones, el gen mutante de acetolactato sintetasa es un fragmento funcional del gen como se encuentra en ATCC No. PTA-7999, tal que el fragmento de gen codifica un fragmento de proteína que es suficiente para conferir resistencia a la inhibición por herbicidas de acetolactato sintetasa a una planta de sorgo. En algunas realizaciones, la presente invención suministra partes de la planta de sorgo que crecen a partir de dichas semillas.

40 Se divulgan aquí plantas híbridas de sorgo que tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de dicha planta de sorgo, que crecieron a partir de dicha semilla de sorgo. Divulgado aquí, la presente invención suministra cultivos de tejido y cultivos de tejido regenerado que surgen a partir de dicha semilla de sorgo o dicha parte de la planta de sorgo que comprende una mutación en dicho gen de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999.

50 En algunas realizaciones, la presente invención suministra un gen que es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% al gen resistente a los herbicidas ALS, como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 como se halla en ATCC No. PTA-7999 y comprende las sustituciones de aminoácidos Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu, como se encuentra por ejemplo en SEQ ID NO: 1.

55 Se describe aquí un método para producir semilla de sorgo que comprende el cruce de una planta que comprende un gen mutante de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999, consigo misma o con una segunda planta de sorgo y recolección de dicha semilla a partir de dicho cruce. Divulgados aquí, los métodos para producir dicha semilla de sorgo comprenden la plantación de una línea progenitora de semilla de sorgo, en la que dicha línea de semilla progenitora comprende un germoplasma que confiere resistencia a herbicidas de acetolactato sintetasa, con una línea progenitora polinizadora de sorgo, en la que dicho germoplasma de línea de semilla polinizadora comprende un germoplasma que confiere resistencia a herbicidas de acetolactato sintetasa, el crecimiento de dicha semilla progenitora y plantas polinizadoras de sorgo juntas, permitiendo que dichas plantas de semilla progenitora sean polinizadas por dichas plantas progenitoras polinizadoras, y cosecha de la semilla que resulta de dicha polinización.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

65 La figura 1 muestra la doble mutación de Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu en el gen ALS de sorgo que se halló estaba asociado con resistencia a los herbicidas ALS.

DEFINICIONES

- 5 Como se usa aquí, el término "resistente" y "tolerante" es usado para hacer referencia a plantas, por ejemplo plantas de sorgo, que son capaces de tolerar condiciones peligrosas (por ejemplo herbicidas tales como herbicidas ALS) para otras cepas de la misma especie.
- 10 Como se usa aquí, el término "variedad cultivada" es sinónimo de "variedad" y es usado para referirse a plantas de cultivo que son un grupo de plantas similares, que por rasgos estructurales y de desempeño pueden ser identificados de otras variedades cultivadas dentro de la misma especie.
- 15 Como se usa aquí, el término "híbrido" se refiere a la descendencia o progenie de progenitores o estirpe de plantas genéticamente diferentes, producida como el resultado de polinización cruzada controlada, en contraposición a una semilla no híbrida producida como resultado de polinización natural.
- 20 Como se usa aquí, el término "progenie" se refiere a generaciones de una planta, en las que el ancestro de la generación puede ser rastreado hasta dicha planta.
- 25 Como se usa aquí, el término "derivado" de una planta resistente a herbicidas incluye tanto la progenie de aquella planta resistente a herbicidas, como también cualquier derivado mutante, recombinante o manipulado genéticamente de aquella planta, sea de la misma especie o de una especie diferente, donde la(s) característica(s) de resistencia al herbicida de la planta original resistente al herbicida, ha(n) sido transferida(s) a la planta derivada.
- 30 Como se usa aquí, el término "tejido de planta" incluye tejidos diferenciados y no diferenciados de plantas, incluyendo aquellos presentes en raíces, brotes, hojas, polen, semillas y tumores, así como células en cultivo (por ejemplo células individuales, protoplastos, embriones, callos, etc.). Los tejidos de la planta pueden estar en planta, en cultivos de órgano, cultivo de tejido o cultivos celulares.
- 35 Como se usa aquí, el término "parte de planta" se refiere a una estructura de la planta o un tejido de planta, por ejemplo polen, un óvulo, un tejido, un capullo, una semilla y una célula. En algunas realizaciones de la presente invención, las plantas transgénicas son plantas de cultivo.
- 40 Como se usan aquí, los términos "generación F" y "generación filial" se refieren a cualquiera de las generaciones consecutivas de plantas, células, tejidos u organismos después de un cruce biparental. La generación resultante de un apareamiento de un cruce biparental (es decir dos progenitores) es la primera generación filial (designada como "F1" y "F₁") en referencia a una semilla y su planta, mientras aquella resultante del cruce de individuos F1 es la segunda generación filial (designada como "F2" o "F₂") en referencia a una semilla y su planta.
- 45 Como se usa aquí, el término "germoplasma" se refiere a cualquier material genético de plantas que contiene unidades funcionales de herencia. El término "germoplasma de élite" en referencia a una planta, se refiere a material hereditario de superioridad genética probada.
- 50 Como se usa aquí, el término "planta de élite" se refiere a cualquier planta que ha resultado de reproducción y selección para desempeño agronómico superior. Por ejemplo, las plantas de élite de sorgo a las que se hace referencia aquí incluyen, pero no están limitadas a, líneas de sorgo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, HP162, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 y Tx643, Bt.
- 55 Como se usa aquí, el término "rasgo" o "fenotipo" se refiere a una característica observable y/o medible de un organismo. Por ejemplo, la presente invención describe plantas que son resistentes a los herbicidas de ALS.
- 60 Como se usa aquí, el término "herbicida de ALS", también conocidos como herbicidas AHAS, se refiere a un herbicida que inhibe la actividad de la enzima acetolactato sintetasa (también conocida como acetohidroxiácido sintetasa) en una planta. Los ejemplos de herbicidas de ALS como se describen aquí incluyen, pero no están limitados a, sulfonilureas (SU), imidazolinonas (INI), triazolopirimidinas (TI) y pirimidiniltiobenzoatos.
- 65 Como se usa aquí, el término "marcador" y "marcador de ADN" y "marcador molecular" en referencia a un "marcador seleccionable" se refiere a un rasgo fisiológico o morfológico que puede ser determinado como un marcador para su propia selección o para selección de otros rasgos íntimamente asociados con aquel marcador. Por ejemplo, tal marcador podría ser un gen o rasgo que se asocia con tolerancia al herbicida incluyendo, pero sin limitarse a, repetición de secuencias simple (SSR), polimorfismo de nucleótido individual (SNP), inserciones genéticas y/o eliminaciones y similares.
- Como se usa aquí, el término "introgresar" y "introgresando" e "introgresión" se refiere a técnicas de reproducción por polinización convencional (es decir clásica) para incorporar material genético externo a una línea de estirpe de reproducción. Por ejemplo, la presente invención suministra plantas de cultivo de sorgo introgresadas con un gen mutante de ALS para tolerancia a los herbicidas, mediante cruce de dos generaciones de plantas.

Como se usa aquí, el término "tipo silvestre" cuando se usa en referencia a un gen, se refiere a un gen funcional común a toda una población de plantas. Un gen funcional tipo silvestre es aquel que es observado más frecuentemente en una población y es designado arbitrariamente como la forma "normal" o "tipo silvestre" del gen.

