



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

06-30/28

54 TÍTULO

PLANTAS DE ARROZ QUE TIENEN UNA TOLERANCIA INCREMENTADA A LOS
HERBICIDAS DE IMIDAZOLINONA

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71 SOLICITANTE

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA

DOMICILIO

Buenos Aires, Argentina.

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén.

72 BOGOTÁ, D. C.,

COMPLETADO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 06030120 00000000

Folios: 281

Fecha (día): 2006-03-27 17:34:41

Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA

Procedencia: 2005 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL 29-03-06

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **INSTITUTO NACIONAL DE
TECNOLOGÍA AGROPECUARIA**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Argentina.

Dirección: Rivadavia 1439
Buenos Aires- 01033
Argentina

Domicilio: Buenos Aires,
Argentina

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38-11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Alberto LIVORE**
Dr. Scelzi 275/7,
Concepción del Uruguay,
Entre Ríos- 3260,
Argentina.

3. **Iwona BIRK**
2808 Sunnystone Way,
Raleigh, North Carolina- 27613,
Estados Unidos de América.

2. **Alberto PRINA**
Calle 18 No. 328,
Mercedes - 6600,
Provincia De Buenos Aires,
Argentina.

4. **Bijay SINGH**
301 Connemara Drive,
Cary, North Carolina -27519,
Estados Unidos de América.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/009641

Fecha: 30 de agosto de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/020673 A1

Fecha: 10 de marzo de 2005

6

Título (54)

**PLANTAS DE ARROZ QUE TIENEN UNA TOLERANCIA INCREMENTADA A LOS
HERBICIDAS DE IMIDAZOLINONA**

7

Clasificación Internacional (51) A01H 5/00

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US.
US.

(32) Fecha

29 de agosto de 2003
30 de diciembre de 2003

(31) Número de Solicitud

60/498.895
60/533.105

9

Comprobante de pago No.: 06-17.874

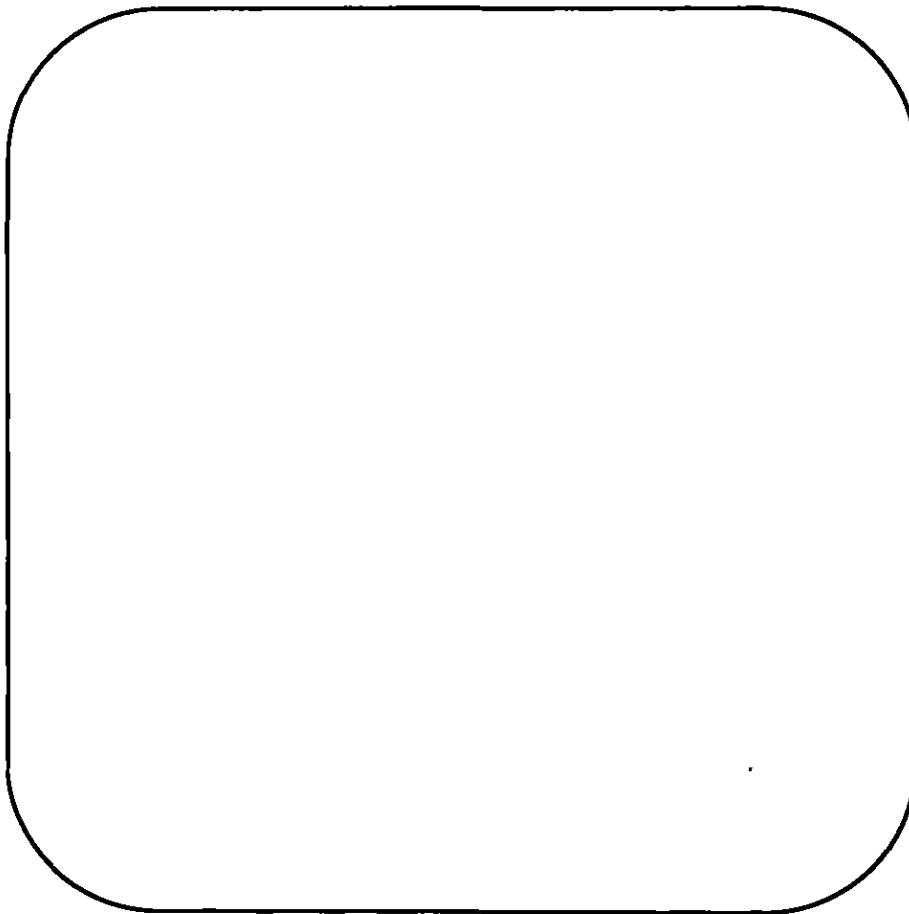
Fecha: 6 de marzo 2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/020673 A1**

Descripción:

Páginas 31 en el idioma original

Páginas 51 en español

Reivindicaciones: Número (s) 40

Figuras: Número (s) 8

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3. ☒ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
4. ☒ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
5. ☒ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
6. ☒ **Secuencia genética**
7. ☒ **Extracto de publicación.**

SE PRESENTARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

7

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 March 2005 (10.03.2005)

PCT

(18) International Publication Number
WO 2005/020673 A1

(31) International Patent Classification: A01H 5/00,
C12N 15/29, 15/60, 9/88

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/009641

(22) International Filing Date: 30 August 2004 (30.08.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60498,895 29 August 2003 (29.08.2003) US
60/533,105 30 December 2003 (30.12.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BASF
AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Lud-
wigshafen (DE).

