

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 945**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2007 PCT/US2007/086612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2008 WO08073800**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2007 E 07869010 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2102349**

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:

**27.11.2017**

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 2 643 945 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 INVENCION**

- 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 INVENCION**

- 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 (IMI), 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). Zelaya & Owen (Weed Sci., 2004, 52, pp 538-48) se relacionan con la resistencia evolucionada a los herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa en el girasol común (*Helianthus annuus*), ambrosía gigante (*Ambrosia trifida*) y Shattercane (*Sorghum bicolor*) en Iowa. El documento WO 2006/007373 se refiere a polinucleótidos que codifican proteínas de subunidades grandes de la acetohidroxiácido sintasa madura para crear plantas tolerantes a la imidazolinona. El documento US5633437 divulga un gen aislado de ajonjera que exhibe resistencia a herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa. 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 imidazolinona.

- 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 INVENCION**

- 65 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.

5 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.

10 En las reivindicaciones se definen las realizaciones de la presente invención. En particular, la presente invención se relaciona con un híbrido de sorgo en el que dicho germoplasma 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 el que dicho germoplasma híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintasa comprende:

15 (i) una secuencia que comprende el montaje de transcripción número TA3960\_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia:

```

GTGCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCTCCGAGACAGCCGCCGCAACCATGGCCACCACCGCCGC
CGCCGCTGCCGCGCGCTAGCCGCGCCACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGCGCACCT
CCTGGCCGCACGGCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCTCAGCGGCGCCACCCGCCACGCTGAC
GGTGACGGCTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTGGGGCCCCACCGATCCCCGCAAGGGCGCCGA
CATCTCGTCGAGGCTCTTGAGCGCTGCGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGCGGCGCGTCC
ATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGTTCCCCGTCATCGCCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAAGG
GGAGGCCCTTCGCCGCTCTGGCTTCGCGCGCTCCTCGGGCCGCGTCCGGCGTCTGCGTCCACCTCC
GGCCCCGGCGCCACCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCCATGGTCG
CCATCACGGGACAGGTTCCGCGGCGCATGATTGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGA
GGTCACCCGCTCCATACCAAACATAACTACCTGGTCTCGACGTGACGACATCCCCGCGTCCGTGC
AGGAGGCTTTCTTCTCGCCTCCTCCGGTCCGCCGGGACCGGTGCTTGTGACATCCCCAAGGACATC
CAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTC
CCAAGCCTCCTGCGACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGAATCAAGGCGCCCTGTTT
TTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCATCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTGTGGAGATGACTGGAATC
CCAGTCACAACCTACTCTTATGGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGACCCACTGTCTCTGCGC
ATGCTTGGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCGGATCTGTTGCTTGCATTT
GGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAGATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGTGCA
CATTGATATTGATCCCGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGACAGCATTAA
GCTTGCTTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAAGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTC
ATGGCAAGCTGAGTTGGATCAGCAGAAGAGAGATTCCCCCTTGGGTATAAACTTTTATGACGAGAT
CCAGCCACAATATGCTATTCAGGTTCTTGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGT
TGGGCAGCACAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAG
CTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGGCGGCTGCTGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTATC
ACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTATGATCCGAATT
GAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGA
CAGGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACATACTTGGGAAACCCAGAGAATGAAAGTGAGATATATCC
AGATTTGCTGACAATTGCCAAGGGTTCAACATTCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCA
TGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACAGGA
GCATGTGTTGCCTATGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGGTGGCAGGAC
TGTGATTGATCTAAATTCAGCATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACATGCATATGAGCTGGTACAA
GGGTGATGTGTTATTTATGTGATGTTCTCCTGTGTTCTATCTTTTTGTAAGCCGTCAGCTATCTATAGTGT
GCTTGTGTTGATGACTCTGTTATGGTAATCTTAAGTAGTTTCTACCTTGTAGTGGTGTAGTCTGTTGTTT
CGTGCTGGCATATCTGTCATCAGAGGTGATGTAAGTGCCTTTTGTACAGATAAAATAAG-
GAAATAAGCATTGCTATGCAGTGTTCTG, y
    
```

20 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) mutaciones en el gen de acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999,

25 La presente invención también se refiere a una semilla del híbrido de sorgo de la presente invención, en la que el germoplasma de dicha semilla comprende un gen de acetolactato sintasa mutante como se definió más arriba.