5 Como se usan aquí, los términos "modificado" o "mutante" o "mutante funcional" cuando se refieren a un gen o producto de gen se refieren, respectivamente, a un gen o un producto de gen que despliega modificaciones en secuencia y/o propiedades funcionales (es decir características alteradas) cuando se compara con el gen o producto de gen de tipo silvestre. Así, los términos "modificado" y "mutante" cuando se usan en referencia a una secuencia de nucleótidos, se refieren a una secuencia de ácido nucleico que difiere en uno o más nucleótidos, de otra secuencia de ácido nucleótido usualmente relacionada, y el término "mutante funcional" cuando se usa haciendo referencia a un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico "modificado" o "mutante", se refiere a la proteína o polipéptido que retiene actividad. En el presente documento, la proteína mutante de ALS, "un mutante funcional" de ella es un gen de ALS que retiene su actividad nativa para crear aminoácidos esenciales. Adicionalmente, se interpreta que una secuencia "modificada" de nucleótido es aquella hallada en el código genético degenerado, como es conocido por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, el código genético es degenerado cuando hay muchos casos en los cuales diferentes codones especifican el mismo aminoácido; un código genético en el cual algunos aminoácidos pueden cada uno ser codificados por más de un codón. Se considera que la presente invención comprende tal degeneración (es decir en la que un híbrido de sorgo comprende un gen ALS que es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% a la secuencia SEQ ID NO: 1) como se halla en, por ejemplo, el germoplasma de sorgo .

Como se usa aquí, cuando se usa en referencia a un gen o ácido nucleico, el término "heterólogo" se refiere a un gen que ha sido manipulado de alguna forma.

25 Como se usa aquí, el término "porción" o "fragmento funcional" cuando se usa en referencia a una proteína (como en "un fragmento de una proteína dada" o "un fragmento de proteína"), se refiere a fragmentos de aquella proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde residuos de cuatro aminoácidos hasta la secuencia total de aminoácidos, menos un aminoácido. En la presente invención, el fragmento de proteína es preferencialmente funcional, tal que el fragmento de proteína confiere resistencia a la inhibición a herbicidas de acetolactato sintetasa, a una planta dada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 En una realización, la presente invención suministra genes de la presente invención que codifican proteínas alteradas de ALS. Se divulga aquí el uso de herbicidas que no inhiben la enzima ALS en sorgo que contiene una enzima ALS alterada, con objeto de reducir la cantidad de plantas de maleza monocotiledóneas y dicotiledóneas presentes en un campo de cultivo, en el que dichas plantas de maleza son susceptibles a herbicidas ALS.

40 Se divulga aquí un germoplasma resistente a ALS de una planta de sorgo que resulta de, por ejemplo, un cruce entre las dos plantas progenitoras, un sorgo silvestre "Tailwind o Tw" y la línea de la planta polinizadora de élite Tx2783, dando una generación F₁, seguido por dos cruces de retorno (BC₂F₃:F₄), donde la semilla resultante se deposita bajo ATCC No: PTA-7999, designada KSU 06MN8419.

45 Se divulga aquí un germoplasma de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por herbicidas ALS y también confiere resistencia a los insectos contra el perforador manchado de tallo *Chilo partellus* (Girijashankar et al., 2005, Planta Cell Rep. 24:513-522). Se divulga aquí un híbrido de sorgo cuyo germoplasma comprende un gen sintético cril Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es introgresado en una línea de sorgo cuyo germoplasma confiere resistencia a herbicidas ALS. Así mismo, la incorporación de resistencia a herbicidas ALS y resistencia los insectos es lograda mediante transgénesis de la planta dentro del mismo híbrido de sorgo. Una persona experta en la técnica reconocerá las diferentes técnicas como se describen aquí, que son aplicables a la incorporación de dos o más atributos de resistencia dentro del mismo híbrido de sorgo.

50 En una realización, el gen de resistencia a herbicidas ALS como se halla en sorgo que comprende germoplasma KSU 06MN8419 de ALS depositado bajo ATCC No: PTA-7999, es incorporado dentro de variedades élite de sorgo a través de la reproducción y selección de plantas, suministrando de ese modo el desarrollo de variedades de cultivo resistentes a herbicidas, que tolerarán el uso de herbicidas que inhiben ALS para el control de maleza. En algunas realizaciones, el gen de resistencia a herbicidas ALS es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% al gen de resistencia a herbicidas ALS, como se halla en el germoplasma KSU 06MN8419 y comprende las sustituciones de aminoácidos Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu. El despliegue de este rasgo de resistencia a los herbicidas en las variedades mencionadas anteriormente de plantas de cultivo permite el uso de estos herbicidas para controlar malezas monocotiledóneas y dicotiledóneas que crecen en presencia de estos cultivos. Divulgada aquí, la incorporación del germoplasma de resistencia a ALS dentro de líneas de élite es mediante métodos de introgresión, o de reproducción clásica. En algunas realizaciones, la incorporación del gen de resistencia a ALS de la invención, dentro de líneas élite es mediante transgénesis heterólogas de gen. Se divulga aquí un híbrido de sorgo, en el que por lo menos un ancestro de dicho híbrido de sorgo se deriva del germoplasma de resistencia a ALS, designado como KSU 06MN8419 depositado bajo ATCC No: PTA-7999. Se divulga aquí un

híbrido de sorgo, en el que por lo menos un ancestro de dicho híbrido de sorgo comprende el gen de acetolactato sintetasa que confiere resistencia a los herbicidas ALS, como se halla en el germoplasma designado KSU 06MN8419 depositado bajo ATCC No: PTA-7999. En algunas realizaciones, el gen de resistencia a los herbicidas ALS es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% al gen de resistencia a herbicidas ALS, como se halla en el germoplasma KSU 06MN8419 y comprende las sustituciones de aminoácidos Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

Divulgado aquí, el germoplasma de resistencia a los herbicidas ALS es introgresado dentro de una línea élite de sorgo usando técnicas clásicas de reproducción. Por ejemplo, en Sleper y Poehlman, 2006, Reproducción Field Crops, quinta edición, Blackwell Publishing pueden encontrarse ejemplos de métodos clásicos de reproducción.

Divulgado aquí, el germoplasma de resistencia a los herbicidas ALS es introgresado dentro de una planta de sorgo que suministra alimento para consumo humano. Divulgado aquí, el germoplasma de resistencia a los herbicidas ALS es introgresado dentro de plantas de sorgo que suministran alimento para ganado (por ejemplo aves de corral, ganado vacuno, cerdos, ovejas, etc.). En una realización, el gen de la invención de resistencia a los herbicidas ALS es introducido dentro del genoma de la planta a través de transgénesis usando vectores y tecnologías conocidas en la técnica.

Aquí se divulgan métodos para controlar malezas en un campo de plantas de cultivo de sorgo. Divulgado aquí, el control de las malezas comprende la aplicación de un herbicida de ALS a dicho campo de plantas de cultivo de sorgo, tal que se inhibe el crecimiento de la maleza pero no se afecta adversamente el crecimiento de la planta de sorgo. En algunas realizaciones, el herbicida ALS es de la familia de herbicidas de sulfonilurea, que comprende uno o más de los ingredientes activos amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfuron-metilo, cloroimuron-etilo, clorosulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfuron-metilo, etoxisulfurona, flazasulfurona, flupirsulfuron-metil-sodio, foramsulfurona, halosulfuron-metilo, imazolsulfurona, iodosulfuron-metil-sodio, mesosulfuron-metilo, metsulfuron-metilo, nicosulfurona, oxasulfurona, primisulfuron-metilo, piraxosulfuron-etilo, rimsulfurona, sulfometuron-metilo, sulfosulfurona, tifensulfuron-metilo, triasulfurona, tribenuron-metilo, trifloxisulfuron-sodio, triflusulfuron-metilo, trifensulfurona, y tritosulfurona. En algunas realizaciones, el herbicida ALS es de la familia de herbicidas de imidazolinona, que comprende uno o más de los ingredientes activos imazametabenz-metilo, imazamox, imazapic, imzapir, imzaquin, e imazetapir. En algunas realizaciones, el herbicida ALS es de la familia de herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, que comprende uno o más de los ingredientes activos bispiribac-sodio, piribenzoxim, pirifalid, piriminobacmetilo, y piritiobac-sodio. En algunas realizaciones, el herbicida ALS es de la familia de los herbicidas de triazolpirimidina, que comprende uno o más de los ingredientes activos cloransulam-metilo, diclusolam, florasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam. En algunas realizaciones, el herbicida ALS comprende una combinación de ingredientes activos de una o más familias de herbicidas ALS, como se divulga aquí. Sin embargo, el presente documento no se limita al herbicida ALS usado, y una persona experta notará que se están descubriendo nuevas sustancias químicas en cualquier momento dado, que inhiben la enzima ALS.