(72) Inventors: and

(73) Inventors/Applicants (for US only): LIVORE, Alberto,
B. [AR/AR]; Dr. Soelzi 275/7, Concepcion del Uruguay,
3260 Entre Rios (AR). PRINA, Alberto, B. [AR/AR];
Calle 18 No. 328, Mercedes, 6600 Pcia. De Buenos Aires
(AR). BIRK, Ivona [US/US]; 2608 Sunnyside Way,
Raleigh, NC 27613 (US). SINGH, Bijay [US/US]; 301
Connemara Drive, Cary, NC 27519 (US).

(74) Common Representative: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limits for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/020673 A1

(54) Title: RICE PLANTS HAVING INCREASED TOLERANCE TO IMIDAZOLINONE HERBICIDES

(57) Abstract: The present invention is directed to plants having increased tolerance to an imidazolinone herbicide. More particu-
larly, the present invention includes rice plants containing at least one variant AHAS nucleic acid such as an imidazolinone tolerant
IMINTA 1, 4 or 5 lines comprising an alanine to threonine substitution as compared to the wild-type AHAS. The present invention
also includes seeds produced by these rice plants and methods of controlling weeds in the vicinity of these rice plants.

**RICE plants having increased TOLERANCE
to imidazolinone herbicides**

Field of the Invention

5

The present invention relates in general to plants having an increased tolerance to imidazolinone herbicides. More specifically, the present invention relates to rice plants obtained by mutagenesis and cross-breeding and transformation that have an increased tolerance to imidazolinone herbicides.

10

Background of the Invention

According to a farmer's survey, the major constraints to rice production are weeds (Hidaka *et al.*, Agrochemicals Japan, 2000, 77: 21-29). Direct seeding has reduced the labor problems of transplanting, however this technology has helped to increase the weed problem. Herbicide use in rice crops is a common practice in most of the rice regions that direct seed rice crops and/or in developed countries that grow rice under either transplanting or direct seeding systems. Usually a grass and a broadleaf herbicide are applied one or more times in order to control weeds in rice crops.

20

Grasses, sedges and weedy rice ("red rice") have been the major groups of species that possess high fitness to the same environments where rice is grown. These weeds have become globally distributed and are difficult to control in rice crops. Red rice belongs to the same species as cultivated rice (*Oryza sativa* L.). The genetic similarity of red rice and commercial rice has made herbicidal control of red rice difficult. Several cultural practices aid in control of weeds and are convenient for better environmental care, such as land preparation, land leveling, levees and depth of water, land rotation, certified seed, proper plant systems and dates of planting. Although these cultural practices may help to reduce the weed seed bank and the development of herbicide tolerant weeds, they impose certain restrictions and increase the cost of the crop.

30

In spite of the many recommendations for better cultural practices, farmers still rely on the use of herbicides as the main tool to control weeds. The use and abuse of some of these chemicals has resulted in the development of tolerant weeds like Propanil and Butachlor resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus galli*). In these cases, it is convenient to have other herbicides with different modes of action with the ability to control most of these weed species, so that their application can be alternated with the herbicides commonly applied.

35

Acetohydroxyacid synthase (AHAS; EC 4.1.3.18, acetolactate synthase (ALS)), encoded by the AHAS nucleic acid, is the first enzyme that catalyzes the biochemical synthesis of the branched chain amino acids valine, leucine, and isoleucine (Singh B. K., 1999, Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine In: Singh B. K. (Ed) Plant amino