La presente invención también se refiere a un método para cultivar el híbrido de sorgo de la presente invención, que comprende:

5 a) proveer uno o más herbicidas de acetolactato sintasa como se definió más arriba,

b) aplicar dichos uno o más herbicidas de acetolactato sintasa a un campo que comprende dicho híbrido de sorgo, y

10 c) controlar malezas en la proximidad de dicho híbrido de sorgo de manera que el crecimiento de malezas se vea afectado negativamente por la aplicación de dicho uno o más herbicidas y el crecimiento de dicho híbrido de sorgo no se vea afectado negativamente.

15 La presente invención también se refiere a un método para producir una línea de planta híbrida de sorgo resistente a uno o más herbicidas de acetolactato sintasa que comprende la incorporación del gen resistente a herbicida de acetolactato sintasa como se definió más arriba en una línea de planta de sorgo de élite a través de transgénesis heteróloga del gen.

La presente invención también se refiere a un método para identificar líneas de plantas de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintasa que comprende:

20 a) suministrar una muestra de ácido nucleico de una planta de sorgo, en la que dicha muestra de ácido nucleico comprende:

25 (i) una secuencia que comprende ensamble de transcripción número TA3960\_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia como se delineó más arriba, 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) mutaciones en el gen de acetolactato sintasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999,

30 b) proveer cebadores de amplificación para amplificar una región de una planta de sorgo que corresponde a un gen de acetolactato sintasa presente en dicha muestra de ácido nucleico,

35 c) aplicar dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácido nucleico de tal manera que se produce la amplificación de dicha región de dicho gen de acetolactato sintasa y

d) identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintasa con base en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas de acetolactato sintasa presentes en dicha muestra de ácido nucleico amplificado.

40 En ciertas realizaciones, dichos uno o más herbicidas de acetolactato sintasa son de un grupo que consiste en sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopiridamidas y pirimidiniltiobenzoatos, preferiblemente del grupo que consiste en nicosulfuron, rimsulfuron y metsulfuron-metilo.

45 En una realización, la invención suministra una o más plantas de sorgo cuyo germoplasma comprende una mutación de la invención, que genera la planta resistente a herbicidas de ALS. Además en realizaciones adicionales la invención se relaciona con 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 híbridos 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.

50 En una realización, la presente invención provee un híbrido de sorgo de la invención en donde 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, trazolopirimidinas y pirimidiniltiobenzoatos. 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.

60 Se divulga aquí 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.

En una realización, la presente invención provee un híbrido de sorgo de la invención, 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. En algunas realizaciones, el híbrido de sorgo de la invención 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. En algunas realizaciones, el híbrido de sorgo de la invención 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.

En una realización, la presente invención provee 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 de la invención resistente a los herbicidas, y que introduce dicho germoplasma dentro de una línea de la planta élite de sorgo. Como se describe aquí, dicha introducción de dicho germoplasma en dicha línea de planta de sorgo de élite puede ser introgresión. En algunas realizaciones, dicha introducción de dicho germoplasma en dicha línea de planta de sorgo de élite es mediante la introducción de un gen heterólogo.

En una realización, la presente invención provee un híbrido de sorgo de la invención 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.

En una realización, la presente invención provee 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 que comprende una secuencia como se define más arriba 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.

En una realización, la presente invención provee semillas de sorgo en la que dicho germoplasma de dichas semillas comprende un gen mutante de acetolactato sintetasa de la 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. Se divulga aquí, el gen mutante de acetolactato sintetasa puede ser 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 plantas de sorgo que crecen de dichas semillas y partes de la planta adicionales derivadas de las plantas de sorgo cultivadas a partir de dichas semillas.

En una realización, la presente invención provee 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. En realizaciones adicionales, 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.

Se divulga aquí un híbrido de sorgo que comprende un gen que es homólogo en por lo menos 70%, homólogo en por lo menos 80%, homólogo en por lo menos 85%, homólogo en por lo menos 90%, 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 encuentra en ATCC No. PTA-7999. Se divulga aquí el gen resistente a los herbicidas ALS que es homólogo en por lo menos 70%, homólogo en por lo menos 80%, homólogo en por lo menos 85%, homólogo en por lo menos 90%, homólogo en por lo menos 95%, homólogo en por lo menos 97% u homólogo en por lo menos 99% al gen resistente a herbicidas ALS como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 comprende uno o más de las sustituciones de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu, como se encuentra por ejemplo en SEQ ID NO: 1.