En una realización, la presente invención suministra el uso de un transgen que comprende un gen heterólogo de la presente invención que codifica una proteína ALS mutante para suministrar el rasgo agronómico seleccionado de resistencia a los herbicidas ALS. En una realización, el transgen comprende un gen ALS mutante como se halla en el germoplasma KSU 06MN8419 depositado bajo ATCC No: PTA-7999. En algunas realizaciones, el gen ALS es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% frente al gen mutante de ALS hallado en el germoplasma KSU 06MN8419 y comprende las sustituciones de aminoácidos Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

Striga conocida comúnmente como maleza de bruja, es un género de plantas parásitas nocivas de pastos y cultivos de cereal monocotiledóneos, tales como maíz, trigo y sorgo. Una fuerte infestación de *Striga* en un campo de plantas de cultivo daña las plantas huésped, causando retraso del crecimiento, clorosis, marchitamiento, y finalmente la muerte de la planta huésped, especialmente en su hábitat nativo donde el agua puede ser escasa. *Striga* es nativa de regiones de praderas semiáridas y templadas de África y Asia, sin embargo puede florecer fuera de su ámbito natural, y existen infestaciones actuales en tierras agrícolas en los Estados Unidos. Las infestaciones están ampliamente difundidas en África, por ello *Striga* es un problema en marcha para los agricultores en regiones semiáridas y subsaharianas donde el sorgo es un cultivo alimenticio principal. Es difícil erradicar la planta parásita, pues sus semillas pueden estar latentes en el suelo por hasta 10 años antes de la germinación.

Las señales biológicas para la germinación de la semilla de *Striga* incluyen ser estimuladas por exudados de las raíces de su planta huésped. Las semillas de *Striga* germinan enviando una estructura infecciosa al huésped, que se une a la raíz huésped e invade el sistema vascular huésped, robando de este modo el agua, los minerales y carbohidratos del huésped. Una vez se hace el contacto inicial con el huésped, se dispara el inicio de *Striga* y comienza el arraigo adicional, y aumenta el robo a la planta huésped. En ubicaciones nativas donde el agua es escasa, *Striga* drena de manera efectiva los minerales y agua de la planta huésped.

El parasitismo de *Striga* es inhibido por los herbicidas ALS. La presente invención no está limitada a un mecanismo particular. En verdad, no es necesario un entendimiento del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se elimina la infección con *Striga* en raíces de sorgo cubriendo las semillas de sorgo con

herbicidas ALS antes de la siembra. En una realización, las semillas de la invención que comprenden un germoplasma que confiere resistencia a los herbicidas ALS a dicho híbrido de sorgo, son cubiertas con uno o más herbicidas ALS antes de la siembra. En algunas realizaciones, las semillas cubiertas son sembradas en tierra agrícola donde reside la especie de la planta *Striga* parásita. En algunas realizaciones, las plantas híbridas de sorgo que crecen desde dicha semilla recubierta, son resistentes a la infección por *Striga*.

Se divulga aquí un híbrido de sorgo cuyo germoplasma confiere resistencia a los herbicidas ALS y resistencia a uno o más herbicidas adicionales de uno o más grupos de herbicidas diferentes. Por ejemplo, grupos adicionales de herbicidas usados para inhibir el crecimiento de la maleza, incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de síntesis de lípidos (por ejemplo ariloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, benzofuranos, ácidos cloro-carbónicos, fosforoditioatos, tiocarbamatos), inhibidores de fotosíntesis en fotosistema II (por ejemplo fenil-carbamatos, piridazinonas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, uracilos, amidas, ureas, benzotriadinononas, nitrilos, fenil-piridinas), inhibidores de fotosíntesis en el fotosistema I (por ejemplo bipiridilios), inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (por ejemplo difeniléteres, N-fenilftalimidias, oxadiazoles, oxizolidinedionas, fenilpirazoles, pirimidindionas, tiadiazoles), inhibidores de biosíntesis de carotenoides (por ejemplo piridazinonas, piridinacarboxamidas, isoxazolidinonas, triazoles), inhibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (por ejemplo calistemonas, isoxazoles, pirazoles, tricetonas), inhibidores de EPSP sintetasa (por ejemplo glicinas), inhibidores de glutamina sintetasa (por ejemplo ácidos fosfínicos), inhibidores de dihidropteroato sintetasa (por ejemplo carbamatos), inhibidores de ensamble de microtúbulos (por ejemplo benzamidas, ácidos benzoicos, dinitroanilinas, fosforoamidatos, piridinas), inhibidores de división celular (por ejemplo acetamidas, cloroacetamidas, oxiacetamidas), inhibidores de síntesis de pared celular (por ejemplo nitrilos, triazolocarboxamidas) e inhibidores de transporte de auxina (por ejemplo ftalamatos, semicarbazonas).

Reproducción clásica de sorgo

Los cultivos de campo han sido reproducidos clásicamente mediante técnicas que toman ventaja de los métodos de polinización de las plantas. Se considera que una planta es "autopolinizante" si el polen de una flor puede ser transmitido a la misma u otra flor, mientras se considera que las plantas tienen "polinización cruzada" si el polen tiene que venir de una flor de una planta diferente, con objeto de que ocurra la polinización.

Las plantas que tienen autopolinización y son seleccionadas durante muchas generaciones se tornan a lo sumo homocigóticas, sino todas, de su loci de gen, produciendo de ese modo una población uniforme de progenie de verdadera reproducción. Un cruce entre dos plantas homocigóticas de diferentes bases o dos líneas homocigóticas diferentes producirá una población uniforme de plantas híbridas que, más que probablemente, serán heterocigóticas en varios de los loci de gen. Un cruce de dos plantas que son cada una heterocigótica en varios loci de gen producirá una generación de plantas híbridas que son genéticamente diferentes y no son uniformes.

Las plantas de sorgo son plantas autopolinizantes, pero pueden ser reproducidas también mediante polinización cruzada. El desarrollo de híbridos de sorgo requiere del desarrollo de progenitores polinizadores (restauradores de fertilidad) y endogamia de progenitor de semilla, usando el sistema citoplasmático restaurador esterilidad-fertilidad masculino, el cruce de progenitores de semilla y progenitores polinizadores, y la evaluación de los cruces. Los programas de reproducción de linaje combinan rasgos deseables; en el presente documento, el rasgo deseable es la resistencia de la planta a los herbicidas ALS. Este rasgo es introducido dentro del conjunto de reproducción a partir de una o más líneas, tal que las nuevas líneas endógamas son creadas mediante cruce, seguido por selección de plantas con el rasgo deseado, seguido por más cruce, etc. Las nuevas endogamias son cruzadas con otras líneas endógamas (por ejemplo líneas élite de la planta como aquellas descritas aquí).