40

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- acids. Marcel Dekker Inc. New York, New York. Pg 227-247). AHAS is the site of action of four structurally diverse herbicide families including the sulfonylureas (LaRossa RA and Falco SC, 1984, Trends Biotechnol. 2:158-161), the imidazolinones (Shaner *et al.*, 1984, Plant Physiol. 78:545-546), the triazolopyrimidines (Subramanian and Gerwick, 1989, Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in (Ed) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. Pg 277-288), and the pyrimidylxybenzoates (Subramanian *et al.*, 1990, Plant Physiol. 94: 239-244.). Imidazolinone and sulfonylurea herbicides are widely used in modern agriculture due to their effectiveness at very low application rates and relative non-toxicity in animals. By inhibiting AHAS activity, these families of herbicides prevent further growth and development of susceptible plants including many weed species. Several examples of commercially available imidazolinone herbicides are PURSUIT® (Imazethapyr), SCEPTER® (Imazaquin) and ARSENAL® (Imazapyr). Examples of sulfonylurea herbicides are chloresulfuron, metsulfuron methyl, sulfometuron methyl, chlorimuron ethyl, thifensulfuron methyl, tribenuron methyl, bensulfuron methyl, nicosulfuron, ethametsulfuron methyl, rimsulfuron, trifluralin, trisulfuron, primisulfuron methyl, chloresulfuron, amidosulfuron, flazasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron ethyl, and halo-sulfuron.
- Due to their high effectiveness and low toxicity, imidazolinone herbicides are favored for application by spraying over the top of a wide area of vegetation. The ability to spray an herbicide over the top of a wide range of vegetation decreases the costs associated with plantation establishment and maintenance, and decreases the need for site preparation prior to use of such chemicals. Spraying over the top of a desired tolerant species also results in the ability to achieve maximum yield potential of the desired species due to the absence of competitive species. However, the ability to use such spray-over techniques is dependent upon the presence of imidazolinone tolerant species of the desired vegetation in the spray over area.
- Among the major agricultural crops, some leguminous species such as soybean are naturally resistant to imidazolinone herbicides due to their ability to rapidly metabolize the herbicide compounds (Shaner and Robson, 1985, Weed Sci. 33:469-471). Other crops such as corn (Newhouse *et al.*, 1982, Plant Physiol. 100:882-886) and rice (Barrett *et al.*, 1989, Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, pp. 195-220) are susceptible to imidazolinone herbicides. The differential sensitivity to the imidazolinone herbicides is dependent on the chemical nature of the particular herbicide and differential metabolism of the compound from a toxic to a non-toxic form in each plant (Shaner *et al.*, 1984, Plant Physiol. 78:545-546; Brown *et al.*, 1987, Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Other plant physiological differences such as absorption and translocation also play an important role in sensitivity (Shaner and Robson, 1985, Weed Sci. 33:469-471).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- Crop cultivars resistant to imidazolinones, sulfonylureas and triazolopyrimidines have been successfully produced using seed, microspore, pollen, and callus mutagenesis in *Zea mays*, *Brassica napus*, *Glycine max*, and *Nicotiana tabacum* (Sebastian *et al.*, 1989, *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson *et al.*, 1989, *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse *et al.*, 1991, *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan *et al.*, 1991, *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand *et al.*, 1993, *J. Heredity* 84:91-96). In all cases, a single, partially dominant nuclear gene conferred resistance. Four imidazolinone resistant wheat plants were also previously isolated following seed mutagenesis of *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse *et al.*, 1992, *Plant Physiol.* 100:882-886). Inheritance studies confirmed that a single, partially dominant gene conferred resistance. Based on allelic studies, the authors concluded that the mutations in the four identified lines were located at the same locus. One of the Fidel cultivar resistance genes was designated FS-4 (Newhouse *et al.*, 1992, *Plant Physiol.* 100:882-886).
- Computer-based modeling of the three dimensional conformation of the AHAS-inhibitor complex predicts several amino acids in the proposed inhibitor binding pocket as sites where induced mutations would likely confer selective resistance to imidazolinones (Ott *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:359-368). Tobacco plants produced with some of these rationally designed mutations in the proposed binding sites of the AHAS enzyme have in fact exhibited specific resistance to a single class of herbicides (Ott *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:359-368).
- Plant resistance to imidazolinone herbicides has also been reported in a number of patents. U.S. Patent Nos. 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439, and 6,222,100 generally describe the use of an altered AHAS nucleic acid to elicit herbicide resistance in plants, and specifically disclose certain imidazolinone resistant corn lines. U.S. Patent No. 5,013,659 discloses plants exhibiting herbicide resistance possessing mutations in at least one amino acid in one or more conserved regions. The mutations described therein encode either cross-resistance for imidazolinones and sulfonylureas or sulfonylurea-specific resistance, but imidazolinone-specific resistance is not described. Additionally, U.S. Patent No. 5,731,180 and U.S. Patent No. 5,767,361 discuss an isolated gene having a single amino acid substitution in a wild-type monocot AHAS amino acid sequence that results in imidazolinone-specific resistance.
- Transgenic and herbicide resistant rice plants have also been described. A rice mutant resistant to a sulfonylurea herbicide, derived by selective pressure on callus tissue culture was described, where resistance was attributed to a mutant AHAS enzyme (Terakawa *et al.*, "Rice Mutant Resistant to the Herbicide Bensulfuron Methyl (BSM) by in vitro Selection," *Japan. J. Breed.*, 1992 vol. 42:267-275). Other herbicide resistant rice plant varieties have been described in patents and patent applications, including WO 97/41218, WO 01/65970 and U.S. Pat. Nos. 5,545,822, 5,736,629, 5,773,704, U.S. Pat. No. 5,773,703, 5,962,553, and 6,274,796. U.S. Pat. No. 5,545,822 discloses a line

of rice plants having a metabolically-based resistance to herbicides that interfere with the plant enzyme acetohydroxyacid synthase; i.e., the herbicide resistance of these rice plants was not due to a resistant AHAS enzyme. WO 97/41218 discloses one line of rice plants having a variant AHAS enzyme that is resistant to herbicides that interfere with the wild-type plant enzyme acetohydroxyacid synthase. This line of rice plants was developed by exposing rice seeds to the mutagen methanesulfonic acid ethyl ester (EMS), and screening millions of progeny for herbicide resistance.

What is needed in the art is the identification of further rice lines comprising imidazolinone resistance genes. What are also needed in the art are rice plants having increased tolerance to herbicides such as imidazolinone and containing at least one altered AHAS nucleic acid. Also needed are methods for controlling weed growth in the vicinity of such rice plants. These compositions and methods would allow for the use of spray over techniques when applying herbicides to areas containing rice plants.

Summary of the Invention

The present invention provides rice plants comprising variant AHAS nucleic acids, wherein the rice plant has increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant. In one embodiment, the rice plant comprises a variant AHAS nucleic acid. In another embodiment, the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS protein comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS protein. Also provided are plant parts and plant seeds derived from the rice plants described herein.