Se divulga 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

La figura 1 muestra la doble mutación de Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu en el gen ALS de sorgo que se halló estaba asociado con resistencia a los herbicidas ALS.

DEFINICIONES

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 "F<sub>1</sub>") 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 "F<sub>2</sub>") en referencia a una semilla y su planta.

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.

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.

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.

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 pirimidiniltiobenzosatos.

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.

5 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.

10 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 nucleótico 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.

20 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.

### 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se divulgan aquí genes que codifican genes y 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 para uso en la presente invención 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 F<sub>1</sub>, seguido por dos cruces de retorno (BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>:F<sub>4</sub>), 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). En algunas realizaciones un híbrido de sorgo cuyo germoplasma comprende un gen sintético cril Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es introgresado en una línea de sorgo de la invención 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. Se divulga aquí, el gen de resistencia a herbicidas ALS es homólogo en por lo menos 70%, es homólogo en por lo menos 80%, es homólogo en por lo menos 85%, es homólogo en por lo menos 90%, 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. El gen resistente a herbicidas ALS se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 comprende las sustituciones de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu. 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. En algunas realizaciones, la incorporación del germoplasma de resistencia a ALS definida más arriba 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 definida más arriba dentro de líneas élite es mediante transgénesis heterólogas de gen. En algunas realizaciones, la invención provee 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. En algunas realizaciones, la presente invención provee 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. Se divulga aquí, el gen de resistencia a los herbicidas ALS como se encuentra en un híbrido de sorgo es homólogo en por lo menos 70%, es homólogo en por lo menos 80%, es homólogo en por lo menos 85%, es homólogo en por lo menos 90%, 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 encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu.

En algunas realizaciones, el germoplasma de resistencia a los herbicidas ALS definido más arriba 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.

En una realización, el germoplasma de resistencia a los herbicidas ALS definido más arriba es introgresado dentro de una planta de sorgo que suministra alimento para consumo humano. En algunas realizaciones, 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 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.

En una realización, la presente invención provee métodos que involucran controlar malezas en un campo de plantas de cultivo de sorgo de la presente invención. En algunas realizaciones, 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 que se aplica 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, triofensulfurona, y tritosulfurona. En algunas realizaciones, el herbicida ALS que se aplica es de la familia de herbicidas de imidazolinona, que comprende uno o más de los ingredientes activos imazametabenz-metilo, imazamox, imazapic, imizapir, imizaquin, e imazetapir. En algunas realizaciones, el herbicida ALS que se aplica es de la familia de herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, que comprende uno o más de los ingredientes activos bispiribac-sodio, piribenzoxim, piriftalid, piriminobacmetilo, y piritiobac-sodio. En algunas realizaciones, el herbicida ALS que se aplica 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 que se aplica 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 definido más arriba 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. Se divulga aquí, el gen ALS es homólogo en por lo menos 70%, es homólogo en por lo menos 80%, es homólogo en por lo menos 85%, es homólogo en por lo menos 90%, es homólogo en por lo menos 95%, es homólogo en por lo menos 97%, es homólogo en por lo menos 99%, frente al gen mutante de ALS como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419. Se divulga aquí el gen mutante de ALS que es homólogo en por lo menos 70%, homólogo en por lo menos 80%, homólogo en por lo menos 85%, homólogo en por lo menos 90%, 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 como se encuentra en el germoplasma KSU 06MN8419 comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu.

*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 un híbrido de sorgo que comprenden un germoplasma definido más arriba 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*.

En una realización, la presente invención provee un híbrido de sorgo de la presente invención 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, benzotiadiazinonas, nitrilos, fenil-piridinas), inhibidores de fotosíntesis en el fotosistema I (por ejemplo bupiridilios), 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 dihidropterato 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.

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.

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	BC2F4	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

Linaje	Nueva fuente	Gen	Comentarios
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 (QL41)
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2230	BC4F3	Línea B
01MN1589////Wht///N223//N223/Tw	MN07-2248	BC3F3	Línea B
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); 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.

Los casetes de expresión pueden comprender además cualquier secuencia requerida para la expresión de mRNA.

5 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.

10 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).

20 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.

25 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.

30 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.

40 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).

45 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).

50 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.