La reproducción de linaje comienza con el cruce de dos genotipos, tales como Tailwind y una línea élite de sorgo (por ejemplo sorgo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, HP162, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41, Tx643 y Bt). Si los dos progenitores originales no suministran todas las características deseadas, entonces pueden incluirse otras fuentes en la población de reproducción. Por ejemplo, si se desea un híbrido tal que es deseable tanto la resistencia a herbicidas ALS como la resistencia a otros herbicidas como se describe aquí, entonces podrían cruzarse plantas con estos dos atributos, usando técnicas clásicas de reproducción. En el método de linaje, se autofecundaron plantas superiores y se seleccionaron en generaciones sucesivas. En las generaciones sucesivas, la condición heterocigótica da vía a líneas homogéneas como un resultado de la autopolinización y selección. Típicamente, en el método de linaje, se practican cinco o más generaciones de autofecundación y selección (por ejemplo S1, S2, S3, S4, S5, etc.).

El retrocruzamiento es usado para mejorar una línea de planta. El retrocruzamiento transfiere un rasgo específico deseable, de una fuente a otra que carece de él. Esto es logrado mediante, por ejemplo, cruce de un donante (por ejemplo Tailwind) a una línea endógama (por ejemplo Tx2783, una línea élite polinizadora como se describe aquí). La progenie de este cruce es sometida entonces a cruzamiento de retorno (es decir retrocruzamiento) hasta la línea élite endógama, seguido por selección en la progenie resultante respecto al rasgo deseado (por ejemplo resistencia a los herbicidas ALS). Siguiendo cinco o más generaciones de retrocruzamiento con selección respecto al rasgo deseado, la progenie es típicamente heterocigótica para el locus (loci) que controla el fenotipo deseado, pero será

similar al progenitor élite para los otros rasgos genéticos. Típicamente el último retrocruzamiento es autofecundado con objeto de dar una progenie de reproducción pura para el gen que está siendo transferido.

5 En programas actuales de reproducción de sorgo híbrido introgresivo, se desarrollan nuevas líneas progenitoras para que sean líneas progenitoras de semilla (por ejemplo Wheatland, Tx3042, N223, 01MN1589, 03MN954, OK11, QL41 y Tx643) o líneas progenitoras de polen (por ejemplo Tx430, Tx2737, Tx2783, R45, 00MN7645 y HP 162), dependiendo de si contienen o no genes de restauración de la fertilidad; las líneas progenitoras de semilla no tienen genes restauradores de fertilidad y son estériles masculinos en ciertos citoplasmas (también conocidas como plantas de "línea A") y fértiles masculinos en otros citoplasmas (también conocidas como plantas de "línea B"), mientras las líneas progenitoras de polen no son estériles masculinos y contienen genes de restauración de fertilidad (también conocidas como plantas de "línea R"). Típicamente, las líneas progenitoras de semilla son creadas para que sean citoplasmáticamente estériles masculinas tal que los anteros son mínimos a no existentes en estas plantas, requiriendo así polinización cruzada. Las líneas progenitoras de semilla sólo producirán semilla, y el citoplasma es transmitido sólo a través del huevo. El polen para polinización cruzada es suministrado a través de las líneas progenitoras de polen que contienen los genes necesarios para la completa restauración de la fertilidad en el híbrido F1, y el cruce se combina con el progenitor de semilla estéril masculino, para producir un cruce híbrido individual de alto rendimiento con buena calidad de grano. Ejemplos de plantas de línea R y plantas de línea B que encuentran utilidad en la presente invención incluyen, pero no están limitados, a aquellos descritos en la tabla 1.

20

Tabla 1

Linaje	Nueva fuente	Gen	Comentarios
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1903	BC2F5	Línea R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1905	BC2F5	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1916	BC2F5	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1926	BC2F5	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1935	13C2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1936	BC2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1940	BC2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1941	BC2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1944	BC2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1945	BC2F4	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1956	BC2F4	Línea R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1981	BC2F3	Línea R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1984	BC2F3	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1987	BC2F3	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1992	BC2F3	Línea R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1995	BC2F3	Línea R
R45////R45///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-2013	BC2F3	Línea R
Tx2783///Tx2783/Tw	MN07-2075	BC2F4	Línea R
N223///N223//N223/Tw	MN07-2094	BC2F6	Línea B
Wheatland///N223//N223/Tw	MN07-2113	BC2F4	Línea B
Wheatland///N223//N223/Tw	MN07-2118	BC2F4	Línea B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2134	BC2F5	Línea B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2136	BC2F5	Línea B
OK11////OK11///N223//N223/Tw	MN07-2164	BC3F3	Línea B
QL41////QL41////OK11///N223//N223/Tw	MN07-2198	BC4F3	Línea B 75 % DPI
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2230	BC4F3	Línea B
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2248	BC3F3	Línea B

Linaje	Nueva fuente	Gen	Comentarios
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2251	BC3F3	Línea B
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2254	BC3F3	Línea B
03MN954////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2261	BC3F3	Línea B
Tx3042////Tx3042////N223//N223//N223/Tw	MN07-2290	BC4F3	Línea B
Tx3042////Tx3042////N223//N223//N223/Tw	MN07-2293	BC4F2	Línea B
N223//N223//N223/Tw	MN07-2084	BC2F4	Línea B
N223//N223//N223/Tw	MN07-2088	BC2F4	Línea B

5 Típicamente, este sistema citoplasmático masculino restaurador de esterilidad-fertilidad es ejecutado para la producción de semilla híbrida, plantando bloques de filas de plantas masculinas estériles (progenitor de semilla) y bloques de filas de plantas restauradoras de fertilidad (progenitor de polen), para que las plantas progenitoras de semilla sean polinizadas con el viento con polen de la planta progenitora de polen. Este proceso genera un vigoroso híbrido de cruce individual que es cosechado y plantado por el consumidor.

10 Las plantas de progenitor de semilla estériles masculinas pueden ser creadas también mediante reproducción genéticamente recesiva de genes nucleares estériles masculinos dentro de una población particular, sin embargo el sistema restaurador de esterilidad-fertilidad citoplasmático masculino es típicamente el sistema usado para la reproducción de sorgo híbrido. Sleper y Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops*, quinta edición, Blackwell Publishing suministra una buena revisión de los procedimientos actuales de reproducción de sorgo.

15 La presente invención no está limitada a las líneas progenitoras de élite de sorgo listadas, y alguien experto en la técnica reconocerá que cualquier línea élite de sorgo sería igualmente sensible a las composiciones y métodos como se describen aquí.

Transgénicos de la planta

20 Los genes heterólogos cuya expresión se pretende en plantas, son ensamblados primero en vectores de expresión que contienen un gen heterólogo y elementos de control transcripcionales y translacionales apropiados, cuyos métodos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los métodos incluyen técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas de síntesis, y recombinación genética *in vivo*. Las técnicas de ejemplo están descritas ampliamente en la técnica (véase por ejemplo Sambrook. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.).

30 En general, estos vectores comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen heterólogo enlazado de manera operativa a un promotor, y otras secuencias reguladoras (por ejemplo potenciadores, señales de poliadenilación, etc.) requeridos para expresión en una planta.

35 Los promotores incluyen, pero no están limitados a, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, órgano y de desarrollo, y promotores inducibles. Los ejemplos de promotores incluyen, pero no están limitados a; promotor 35S constitutivo de virus de mosaico de coliflor; un promotor de tomate, leucina amino peptidasa inducible por herida (Chao et al., 1999, *Plant Physiol* 120:979-992, incorporado aquí en su totalidad como referencia); un promotor de tabaco inducible químicamente, relacionado con patogénesis 1 (inducida por ácido salicílico y S-metil éster de ácido benzotiadiazol-7-carbotioico); un promotor de choque de calor (patente de EEUU No. 5,187,267; un promotor inducible por tetraciclina (patente de EEUU No. 5,057,422); y promotores específicos de semilla.

40 Los casetes de expresión pueden comprender además cualquier secuencia requerida para la expresión de mRNA. Tales secuencias incluyen, pero no están limitadas a, terminadores de transcripción, mejoradores tales como intrones, secuencias virales, y secuencias destinadas a focalizar el producto de gen a organelos específicos y compartimientos celulares.