The variant AHAS nucleic acids of the present invention can comprise a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:3; a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:5; a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11; a polynucleotide sequence encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2; a polynucleotide sequence encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4; a polynucleotide sequence encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:6; a polynucleotide sequence encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12; a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of the aforementioned polynucleotides; and a polynucleotide complementary to any of the aforementioned polynucleotides, wherein the variant AHAS nucleic acid encodes an AHAS polypeptide conferring increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type AHAS polypeptide.

The plants of the present invention can be transgenic or non-transgenic. In one embodiment, the plants of the present invention are non-transgenic. Examples of non-transgenic rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides include a rice plant having NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB

41207, or NCIMB 41208; or a mutant, recombinant, or genetically engineered derivative of the plant with NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or any progeny of the plant with NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or a plant that is a progeny of any of these plants.

In addition to the compositions of the present invention, several methods are provided. Described herein are methods of modifying a rice plant's tolerance to an imidazolinone herbicide comprising modifying the expression of an AHAS nucleic acid in the plant. Also described are methods of producing a transgenic plant having increased tolerance to an imidazolinone herbicide comprising, transforming a plant cell with an expression vector comprising one or more variant AHAS nucleic acids encoding a variant AHAS protein comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS protein and generating the plant from the plant cell. The invention further includes a method of controlling weeds within the vicinity of a rice plant, comprising applying an imidazolinone herbicide to the weeds and to the rice plant, wherein the rice plant has increased tolerance to the imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant and wherein the plant comprises one or more AHAS nucleic acids encoding a variant AHAS protein comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS protein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1A-B show the partial cDNA sequence of the IMINTA 1 AHAS nucleic acid (SEQ ID NO:1) and the deduced amino acid sequence thereof (SEQ ID NO:2). Figures 1C-D show the partial cDNA sequence of the IMINTA 4 AHAS nucleic acid (SEQ ID NO:3) and the deduced amino acid sequence thereof (SEQ ID NO:4). Figures 1E-F show the partial cDNA sequence of the IMINTA 5 AHAS nucleic acid (SEQ ID NO:5) and the deduced amino acid sequence thereof (SEQ ID NO:6). Figures 1G-H show the partial cDNA sequence of the wild-type IRGA 417 AHAS nucleic acid (SEQ ID NO:7) and the deduced amino acid sequence thereof (SEQ ID NO:8).

Figure 2 shows the cDNA sequence alignment of the AHAS gene amplified from genomic DNA from the imidazolinone tolerant IMINTA 1 line (SEQ ID NO:1), the AHAS gene amplified from genomic DNA from the imidazolinone tolerant IMINTA 4 line (SEQ ID NO:3), the AHAS gene amplified from genomic DNA from the imidazolinone tolerant IMINTA 5 line (SEQ ID NO:5), the AHAS gene amplified from genomic DNA from the IRGA 417 wild-type rice line (SEQ ID NO:7), and a rice AHAS gene consensus sequence (SEQ ID NO:9). The nucleotide polymorphism conferring the imidazolinone tolerance to the IMINTA 1, 4, and 5 lines is indicated in bold.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 3 shows the amino acid alignment of the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene from the imidazolinone tolerant IMINTA 1 line (SEQ ID NO:2), the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene from the imidazolinone tolerant IMINTA 4 line (SEQ ID NO:4), the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene from the imidazolinone tolerant IMINTA 5 line (SEQ ID NO:6), the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene from the IRGA 417 wild-type rice line (SEQ ID NO:8), and a rice AHAS amino acid consensus sequence (SEQ ID NO:10). The polymorphism conferring the imidazolinone tolerance to the IMINTA 1, 4, and 5 lines is indicated in bold.

Figure 4A shows an example of a full length cDNA of a variant AHAS nucleic acid (SEQ ID NO:11) and Figure 4B shows an example of the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene shown in Figure 4A (SEQ ID NO:12), wherein the polypeptide confers tolerance to an imidazolinone in comparison to a wild-type AHAS polypeptide.

Figure 5 is a table showing the random block design for the field trial of the IMINTA 1 line and IRGA 417 variety.

Figure 6 is a table showing the response of IRGA 417 and IMINTA 1 lines to treatment by imidazolinone.

Figure 7 is a table showing the grain yield at 14% moisture for IRGA 417 and the IMINTA 1 lines after imidazolinone treatment.

Figure 8 is a table showing the evaluation of the yield components in IRGA 417 and IMINTA 1 lines after imidazolinone treatment.

30 Detailed Description

The present invention is directed to rice plants, rice plant parts and rice plant cells having increased tolerance to imidazolinone herbicides. The present invention also includes seeds produced by the rice plants described herein and methods for controlling weeds in the vicinity of the rice plants described herein. It is to be understood that as used in the specification and in the claims, "a" or "an" can mean one or more, depending upon the context in which it is used. Thus, for example, reference to "a cell" can mean that at least one cell can be utilized.