60 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 flanqueo 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 in 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 bromegrano, 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. Se divulga aquí, el transgen de ALS mutante es homólogo en por lo menos 70%, homólogo en por lo menos 80%, homólogo en por lo menos 85%, homólogo en por lo menos 90%, 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. Se divulga aquí el transgen ALS mutante que es homólogo en por lo menos 70%, homólogo en por lo menos 80%, homólogo en por lo menos 85%, homólogo en por lo menos 90%, 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 comprende uno o más de las sustituciones de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile y Trp<sub>545</sub>Leu. Un vector útil para dirigir técnicas de transferencias de gen en combinación con selección por el herbicida Basta (o fosfinotricina) 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 plásmido, 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 plásmido 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 flanco de 1 a 1.5 kb, denominadas secuencias de objetivo, facilitan la recombinación homóloga con el genoma de plásmido y así permiten el reemplazo o modificación de regiones específicas del plástoma. Inicialmente, se usan mutaciones puntuales en el rARN 16S y genes rps 12 del cloroplasto

que confieren resistencia a espectinomomicina y/o estreptomomicina, 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 espectinomomicina (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

5 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<sup>-1</sup> (una tasa de herbicida 2x), 2) herbicida Steadfast® (DuPont™; una combinación de Nicosulfuron y Rimsulfuron) a una tasa de 1.50 onzas acre<sup>-1</sup> (un herbicida 2x), o 3) una combinación de herbicida Lightning a una tasa de 2.56 onzas acre<sup>-1</sup> y herbicida Steadfast® a una tasa de 1.50 oz acre<sup>-1</sup>. 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.

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.

### 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) Plant Transcript Assemblies identificó un montaje de transcripción que representa un gen ALS de sorgo (TA3960\_4558; SEQ ID NO: 1). Se diseñaron cebadores de amplificación para la reacción de cadena de polimerasa (PCR), F4r-CACATCACCCCTTGTTACCAGCTC (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*: Ala<sub>122</sub>, Pro<sub>197</sub>, Ala<sub>205</sub>, Trp<sub>574</sub>, y Ser<sub>653</sub>; 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 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* Val<sub>560</sub>Ile, y Trp<sub>545</sub>Leu (TGG a TIG), correspondiente a *thaliana* Trp<sub>574</sub>Leu, en genotipos resistentes al herbicida (Figura 1).

**REIVINDICACIONES**

1. Un híbrido de sorgo en el que su germoplasma 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 el que dicho germoplasma híbrido de sorgo que confiere resistencia a la inhibición por uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa comprende:

(i) una secuencia que comprende el montaje de transcripción número TA3960\_4558 de The Institute for Genomic Research, que tiene la secuencia:

GTGCCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCCTCCGAGACAGCCGCCGCAACCATGGCCACCACCGC  
 CGCCGCCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGCCACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGC  
 GCACCTCCTGGCCGCACGGCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCTCAGCGGCCGCCACCCGCC  
 ACGCTGACGGTGACGGTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTGGGGCCCCACCGATCCCCGCA  
 AGGGCGCCGACATCCTCGTCGAGGCTCTTGAGCGCTGCGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCC  
 GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGTTCCCCCGTCATCGCCAACCACCTCTT  
 CCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCCTCTGGCTTCGCGCGCTCCTCGGGCCGCGTCCGGC  
 GTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGC  
 TCGACTCCGTCCCCATGGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGCGCATGATTGGCACCAGCGCC  
 TTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTACCCGCTCCATACCAAACATAACTACCTGGTCTCGAC  
 GTCGACGACATCCCCCGCGTCTGTCAGGAGGCTTTCTTCTCGCCTCCTCCGGTCGCCCGGGACC  
 GGTGCTTGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACGCCCA  
 TGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTCCAAGCCTCCTGCGACTGAATTGCTTGAGCAGGTGC  
 TGCGTCTTGTGGTGAATCAAGGCGCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCATCTGGCG  
 AGGAGTTGCGCCGCTTTGTGGAGATGACTGGAATCCAGTCACAACACTACTTTATGGCCTTGCCA  
 ATTTCCCTGGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATT  
 ATGCAGTGGATAAGGCGGATCTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGA  
 AGATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGGCTAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCCGCTGAGATTGGCAA  
 GAACAAGCAGCCACATGTGCCATCTGTGCAGACGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAAT-  
 GCTCTTCTGGAAGGA AGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCATGGCAAGCTGAGTTGGAT-  
 CAGCAGAAGAGAGAGTTCCCCCTTGGGTATAAACTTTTATGACGAGATCCAGCCACAATATGCTA  
 TTCAGTTCTTGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGCAGCACCAGA  
 TGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAGCTGGTCTTGGG  
 GCTATGGGATTTGTTTGGCGGCTGCTGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTATCACTGTTGTT  
 GACATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTATGATCCGAATTGAGAAC  
 CTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAG  
 GTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACACATACTTGGGAAACCCAGAGAATGAAAGTGAGATATATCCA  
 GATTCGTGACAATTGCCAAAGGGTTCAACATTCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTC  
 CATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCAC  
 CAGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGTG  
 GGCAGGACTGTGATTGATCTAAATTTAGCATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACATGCATATG  
 AGCTGGTACAAGGGTGTGTTATTTATGTGATGTTCTCCTGTGTTCTATCTTTTTGTAAGCCGTC  
 GCTATCTATAGTGTGCTTGTGTTGATGACTCTGTTATGGTAATCTTAAGTAGTTTCTACCTTGTAGT  
 GGTGTAGTCTGTTGTTTCTGTGCTGGCATATCTGTCATCAGAGGTCATGTAAGTGCCTTTTGCTACAG  
 ATAAATAAGGAAATAAGCATTGCTATGCAGTGGTTCTG, 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) mutaciones en el gen de la acetolactato sintetasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999.