45 Está disponible una variedad de terminadores transcripcionales, para uso en expresión de secuencias usando los promotores tales como aquellos divulgados aquí. Los terminadores transcripcionales son responsables de la terminación de la transcripción más allá del producto de transcripción y su correcta poliadenilación. Los terminadores transcripcionales apropiados y aquellos que son conocidos por funcionar en plantas incluyen, pero no están limitados a, el terminador CaMV 35S, el terminador tml, el terminador pea rbcS E9, y el terminador nopalina y octopina sintetasa (Odell et al., 1985, *Nature* 313:810; Rosenberg et al., 1987, *Gene*, 56:125; Guerineau et al., 1991, *Mol. Gen. Genet.* 262:141; Proudfoot, 1991, *Cell*, 64:671; Sanfacon et al., 1990, *Genes Dev.* 5:141; Mogen et al., 1990, *Planta Cell*, 2:1261; Munroe et al., 1990, *Gene*, 91:151; Ballas et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:7891; Joshi et al., 1987, *Nucleic Acid Res.*, 15:9627.

En algunas realizaciones, los fragmentos para expresión del gen heterólogo de interés incluyen una o más de las secuencias, de las que se ha hallado potencian la expresión de gen desde dentro de la unidad transcripcional. Estas secuencias pueden ser usadas conjuntamente con la secuencia de ácido nucleico de interés, para incrementar la expresión en plantas. Se ha mostrado que diferentes secuencias de intron potencian la expresión, en particular en células monocotiledóneas. Se han incorporado rutinariamente secuencias de intron dentro de vectores de transformación de planta, típicamente dentro del líder no trasladado.

En algunas realizaciones, un fragmento para expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés, incluye también un regulador tal como una señal de localización nuclear (Kalderon et al., 1984, Cell 39:499; Lassner et al., 1991, Plant Molecular Biology 17:229), una secuencia de consenso transnacional de la planta (Joshi, 1987, Nucleic Acids Research 15:6643), un intron (Luehrsen y Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225:81), y similares, enlazados de manera operativa a la secuencia de ácido nucleico que codifica un gen heterólogo.

En la preparación del fragmento que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un gen heterólogo, en la codificación de una secuencia diseñada para reducir la expresión de gen heterólogo, pueden manipularse diferentes fragmentos de ADN de modo que se suministra las secuencias de ADN en la orientación deseada (por ejemplo sentido o antisentido) y, según sea apropiado, en el marco de lectura deseado. Por ejemplo, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN, o pueden usarse otras manipulaciones para suministrar sitios convenientes de restricción, retirar el ADN superfluo, retirar los sitios de restricción, y similares. Con este propósito se usan preferiblemente mutagénesis *in vitro*, reparación de cebador, restricción, reforma de la estructura doble, resección, unión y similares, donde se involucran inserciones, eliminaciones o sustituciones (por ejemplo transiciones y transversiones).

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

En algunas realizaciones, el vector de plásmido Ti (T-ADN) es adaptado para uso en un proceso de transfección mediado por *Agrobacterium* tal como en el documento de EEUU 6,369,298 (sorgo), y documentos de EEUU 5,981,839, 6,051,757, 5,981,840, 5,824,877 y 4,940,838. En general, la construcción de plásmidos recombinantes Ti y Ri sigue los métodos usados típicamente con los vectores más comunes, tales como pBR322. Puede hacerse uso adicional de elementos genéticos accesorios hallados algunas veces con los plásmidos nativos y algunas veces construidos a partir de secuencias externas. Estos pueden incluir, pero no están limitados a, genes estructurales para resistencia a antibióticos como genes de selección.

Existen dos sistemas de sistemas de vector de plásmido Ti y Ri recombinante, ahora en uso. El primer sistema es llamado el sistema "cointegrado". En este sistema, el vector transportador que contiene el gen de interés, es insertado mediante recombinación genética dentro de un plásmido Ti no oncogénico que contiene los elementos que actúan en *cis* y que actúan en *trans*, requeridos para la transformación de planta, por ejemplo, en el vector pMLJ1 transportador y el plásmido Ti no oncogénico pGV3850. El uso de TADN como una región de flaqueo en un fragmento para integración dentro de un plásmido Ti o Ri ha sido descrito en EPO No. 116,718 y los documentos de PCT Nos. WO 84/02913, 02919 y 02920; Herrera-Estrella, 1983, Nature 303:209-213; Fraley et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 80:4803-4807; Horsch et al., 1984, Science 223:496-498; y DeBlock et al., 1984, EMBO J. 3:1681-1689.

El segundo sistema es llamado el sistema "binario" en el cual se usan dos plásmidos y se inserta el gen de interés dentro de un vector transportador que contiene los elementos que actúan en *cis*, requeridos para la transformación de la planta. Las otras funciones necesarias son suministradas en *trans* por el plásmido Ti no oncogénico, como se ejemplifica por el vector pBIN19 transportador y el plásmido PAL4404 no oncogénico. Algunos de estos vectores están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de interés es focalizada a un locus particular en el genoma de planta. La integración dirigida al sitio, de la secuencia del ácido nucleico de interés dentro del genoma celular de la planta puede ser lograda mediante, por ejemplo, recombinación homóloga usando secuencias derivadas de *Agrobacterium*. En general, las células de la planta son incubadas con una cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector de focalización en el cual las secuencias que son homólogas a una secuencia de ADN dentro del locus objetivo, están flanqueadas por secuencias de ADN de transferencia (T-ADN) de *Agrobacterium*, como se describió previamente (patente de EEUU No. 5,501,967). Alguien experto en la técnica sabe que puede lograrse la recombinación homóloga usando vectores de focalización que contienen secuencias que son homólogas a cualquier parte del gen de la planta focalizado, sea que pertenezcan a los elementos reguladores del gen o a las regiones

codificadoras del gen. La recombinación homóloga puede ser lograda en cualquier región de un gen de la planta en tanto se conozca la secuencia de ácido nucleico de las regiones que flanquean ese sitio que va a ser focalizado. El *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad de tumores del cuello, transfiriendo algo de su ADN a la planta huésped. El ADN transferido (T-ADN) es integrado de manera estable dentro del genoma de planta, donde su expresión conduce a la síntesis de hormonas de la planta y así al crecimiento de tumores de las células. Un complejo putativo macromolecular se forma en el proceso de transferencia de T-ADN desde la célula bacteriana hasta la célula de la planta.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos como se divulgan aquí son utilizados para construir vectores derivados de virus ARN (+) de la planta (por ejemplo virus de mosaico de bromegro, virus de mosaico de tabaco, virus de mosaico de alfalfa, virus de mosaico de pepino, virus de mosaico de tomate, y combinaciones e híbridos de ellos). En general, el polinucleótido heterólogo que se inserta puede ser expresado desde estos vectores como una proteína de fusión (por ejemplo proteína de fusión de proteína de cobertura) desde su propio promotor subgenómico u otro promotor. En los documentos de EEUU Nos. 5,846,795; 5,500,360; 5,173,410; 5,965,794; 5,977,438; y 5,866,785 se describen los métodos de construcción y uso de tales virus.

En algunas realizaciones, se introduce directamente dentro de una planta una secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés, que comprende un transgen de ALS mutante, como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 depositado bajo ATCC No: PTA-7999. En algunas realizaciones, el transgen de ALS mutante es homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97%, u homólogo en por lo menos 99% al gen de resistencia a los herbicidas ALS, como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 y comprende las sustituciones de aminoácidos Val₅₃Ile y Trp₅₄₅Leu. Un vector útil para dirigir técnicas de transferencias de gen en combinación con selección por el herbicida Basta (o fosfotricina) es una versión modificada del plásmido pCIB246, con un promotor CaMV 35S en fusión operacional al gen GUS de *E. coli* y el terminador CaMV 35S transcripcional (WO 93/07278).