40 As used herein, the term "rice plant" refers to a plant that is a member of the *Oryza* genus. The rice plants of the present invention can be members of a *Oryza* genus including, but not limited to, *O. alba*, *O. australiensis*, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. elch-*

Ingeri, *O. glaberrima*, *O. glumepatula*, *O. grandiglumis*, *O. granulata*, *O. latifolia*, *O. longiglumis*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis*, *O. meyeriana*, *O. minuta*, *O. niversa*, *O. officinalis*, *O. punctata*, *O. rhizomatis*, *O. ridleyi*, *O. rufipogon*, *O. sativa*, and *O. schlechteri* and hybrids thereof. Examples of *O. sativa* subspecies included within the present invention are *Japonica*, and *indica*. A non-limiting cultivar of *Japonica* is Nipponbare, and a non-limiting example of *indica* is the 93-11 cultivar.

The term "rice plant" is intended to encompass rice plants at any stage of maturity or development, as well as any tissue or organs (plant parts) taken or derived from any such plant unless otherwise clearly indicated by context. Plant parts include, but are not limited to, stamens, roots, flowers, ovules, stamens, leaves, embryos, meristematic regions, callus tissue, anther cultures, gametophytes, sporophytes, pollen, microspores, protoplasts, and the like. The present invention also includes seeds produced by the rice plants of the present invention. In one embodiment, the seeds are true breeding for an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant seed.

The present invention describes a rice plant comprising at least one variant AHAS nucleic acid, wherein the rice plant has increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant. As used herein, the term "AHAS gene locus" refers to the position of an AHAS gene on a genome, and the terms "AHAS gene" and "AHAS nucleic acid" refer to a nucleic acid encoding the AHAS enzyme.

As used herein, the term "variant AHAS nucleic acid" refers to an AHAS nucleic acid having a sequence that is mutated from a wild-type AHAS nucleic acid and that confers increased imidazolinone tolerance to a plant in which it is expressed. As used herein, the term "variant AHAS allele" refers to a single copy of a particular AHAS nucleic acid.

Accordingly, the present invention includes a rice plant comprising a variant AHAS nucleic acid, wherein the rice plant has increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant and wherein the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS protein comprising an alanine to threonine mutation as compared to a wild-type AHAS protein. In a preferred embodiment, the alanine to threonine mutation corresponds to position 98 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12. In a preferred embodiment, the variant AHAS nucleic acid is selected from the group consisting of a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:5; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:11; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:2; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:4; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:6; and a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:12.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The present invention includes rice plants comprising one or more AHAS alleles, wherein the rice plant has increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant. The AHAS alleles can comprise a nucleotide sequence selected from the group consisting of a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:5; a polynucleotide sequence shown in SEQ ID NO:11; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:2; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:4; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:6; a polynucleotide encoding the polypeptide shown in SEQ ID NO:12; a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of the aforementioned polynucleotides; and a polynucleotide complementary to any of the aforementioned polynucleotides.

In one embodiment, the rice plant comprises two different variant AHAS nucleic acids. In another embodiment, the rice plant comprises one variant AHAS nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; or SEQ ID NO:5. Preferably, at least one of the variant AHAS nucleic acids comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; and SEQ ID NO:5.

The imidazolinone herbicide can be selected from, but is not limited to, PURSUIT® (imazethapyr), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSEPT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), a derivative of any of the aforementioned herbicides, or a mixture of two or more of the aforementioned herbicides, for example, imazapyr/imazamox (ODYSSEY®). More specifically, the imidazolinone herbicide can be selected from, but is not limited to, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolinecarboxylic acid, 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic acid, and a mixture of methyl 6-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluate and methyl 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluate. The use of 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid and 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid is preferred. The use of 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid is particularly preferred.

The rice plants described herein can be either transgenic rice plants or non-transgenic rice plants. As used herein, the term "transgenic" refers to any plant, plant cell, callus, plant tissue, or plant part, that contains all or part of at least one recombinant polynucleotide. In many cases, all or part of the recombinant polynucleotide is stably inte-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

grated into a chromosome or stable extra-chromosomal element, so that it is passed on to successive generations. For the purposes of the invention, the term "recombinant polynucleotide" refers to a polynucleotide that has been altered, rearranged or modified by genetic engineering. Examples include any cloned polynucleotide, or polynucleotides, that are linked or joined to heterologous sequences. The term "recombinant" does not refer to alterations of polynucleotides that result from naturally occurring events, such as spontaneous mutations, or from non-spontaneous mutagenesis followed by selective breeding. Plants containing mutations arising due to non-spontaneous mutagenesis and selective breeding are referred to herein as non-transgenic plants and are included in the present invention.

An example of a non-transgenic rice plant line comprising one variant AHAS nucleic acid is the plant line deposited with the NCIMB having NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, designated herein as the AHAS IMINTA 1 rice line. The partial nucleotide sequence corresponding to the IMINTA 1 AHAS gene is shown in SEQ ID NO:1.

Another example of a non-transgenic rice plant line comprising one AHAS nucleic acid is the plant line deposited with the NCIMB having NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41207, designated herein as the AHAS IMINTA 4 rice line. The partial nucleotide sequence corresponding to the IMINTA 4 AHAS gene is shown in SEQ ID NO:3.

Another example of a non-transgenic rice plant line comprising one AHAS nucleic acid is the plant line deposited with the NCIMB having NCIMB Patent Deposit Designation Number NCIMB 41208, designated herein as the AHAS IMINTA 5 rice line. The partial nucleotide sequence corresponding to the IMINTA 5 AHAS gene is shown in SEQ ID NO:5.