2. El híbrido de sorgo de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más herbicidas de acetolactato sintetasa son de un grupo que consiste en sulfonilureas, imidazolinonas, triazolpirimidinas y pirimidiniltiobenzoatos.

3. El híbrido de sorgo de la reivindicación 1, en el que las semillas del híbrido de sorgo se recubren con un herbicida de acetolactato sintetasa.

4. El híbrido de sorgo de la reivindicación 2, en el que el herbicida acetolactato sintasa es un herbicida de sulfonilurea seleccionado del grupo que consiste en nicosulfuron, rimsulfuron y metsulfuron-metilo.
5. Una semilla del híbrido de sorgo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el germoplasma de dicha semilla comprende un gen de acetolactato sintasa mutante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. Un método para cultivar el híbrido de sorgo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende:
- 10 a) proveer uno o más herbicidas de acetolactato sintasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes,
- b) aplicar dichos uno o más herbicidas de acetolactato sintasa a un campo que comprende dicho híbrido de sorgo, y
- 15 c) controlar malezas en la proximidad de dicho híbrido de sorgo de tal manera que el crecimiento de malezas se vea afectado negativamente por la aplicación de dicho uno o más herbicidas y el crecimiento de dicho híbrido de sorgo no se vea afectado negativamente.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho híbrido de sorgo se crea mediante la incorporación de un gen heterólogo que comprende las sustituciones o mutaciones de nucleótidos como se define en la reivindicación 1 para conferir resistencia a uno o más herbicidas de acetolactato sintasa en dicho híbrido de sorgo.
- 20 8. Un método para producir una línea de planta híbrida de sorgo resistente a uno o más herbicidas de acetolactato sintasa que comprende la incorporación del gen de resistencia a herbicidas de acetolactato sintasa como se define en la reivindicación 1 en una línea de planta de sorgo de élite a través de transgénesis heteróloga del gen.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho gen de resistencia a herbicidas comprende resistencia a uno o más herbicidas de acetolactato sintasa y resistencia a uno o más compuestos de uno o más grupos de herbicidas que no son inhibidores de la acetolactato sintasa.
- 30 10. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que dichos uno o más herbicidas de acetolactato sintasa son de un grupo que consiste en sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas y pirimidiniltiobenzos.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que el herbicida de acetolactato sintasa es un herbicida de sulfonilurea seleccionado del grupo que consiste en nicosulfuron, rimsulfuron y metsulfuron-metilo.
12. Un método para identificar líneas de plantas de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintasa que comprende:
- 40 a) suministrar una muestra de ácido nucleico de una planta de sorgo, en donde dicha muestra de ácido nucleico comprende:
- (i) una secuencia que comprende el montaje de transcripción número TA3960\_4558 de The Institute for Genomic Research,
- 45 que tiene la secuencia:

GTGCCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCCTCCGAGACAGCCGCCGCAACCATGGCCACCAC-  
CGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGCCACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAG-  
GCGCCGGGCGCACCTCTGGCCGCACGGCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCT-  
CAGCGGGCGCCACCCGCCACGCTGACGGTGACGGCTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGT-  
GGGGCCCCACCGATCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTCGAGGCTCTTGAGCGCTGCG-  
GCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGCGGTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCAC-  
CCGTTCCCCCGTCATCGCCAACCACCTCTTCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCT-  
TCGCCGCCTCTGGCTTCGCGCGCTCCTCGGGCCGCGTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCG-  
GCCCCGGCGCCACCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCCAT-  
GGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGCGCATGATTGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACCG  
CCATCGTCGAGGTACCCCGCTCCATCACCAAACATAACTACCTGGTCCTCGACGTCGAC-  
GACATCCCCCGCGTCGTGCAGGAGGCTTTCTTCCTCGCCTCCTCCGGTCGCCCGGACCGGT  
GCTTGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAG  
ATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTC-  
CCAAGCCTCCTGCGACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTTGGTGAATCAAG-  
GCGCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCATCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGT  
GGAGATGACTGGAATCCCAGTCACAATACTCTTATGGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGA  
CCCCTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAG  
GCGGATCTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGTATGATCGTGTGACAGGGAAGATTGAGGCT  
TTTGAAGCAGGGCTAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCCGCTGAGATTGGCAAGAACAAGC  
AGCCACATGTGTCCATCTGTGCAGACGTTAAGCTTGTCTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGA  
AGGAAGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCATGGCAAGCTGAGTTGGATCAGCAGAA  
GAGAGAGTTCCCCCTTGGGTATAAACTTTTGTATGACGAGATCCAGCCACAATATGCTATTCAG  
GTTCTTGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGCAGCACCA-  
GATGTGGGCGGCACAGTACTACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAGCT-  
GGTCTTGGGGCTATGGGATTTGTTTTGCCGGCTGCTGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGG  
TATCACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTGAGGAGCTAGCTATG  
ATCCGAATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTG  
GTGCAGTGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACACATACTTGGGAAACCCAGAG  
AATGAAAGTGAGATATATCCAGATTTTCGTGACAATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCC  
GTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACTCCAGGGCCAT  
ACCTCTTGATATAATCGTCCCAGCACCAGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTAGTGGTGGGG  
CTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGTATGGCAGGACTGTGATTGATCTAAATTTCCAGCATGC  
ACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACATGCATATGAGCTGGTACAAGGGTGTATGTGTTATTTAT-  
GTGATGTTCTCCTGTGTTCTATCTTT TGTAAAGCCGTCAGCTATCTATAGTGTGCTTGTGTTGATG-  
TACTCTGTTATGGTAATCTTAAGTAGTTTCTACCTTGTAGTGGTGTAGTCTGTTGTTTCGTGCT  
GGCATATCTGTCATCAGAGGTCATGTAAGTGCCTTTTGTACAGATAAATAAGGAAATAAG-  
CATTGCTATGCAGTGGTTCTG,

y que comprende además las sustituciones de nucleótidos de guanina  
sustituídas con adenina en la posición 1641 y guanina sustituida con timina en la posición 1684; o

- 5 (ii) mutaciones en el gen de acetolactato sintasa como se encuentra en ATCC No. PTA-7999,
  - b) proveer cebadores de amplificación para amplificar una región de una planta de sorgo que corresponde a un gen de acetolactato sintasa presente en dicha muestra de ácido nucleico,
- 10 c) aplicar dichos cebadores de amplificación a dicha muestra de ácido nucleico de tal manera que se produce la amplificación de dicha región de dicho gen de acetolactato sintasa y
  - d) identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas de acetolactato sintasa basadas en la presencia de una o más mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas de acetolactato sintasa presentes en dicha muestra de ácido nucleico amplificado.
- 15

FIGURA 1

Proyecto_Genoma	1634	1640		1650	1660	1670	1680		1690	1700	1710
22_F4r-Tx623	1631	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TCG	GAGACAGGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
32_B5-Tx623	500	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TCG	GAGACAGGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
9_B5--430	473	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TCG	GAGACAGGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
10_B5-S1-1	471	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TCG	GAGACAGGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
11_B5-S1-2	477	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TTG	GAAGACAAGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
12_B5-S1-3	472	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TTG	GAAGACAAGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
(c) 21_F4r-S1-3	474	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TTG	GAAGACAAGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	
	502	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAAACCCAGCACCTGGGGATGGTGGCAG					TTG	GAAGACAAGTTCTATATAAGGCCAATAGAG	