Una vez una secuencia de ácido nucleico que codifica el gen heterólogo está enlazada de modo operativo a un promotor apropiado y se inserta en un vector adecuado para la técnica particular de transformación utilizada (por ejemplo uno de los vectores descritos anteriormente), puede introducirse dentro de la célula de la planta el ADN recombinante descrito anteriormente, en varias formas reconocidas en la técnica. Aquellos expertos en la técnica notarán que la elección del método depende del tipo de la planta que es objetivo de transformación. En algunas realizaciones, el vector es mantenido de modo de episoma. En algunas realizaciones, el vector es integrado dentro del genoma. En algunas realizaciones, se usa la transformación directa en el genoma de plástido, para introducir el vector dentro de la célula de la planta (por ejemplo, véanse documentos de EEUU Nos. 5,451,513; 5,545,817; 5,545,818; documento WO 95/16783).

La técnica básica para la transformación del cloroplasto involucra la introducción de regiones de ADN de plástido clonado que flanquean a marcadores seleccionables, junto con el ácido nucleico que codifica las secuencias de interés, dentro de un tejido objetivo adecuado (por ejemplo usando biolística o transformación de protoplasto con cloruro de calcio o PEG). Las regiones de flaqueo de 1 a 1.5 kb, denominadas secuencias de objetivo, facilitan la recombinación homóloga con el genoma de plástido y así permiten el reemplazo o modificación de regiones específicas del plástido. Inicialmente, se usan mutaciones puntuales en el rARN 16S y genes rps 12 del cloroplasto que confieren resistencia a espectinomicina y/o estreptomina, como marcadores seleccionables para la transformación (Svab et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:8526; Staub y Maliga, 1992, Planta Cell, 4:39). La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permite la creación de un plástido que tiene como objetivo la introducción de vector de moléculas externas de ADN (Staub y Maliga, 1993, EMBO J., 12:601). Se obtienen incrementos sustanciales en la frecuencia de transformación, mediante el reemplazo de rARN recesivo o genes de resistencia a antibióticos por proteína r, con un marcador seleccionable dominante, el gen bacteriano aadA que codifica la enzima aminoglicósido-3'-adeniltransferasa que desintoxica espectinomicina (Svab y Maliga, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:913). En la técnica se conocen otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plástido y están incluidos dentro del alcance de la presente invención. Se obtienen plantas homoplásmicas para genomas de plástido que contienen las dos secuencias de ácido nucleico separadas por un promotor de la presente invención, y preferencialmente son capaces de elevada expresión de ARNs codificados por la molécula de ADN.

En una realización, los vectores útiles en la práctica de la presente invención son aplicados con microinyección directamente dentro de las células de la planta (Crossway, 1985, Mol. Gen. Genet., 202:179). En algunas realizaciones, el vector es transferido dentro de la célula de la planta usando polietilenglicol (Krens et al., 1982, Nature, 296:72; Crossway et al., 1986, BioTechniques, 4:320); fusión of protoplastos con otras entidades tales como minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos con superficie de lípidos fusibles (Fraley et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., EEUU, 79:1859); y transformación de protoplasto (EP 0 292 435); transferencia directa de genes (Paszowski et al., 1984, EMBO J., 3:2717; Hayashimoto et al., 1990, Planta Physiol, 93:857).

En algunas realizaciones, el vector puede ser introducido también dentro de las células de la planta mediante electroevaporación. (Fromm, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824; Riggs et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602). En esta técnica, los protoplastos de la planta son sometidos a electroevaporación en presencia de plásmidos que contienen el fragmento de gen. Los impulsos eléctricos de elevada fuerza de campo dan

permeabilidad de manera reversible a las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de planta sometidos a electroevaporación reforman la pared celular, dividen, y forman callo de planta.

Adicionalmente a la transformación directa, en algunas realizaciones, los vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen heterólogo son transferidos usando transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee et al., 1988, *Biotechnology*, 6:915; Ishida et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:745). *Agrobacterium* es un género representativo de la familia Rhizobiaceae gram-negativa. Sus especies son responsables de los tumores de planta, tales como enfermedad de tumores de cuello y raíz velluda. En el tejido no diferenciado característico de los tumores, se producen y se catabolizan derivados de aminoácidos conocidos como opinas. Los genes bacterianos responsables de la expresión de opinas son una fuente conveniente de elementos de control para casetes de expresión química. Pueden introducirse dentro de células apropiadas de planta, secuencias genéticas heterólogas (por ejemplo secuencias de ácido nucleico unidas de manera operativa a un promotor de la presente invención), mediante el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (descrito anteriormente). El plásmido Ti es transmitido a las células de la planta por infección mediante *Agrobacterium tumefaciens*, y es integrado de manera estable dentro del genoma de la planta (Schell, 1987, *Science*, 237:1176). Las especies que son susceptibles de infección por *Agrobacterium* pueden ser transformadas *in vitro*. En el documento de EEUU 6,369,298 se suministran métodos de transformación para producir plantas transgénicas de sorgo usando transformación mediada por *Agrobacterium*.

En algunas realizaciones, el vector es introducido mediante aceleración balística de partícula (documento de EEUU No. 4,945,050; Casas et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11212).

En algunas realizaciones, después de seleccionar el material de la planta transformada que puede expresar un gen heterólogo que codifica una proteína heteróloga o variante de ella, se regenera la totalidad de las plantas. La regeneración de la planta a partir de protoplastos cultivados es descrita en Evans et al., *Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1: (MacMillan Publishing Co. Nueva York, (1983); Vasil I. R. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I, (1984) y Vol. III, (1986). Es sabido que muchas plantas pueden ser regeneradas a partir de células o tejidos cultivados que incluyen, pero no se limitan a, células o tejidos cultivados incluyendo, pero sin limitarse a, todas las especies mayores de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, frutas y otros árboles, legumbres y vegetales, y monocotiledóneas (por ejemplo las plantas descritas anteriormente). Los medios para regeneración varían de especie a especie de planta, pero generalmente se suministra primero una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma tejido de callo y pueden inducirse brotes a partir del callo y a continuación se forman raíces.

De modo alternativo, puede inducirse la formación de embrión a partir de la suspensión de protoplasto. Estos embriones germinan y forman plantas maduras. Generalmente el medio de cultivo contendrá diferentes aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. Normalmente los brotes y raíces se desarrollan simultáneamente. La regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo, y de la historia del cultivo. La reproducibilidad de la regeneración depende del control de estas variables.

Ejemplos

Ejemplo 1- resistencia a herbicida en genotipo de sorgo

Se plantaron semillas del genotipo silvestre de sorgo que mostraban exhibir un fenotipo resistente a ALS, designado "Tailwind", y un genotipo de sorgo susceptible a herbicida, designado 90SN7, en macetas de 12 litros en un invernadero. Varias de cada tipo de planta fueron atomizadas con 1) herbicida Lightning (una combinación de Imazetapir y Imazapir) a una tasa de 2.56 onzas acre⁻¹ (una tasa de herbicida 2x), 2) herbicida Steadfast® (DuPont™; una combinación de Nicosulfuron y Rimsulfuron) a una tasa de 1.50 onzas acre⁻¹ (un herbicida 2x), o 3) una combinación de herbicida Lightning a una tasa de 2.56 onzas acre⁻¹ y herbicida Steadfast® a una tasa de 1.50 oz acre⁻¹. Para cada tratamiento, las plantas de Tailwind no mostraron esencialmente daño después de 12 días de la aplicación del herbicida, mientras las plantas 90SN7 murieron, demostrando que Tailwind tenía resistencia cruzada a las clases de herbicidas IMI que inhiben ALS (herbicida Lightening) y SU (herbicida Steadfast®).