Separate deposits of about 2500 seeds each of the imidazolinone tolerant wheat lines were made with the NCIMB, Aberdeen, Scotland, UK on December 22, 2003. These deposits were made in accordance with the terms and provisions of the Budapest Treaty relating to the deposit of microorganisms. The deposits were made for a term of at least thirty years and at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposit is received by the NCIMB. The deposited seeds were accorded Patent Deposit Designation Numbers NCIMB 41206, NCIMB 41207, and NCIMB 41208.

The present invention includes the rice plant having a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; a mutant, recombinant, or genetically engineered derivative of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; any progeny of the plant with Patent

14

- Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; and a plant that is the progeny of any of these plants. In a preferred embodiment, the rice plant of the present invention additionally has the herbicide tolerance characteristics of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, and
- 5 NCIMB 41208.

Also included in the present invention are hybrids of the IMINTA 1, 4, and 5 rice plant lines described herein and hybrids of the IMINTA 1, 4, and 5 with another rice plant.

- 10 The terms "cultivar" and "variety" refer to a group of plants within a species defined by the sharing of a common set of characteristics or traits accepted by those skilled in the art as sufficient to distinguish one cultivar or variety from another cultivar or variety. There is no implication in either term that all plants of any given cultivar or variety will be genetically identical at either the whole gene or molecular level or that any given
- 15 plant will be homozygous at all loci. A cultivar or variety is considered "true breeding" for a particular trait if, when the true-breeding cultivar or variety is self-pollinated, all of the progeny contain the trait. The terms "breeding line" or "line" refer to a group of plants within a cultivar defined by the sharing of a common set of characteristics or traits accepted by those skilled in the art as sufficient to distinguish one breeding line or
- 20 line from another breeding line or line. There is no implication in either term that all plants of any given breeding line or line will be genetically identical at either the whole gene or molecular level or that any given plant will be homozygous at all loci. A breeding line or line is considered "true breeding" for a particular trait if, when the true-breeding line or breeding line is self-pollinated, all of the progeny contain the trait. In
- 25 the present invention, the trait arises from a mutation in an AHAS gene of the rice plant or seed.

- It is to be understood that the rice plant of the present invention can comprise a wild-type AHAS nucleic acid in addition to a variant AHAS nucleic acid. As described in Ex-
- 30 ample 2, it is contemplated that the IMINTA 1, 4, and 5 rice lines contain a mutation in only one AHAS allele. Therefore, the present invention includes a rice plant comprising at least one variant AHAS nucleic acid in addition to one or more wild-type AHAS nucleic acids.

- 35 In addition to rice plants, the present invention encompasses isolated AHAS proteins and nucleic acids that preferably confer increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to wild-type AHAS proteins and nucleic acids. Preferably, the isolated AHAS nucleic acids encode a protein having an alanine to threonine mutation. Preferably, the alanine to threonine mutation is located at an amino acid residue corresponding to position 98 of SEQ ID NO:12. In one embodiment, the isolated nucleic acids
- 40 comprise a polynucleotide selected from the group consisting of a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:3; a polynucleotide

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

AJ
15

as defined in SEQ ID NO:5; a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11; a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2; a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4; a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:6; a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12; a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of the
5 aforementioned polynucleotides; and a polynucleotide complementary to any of the aforementioned polynucleotides. In a preferred embodiment, the isolated AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11.

10

The term "AHAS protein" or "AHAS polypeptide" refers to an acetohydroxyacid synthase protein, and the terms "variant AHAS protein" or "variant AHAS polypeptide" refers to any AHAS protein that is mutated from a wild-type AHAS protein and that confers increased imidazolinone tolerance to a plant, plant cell, plant part, plant seed, or
15 plant tissue when it is expressed therein. In a preferred embodiment, the variant AHAS protein comprises a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence comprising SEQ ID NO:1. In another preferred embodiment, the variant AHAS protein comprises a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence comprising SEQ ID NO:3. In another preferred embodiment, the variant AHAS protein comprises a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence comprising SEQ ID NO:5. In still another preferred embodiment, the variant AHAS protein comprises a polypeptide comprising SEQ
20 ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6.

Also as used herein, the terms "nucleic acid" and "polynucleotide" refer to RNA or DNA
25 that is linear or branched, single or double stranded, or a hybrid thereof. The term also encompasses RNA/DNA hybrids. These terms also encompass untranslated sequence located at both the 3' and 5' ends of the coding region of the gene: at least about 1000 nucleotides of sequence upstream from the 5' end of the coding region and at least about 200 nucleotides of sequence downstream from the 3' end of the coding region of
30 the gene. Less common bases, such as inosine, 5-methylcytosine, 6-methyladenine, hypoxanthine and others can also be used for antisense, dsRNA and ribozyme pairing. For example, polynucleotides that contain C-5 propyne analogues of uridine and cytidine have been shown to bind RNA with high affinity and to be potent antisense inhibitors of gene expression. Other modifications, such as modification to the phosphodiester backbone, or the 2'-hydroxy in the ribose sugar group of the RNA can also
35 be made. The antisense polynucleotides and ribozymes can consist entirely of ribonucleotides, or can contain mixed ribonucleotides and deoxyribonucleotides. The polynucleotides of the invention may be produced by any means, including genomic preparations, cDNA preparations, *in vitro* synthesis, RT-PCR and *in vitro* or *in vivo* transcription.
40

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

16

An "isolated" nucleic acid molecule is one that is substantially separated from other nucleic acid molecules, which are present in the natural source of the nucleic acid (i.e., sequences encoding other polypeptides). Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of some of the sequences that naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in its naturally occurring replicon. For example, a cloned nucleic acid is considered isolated. In various embodiments, the isolated AHAS nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived (e.g., a *O. sativa* cell). A nucleic acid is also considered isolated if it has been altered by human intervention, or placed in a locus or location that is not its natural site, or if it is introduced into a cell by agroinfection, biolistics, or any other method of plant transformation. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be free from some of the other cellular material with which it is naturally associated, or culture medium when produced by recombinant techniques, or chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

Specifically excluded from the definition of "isolated nucleic acids" are: naturally-occurring chromosomes (such as chromosome spreads), artificial chromosome libraries, genomic libraries, and cDNA libraries that exist either as an *in vitro* nucleic acid preparation or as a transfected/transformed host cell preparation, wherein the host cells are either an *in vitro* heterogeneous preparation or plated as a heterogeneous population of single colonies. Also specifically excluded are the above libraries wherein a specified nucleic acid makes up less than 5% of the number of nucleic acid inserts in the vector molecules. Further specifically excluded are whole cell genomic DNA or whole cell RNA preparations (including whole cell preparations that are mechanically sheared or enzymatically digested). Even further specifically excluded are the whole cell preparations found as either an *in vitro* preparation or as a heterogeneous mixture separated by electrophoresis wherein the nucleic acid of the invention has not further been separated from the heterologous nucleic acids in the electrophoresis medium (e.g., further separating by excising a single band from a heterogeneous band population in an agarose gel or nylon blot).

A nucleic acid molecule of the present invention, e.g., a nucleic acid molecule containing a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11 or a portion thereof, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. For example, a *O. sativa* AHAS cDNA can be isolated from a *O. sativa* library using all or a portion of the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11. Moreover, a nucleic acid molecule encompassing all or a portion of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11 can be isolated by the polymerase chain reaction using oligonucleotide primers designed based upon this sequence. For example, mRNA can be isolated

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- from plant cells (e.g., by the guanidinium-thiocyanate extraction procedure of Chirgwin *et al.*, 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299), and cDNA can be prepared using reverse transcriptase (e.g., Moloney MLV reverse transcriptase, available from Gibco/BRL, Bethesda, MD; or AMV reverse transcriptase, available from Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Synthetic oligonucleotide primers for polymerase chain reaction
- 5 amplification can be designed based upon the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11. A nucleic acid molecule of the invention can be amplified using cDNA or, alternatively, genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid molecule so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to an AHAS nucleotide sequence can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.
- 10
- 15 The AHAS nucleic acids of the present invention can comprise sequences encoding an AHAS protein (i.e., "coding regions"), as well as 5' untranslated sequences and 3' untranslated sequences. Alternatively, the nucleic acid molecules of the present invention can comprise only the coding regions of an AHAS gene, or can contain whole genomic fragments isolated from genomic DNA. A coding region of these sequences is indicated
- 20 as an "ORF position." Moreover, the nucleic acid molecule of the invention can comprise a portion of a coding region of an AHAS gene, for example, a fragment that can be used as a probe or primer. The nucleotide sequences determined from the cloning of the AHAS genes from *O. sativa* allow for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning AHAS homologs in other cell types and organisms, as well as AHAS homologs from other rice plants and related species. The
- 25 portion of the coding region can also encode a biologically active fragment of an AHAS protein.
- As used herein, the term "biologically active portion of" an AHAS protein is intended to
- 30 include a portion, e.g., a domain/motif, of an AHAS protein that, when produced in a plant increases the plant's tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant. Methods for quantitating increased tolerance to imidazolinone herbicides are provided in the Examples below. Biologically active portions of an AHAS protein include peptides derived from SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID
- 35 NO:8, or SEQ ID NO:12 which include fewer amino acids than a full length AHAS protein and impart increased tolerance to an imidazolinone herbicide upon expression in a plant. Typically, biologically active portions (e.g., peptides which are, for example, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, or more amino acids in length) comprise a domain or motif with at least one activity of an AHAS protein. Moreover, other biologically active portions in which other regions of the polypeptide are deleted, can be
- 40 prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the activities described herein. Preferably, the biologically active portions of an AHAS protein include

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

8

one or more conserved domains selected from the group consisting of a Domain A, a Domain B, a Domain C, a Domain D and a Domain E, wherein the conserved domain contains a mutation.

- 5 The invention also provides AHAS chimeric or fusion polypeptides. As used herein, an AHAS "chimeric polypeptide" or "fusion polypeptide" comprises an AHAS polypeptide operatively linked to a non-AHAS polypeptide. A "non-AHAS polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence that is not substantially identical to an AHAS polypeptide, e.g., a polypeptide that is not an AHAS isoenzyme, which peptide
- 10 performs a different function than an AHAS polypeptide. As used herein with respect to the fusion polypeptide, the term "operatively linked" is intended to indicate that the AHAS polypeptide and the non-AHAS polypeptide are fused to each other so that both sequences fulfill the proposed function attributed to the sequence used. The non-AHAS polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the AHAS polypeptide. For
- 15 example, in one embodiment, the fusion polypeptide is a GST-AHAS fusion polypeptide in which the AHAS sequence is fused to the C-terminus of the GST sequence. Such fusion polypeptides can facilitate the purification of recombinant AHAS polypeptides. In another embodiment, the fusion polypeptide is an AHAS polypeptide containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mam-
- 20 malian host cells), expression and/or secretion of an AHAS polypeptide can be increased through use of a heterologous signal sequence.