Ejemplo 2 - Cruces de Tailwind con líneas progenitoras de élite de sorgo

Se cruzó Tailwind con diferentes progenitores de élite, incluyendo Tx430 y Wheatland. Se evaluaron mediante análisis de segregación las poblaciones F2 derivadas de cruces con estos progenitores, para determinar el número de genes involucrados en la expresión de tolerancia. Las poblaciones de plantas fueron cultivadas en un invernadero y fueron atomizadas con ratas 1x y 3x de herbicida Accent® (DuPont™; Nicosulfuron), herbicida Option® (BayerCropScience; Foramsulfuron), y herbicida Steadfast®. Los recuentos de población de plantas vivas/muertas permitieron el análisis genético.

El análisis de segregación indicó un gen individual mayor parcialmente dominante en la población derivada de Tx430 para cada tratamiento con herbicida. Análisis similares de poblaciones derivadas de cruces con Wheatland indicaron

un gen individual mayor, parcialmente dominante así como potencialmente dos o tres genes modificadores que influyeron en la expresión relativa del rasgo de tolerancia.

5 Se iniciaron esfuerzos de reproducción de plantas realizando retrocruzamiento del rasgo de tolerancia dentro de progenitores polinizadores comercialmente importantes de élite de sorgo, incluyendo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, y HP162 así como progenitores de semilla comercialmente importantes de élite de sorgo incluyendo Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 y Tx643, con selección de la tolerancia al herbicida en cada generación. La semilla resultante del cruce de Tailwind con Tx2783 (BC2F3:F4) fue depositada en el ATCC para acceso público.

10 Ejemplo 3 - determinación de secuencia de gen para gen de resistencia a ALS

Se iniciaron esfuerzos de determinación de secuencia de gen, para determinar si existió una mutación de vista objetivo para el fenotipo de tolerancia a los herbicidas. Una búsqueda de secuencia ejecutada usando la Herramienta de Búsqueda por Alineación Local Básica (BLAST) de National Institute of Health en la base de datos de The Institute for Genomic Research (TIGR) Planta Transcript Assemblies identificó un montaje de transcripción que representa un gen ALS de sorgo (A3960_4558; SEQ ID NO: 1). Se diseñaron cebadores de amplificación para la reacción de cadena de polimerasa (PCR), F4r-CACATCACCCCTTGTACCAGCTC (SEQ ID NO: 3) y B5-GATTGTGCACATTGATATTGATCC (SEQ ID NO: 4), para amplificar regiones del gen de sorgo análogas a regiones del gen AHAS de *Arabidopsis thaliana*, del que se pensaba ejercía influencia en la expresión de la tolerancia a los herbicidas ALS (*A. thaliana*: Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Trp₅₇₄, y Ser₆₅₃; Tan et al., 2005).

Se usaron exitosamente cebadores de amplificación de cadena de reacción de polimerasa, para amplificar la región del gen en genotipo de sorgo resistente a los herbicidas (S1-1, S1-2 y S1-3) y susceptible a los herbicidas (Tx623 y Tx430), usando las siguientes condiciones de formación térmica de ciclo: desnaturalización a 94°C por 60 segundos, reforma de la estructura doble a 62°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos. Los productos de amplificación PCR fueron purificados usando el kit de purificación QIAquick PCR (QIAGEN) y se determinó la secuencia en la instalación de determinación de secuencia de la Universidad del Estado de Kansas. La secuencia deducida de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) muestra mutaciones en Val₅₃₁Ile (GTC a ATC), correspondiente a *thaliana* Val₅₆₀Ile, y Trp₅₄₅Leu (TGG a TTG), correspondiente a *thaliana* Trp₅₇₄Leu, en genotipos resistentes al herbicida (Figura 1).

Listado de secuencia

35 <110> Kansas State University Research Foundation Tuinstra, Mitchell R. A1-Khatib, Kassim
 <120> sorgo resistente a herbicida de acetolactato sintetasa
 <130> 69.67.102790/01
 40 <140> PCT/US2007/086612
 <141> 2007-12-06
 <150> US 60/873,529
 <151> 2006-12-07
 45 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.4
 50 <210> 1
 <211> 2266
 <212> ADN
 <213> sorgo bicolor
 55 <400> 1

ES 2 641 088 T3

gtgccccgc cccaaaccct cgcgcccgcct ccgagacagc cgccgcaacc atggccacca 60
 ccgccgccgc cgetgccgcc gcgctagccg gcgccactac cgctgcccgc aaggcgaggc 120
 gccgggcgca cctcctggcc gcacggcgcg ccctcgcccgc gccatcagg tgctcagcgg 180
 cgccacccgc cacgctgacg gtgacggctc ccccggccac cccgctccgg ccgtggggcc 240
 ccaccgatcc ccgcaagggc gccgacatcc tcgtcgaggc tcttgagcgc tgcggcgctc 300
 gcgacgtctt cgcctacccc ggcggcgcggt ccatggagat ccaccaggca ctcaccggtt 360
 cccccgtcat cgccaaccac ctcttcgcgc acgagcaagg ggaggccttc gccgcctctg 420
 gcttcgcgcg ctccctgggc cgcgtcggcg tctgcgtcgc cacctccggc cccggcgcca 480
 ccaacctagt ctccgcgctc gccgacgcgc tgctcgactc cgtcccatg gtcgccatca 540
 cgggacaggt tccgcggcgc atgattggca ccgacgcctt ccaggagacg cccatcgctc 600
 aggtcaccgc ctccatcacc aaacataact acctggctct cgacgtcgac gacatcccc 660
 gcgtcgtgca ggaggctttc ttctcgcct cctccggctc cccgggaccg gtgcttgctc 720
 acatccccaa ggacatccag cagcagatgg ccgtgccggt ctgggacacg cccatgagtc 780
 tgccctggga cattgcgcgc cttcccaagc ctctcgcgac tgaattgctt gagcaggtgc 840
 tgcgctctgt tggatgaatca aggcgcctc ttctttatgt tgggtggggc tgcgcagcat 900
 ctggcgagga gttgcgccgc tttgtggaga tgactggaat cccagtcaca actactctta 960
 tgggccttgg caatttcctt ggcgacgacc cactgtctct gcgcatgctt ggtatgcatg 1020
 gcacgggtga tgcaaattat gcagtgata aggcggatct gttgcttgca tttgggtgtc 1080
 ggtttgatga tcgtgtgaca ggggaagattg aggcctttgc aagcagggct aagattgtgc 1140
 acattgatat tgatcccgtc gagattggca agaacaagca gccacatgtg tccatctgtg 1200

ES 2 641 088 T3

cagacgtaa gcttgctttg cagggcatga atgctcttct ggaaggaagc acatcaaaga 1260
 agagctttga ctttggctca tggcaagctg agttggatca gcagaagaga gagttcccc 1320
 ttgggtataa aacttttgat gacgagatcc agccacaata tgctattcag gttcttgatg 1380
 agctgacaaa aggggaggcc atcattgcca caggtggtgg gcagcaccag atgtgggcgg 1440
 cacagtacta cacttacaag cggccaaggc agtggttgtc ttcagctggt cttggggcta 1500
 tgggatttgg tttgccggct gctgctggcg ctgctgtggc caaccaggt atcactgttg 1560
 ttgacatcga cggagatggt agcttcctca tgaacattca ggagctagct atgatccgaa 1620
 ttgagaacct cccagtgaag gtctttgtgc taaacaacca gcacctgggg atgggtggtgc 1680
 agtgggagga caggttctat aaggccaata gagcacacac atacttggga aaccagaga 1740
 atgaaagtga gatatatcca gatttcgtga caattgcca agggttcaac attccagcag 1800
 tccgtgtgac aaagaagagc gaagtccatg cagcaatcaa gaagatgctt gagactccag 1860
 ggcatacct cttggatata atcgtcccgc accaggagca tgtgttgctt atgatcccta 1920
 gtggtggggc tttcaaggat atgatcctgg atggtgatgg caggactgtg tattgatcta 1980
 aatttcagca tgcacatctc cctgcctttc tttgacatgc atatgagctg gtacaagggt 2040
 gatgtgttat ttatgtgatg ttctcctgtg ttctatcttt ttgtaagccg tcagctatct 2100
 atagtgtgct tgtttgatgt actctgttat ggtaatctta agtagtttcc tacctttag 2160
 tgggtgtagtc tgttgtttgc tgctggcata tctgtcatca gaggtcatgt aagtgccttt 2220
 tgctacagat aaataaggaa ataagcattg ctatgcagtg gttctg 2266

<210> 2
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> sorgo bicolor

5

<400> 2

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

10

ES 2 641 088 T3

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

ES 2 641 088 T3

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

ES 2 641 088 T3

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

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val
625 630 635 640

Tyr

<210> 3
<211> 22
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sintético
10
<400> 3
cacatcacc ttgtaccagc tc 22

<210> 4
15 <211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> sintético

<400> 4
gattgtgcac attgatattg atcc 24

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa, en la que dicha secuencia comprende:

5 (i) una secuencia que comprende el montaje de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research Transcript, que tiene la secuencia:

GTGCCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCCTCCGAGACAGCCGCCGCAA
 CCATGGCCACCACCGCCGCCGCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGCCA
 CTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGCGCACCTCCTGGCCGCAC
 GGCGCGCCCTCGCCGCGCCATCAGGTGCTCAGCGGCCGCCACCCGCCA
 CGCTGACGGTGACGGCTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTGGGGCC
 CCACCGATCCCCGCAAGGGGCGCCGACATCCTCGTCGAGGCTCTTGAGC
 GCTGCGGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCCATGG
 AGATCCACCAGGCACTCACCCGTTCCCCGTCATCGCCAACCACCTCT
 TCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCCTCTGGCTTCGCGCGCT
 CCTCGGGCCGCGTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCA
 CCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCCA
 TGGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGGCGCATGATTGGCACCGACG
 CCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAAC
 ATAACTACCTGGTCCTCGACGTCGACGACATCCCCCGCGTCGTGCAGG
 AGGCTTTCTTCTCGCTCCTCCGGTCGCCCGGGACCGGTGCTTGTGCA
 CATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACA
 CGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTCCAAGCCTCCTG
 CGACTGAATTGCTTGAAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGAATCAAGGC
 GCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCATCTGGCGAGGAGTT
 GCGCCGCTTTGTGGAGATGACTGGAATCCCAGTCACA ACTACTCTTAT
 GGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTT
 GGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCGGAT
 CTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAG
 ATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGTGCACATTGATATTGAT
 CCCGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCA
 GACGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAAGC
 ACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCATGGCAAGCTGAGTTGGAT
 CAGCAGAAGAGAGAGTTCCCCCTTGGGTATAAACTTTTGATGACGAG

10

ATCCAGCCACAATATGCTATTCAGGTTCTTGATGAGCTGACAAAAGGG
 GAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGCAGCACCAGATGTGGGCGGC
 ACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAGCTGG
 TCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCGGCTGCTGCTGGCGCTGCTGTG
 GCCAACCCAGGTATCACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTATGATCCGAATTGAGAACCTCCCA
 GTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG
 TGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACACATACTGGG
 AAACCCAGAGAATGAAAGTGAGATATATCCAGATTCGTGACAATTGC
 CAAAGGGTTCAACATTCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAG
 TCCATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCT
 TGGATATAATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTA
 GTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGGTGGCAGGACTG
 TGTATTGATCTAAATTTGAGCATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACA
 TGCATATGAGCTGGTACAAGGGTGTGTGTTATTTATGTGATGTTCTCC
 TGTGTTCTATCTTTTTGTAAGCCGTCAGCTATCTATAGTGTGCTTGTGTTG
 ATGACTCTGTTATGGTAATCTTAAGTAGTTTCCTACCTTGTTAGTGGTG
 TAGTCTGTTGTTTCGTGCTGGCATACTGTGCATCAGAGGTCATGTAAGT
 GCCTTTTGCTACAGATAAATAAGGAAATAAGCATTGCTATGCAGTGGT
 TCTG

- 5 o una secuencia que es homóloga en por lo menos 95% a ella, y que comprende además las sustituciones de nucleótidos de guanina sustituida con adenina en la posición 1641 y guanina sustituida con timina en la posición 1684; o (ii) un gen de resistencia a acetolactato sintetasa como se halla en ATCC No. PTA-7999, o una secuencia que es homóloga en por lo menos 95% a ella, que comprende además las sustituciones de nucleótido de guanina sustituida con adenina en la posición 1641 of TA3960_4558 cuya secuencia se mostró anteriormente bajo (i) y guanina sustituida con timina en la posición 1684 of TA3960_4558.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la secuencia codificada de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos deducida del montaje de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia:

MATTAATAAALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPATLTVTAPP
 ATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCGVRDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVIANHL
 FRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQ
 VPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRVVQEAFFLASSGRPGPVLV
 DIPKDIQQQMAVPVWDTMPSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPVLYVGG
 GCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVD
 KADLLAFGVRFDDEVTKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVVICADVKLAL
 QGMNALLEGSTSKKSFDFGSWQAELDQOKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQVLDL
 TKGEAIIATGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFLPAAAGAAVAN
 PGITVVDDIDGDSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQHLGMVVQWEDRFYKAN
 RAHTYLGPNENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKMLETGPYLLDI
 IVPHQEHVLPMPSSGAFKDMILDGDGRTVY

15 que comprende además las sustituciones de aminoácidos de Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

- 20 3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2 enlazada de manera operativa con un promotor y enlazada de manera operativa con por lo menos una secuencia reguladora.
4. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 3, en la que la célula es una célula de planta.

5. Un virus de ARN que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
6. Una planta de sorgo que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 5 7. La parte de la planta de sorgo de la reivindicación 6, en la que la parte de la planta de sorgo es una semilla o un tejido de la planta.
8. Un método para transformar una célula de la planta, que comprende la transformación de dicha célula con el vector de la reivindicación 3.
- 10 9. El método de la reivindicación 8, que comprende además el paso de regeneración de una planta transgénica a partir de la célula de la planta transformada.
- 15 10. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
11. El polipéptido de la reivindicación 10, en el que el polipéptido comprende la secuencia deducida de aminoácidos del montaje de transcripción número TA3960_4558 de The Institute for Genomic Research, la cual tiene la secuencia:

MATTAaaaaaALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPATLTVTAPP
ATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCGVRDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVIANHL
FRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQ
VPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRVVQEAFFLASSGRPGPVLV
DIPKDIQQQMAVPVWDTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPVLYVGG
GCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVD
KADLLAFGVRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVCLAL
QGMNALLEGSTSKKSDFGWSQAELDQKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQVLDEL
TKGEAIIATGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGAAVAN
PGITVVDIDGDSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNQNHLGMVVQWEDRFYKAN
RAHTYLGPNENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDI
20 IVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY

que comprende además las sustituciones de aminoácidos de Val₅₃₁Ile y Trp₅₄₅Leu.

FIGURA 1

	1634	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710
Proyecto_Genoma	1631	CCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
(c) 22_f4r-Tx623	500	CCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
32_B5-Tx623	473	CCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
9_B5--430	471	CCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
10_B5-S1-1	477	CCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
11_B5-S1-2	472	CCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
12_B5-S1-3	474	CCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG
(c) 21_F4r-S1-3	502	CCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG	TTGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG	TGG	GAGGACAGGTTCTTATAAGGCCCAATAGAG