- An isolated nucleic acid molecule encoding an AHAS polypeptide having a certain percent sequence identity to a polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6,
- 25 or SEQ ID NO:12 can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions, or deletions into a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 such that one or more amino acid substitutions, additions, or deletions are introduced into the encoded polypeptide. Mutations can be introduced
- 30 into a sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues.

- A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan),
- 40 beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

19

amino acid residue in an AHAS polypeptide is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of an AHAS coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for an AHAS activity described herein to identify mutants that retain AHAS activity. Following mutagenesis of the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11, the encoded polypeptide can be expressed recombinantly and the activity of the polypeptide can be determined by analyzing the imidazolinone tolerance of a plant expressing the polypeptide as described in the Examples below.

To determine the percent sequence identity of two amino acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in the sequence of one polypeptide for optimal alignment with the other polypeptide). The amino acid residues at corresponding amino acid positions are then compared. When a position in one sequence is occupied by the same amino acid residue as the corresponding position in the other sequence, then the molecules are identical at that position. The same type of comparison can be made between two nucleic acid sequences. The percent sequence identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (i.e., percent sequence identity = numbers of identical positions/total numbers of positions x 100). For the purposes of the invention, the percent sequence identity between two nucleic acid or polypeptide sequences is determined using the Vector NTI 8.0 (PC) software package (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). A gap opening penalty of 15 and a gap extension penalty of 6.66 are used for determining the percent identity of two nucleic acids. A gap opening penalty of 10 and a gap extension penalty of 0.1 are used for determining the percent identity of two polypeptides. All other parameters are set at the default settings.

It is to be understood that for the purposes of determining sequence identity, when comparing a DNA sequence to an RNA sequence, a thymidine nucleotide is equivalent to a uracil nucleotide. Preferably, the isolated AHAS polypeptides included in the present invention are at least about 50-60%, preferably at least about 60-70%, and more preferably at least about 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, or 90-95%, and most preferably at least about 96%, 97%, 98%, 99%, or more identical to an entire amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, or SEQ ID NO:12. In another embodiment, the isolated AHAS polypeptides included in the present invention are at least about 50-60%, preferably at least about 60-70%, and more preferably at least about 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, or 90-95%, and most preferably at least about 96%, 97%, 98%, 99%, or more identical to an entire amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, or SEQ ID NO:12.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

20

Additionally, optimized AHAS nucleic acids can be created. Preferably, an optimized AHAS nucleic acid encodes an AHAS polypeptide that modulates a plant's tolerance to imidazolinone herbicides, and more preferably increases a plant's tolerance to an imidazolinone herbicide upon its overexpression in the plant. As used herein, "optimized" refers to a nucleic acid that is genetically engineered to increase its expression in a given plant or animal. To provide plant optimized AHAS nucleic acids, the DNA sequence of the gene can be modified to 1) comprise codons preferred by highly expressed plant genes; 2) comprise an A+T content in nucleotide base composition to that substantially found in plants; 3) form a plant initiation sequence, 4) eliminate sequences that cause destabilization, inappropriate polyadenylation, degradation and termination of RNA, or that form secondary structure hairpins or RNA splice sites. Increased expression of AHAS nucleic acids in plants can be achieved by utilizing the distribution frequency of codon usage in plants in general or a particular plant. Methods for optimizing nucleic acid expression in plants can be found in EPA 0359472; EPA 0365962; PCT Application No. WO 91/16432; U.S. Patent No. 5,380,831; U.S. Patent No. 5,436,391; Perlack *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3324-3328; and Murray *et al.*, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:477-498.

As used herein, "frequency of preferred codon usage" refers to the preference exhibited by a specific host cell in usage of nucleotide codons to specify a given amino acid. To determine the frequency of usage of a particular codon in a gene, the number of occurrences of that codon in the gene is divided by the total number of occurrences of all codons specifying the same amino acid in the gene. Similarly, the frequency of preferred codon usage exhibited by a host cell can be calculated by averaging frequency of preferred codon usage in a large number of genes expressed by the host cell. It is preferable that this analysis be limited to genes that are highly expressed by the host cell. The percent deviation of the frequency of preferred codon usage for a synthetic gene from that employed by a host cell is calculated first by determining the percent deviation of the frequency of usage of a single codon from that of the host cell followed by obtaining the average deviation over all codons. As defined herein, this calculation includes unique codons (i.e., ATG and TGG). In general terms, the overall average deviation of the codon usage of an optimized gene from that of a host cell is calculated using the equation $1A = n = 1 \sum X_n - Y_n X_n \text{ times } 100 \sum$ where X_n = frequency of usage for codon n in the host cell; Y_n = frequency of usage for codon n in the synthetic gene, n represents an individual codon that specifies an amino acid and the total number of codons is $\sum$. The overall deviation of the frequency of codon usage, A , for all amino acids should preferably be less than about 25%, and more preferably less than about 10%.

Hence, an AHAS nucleic acid can be optimized such that its distribution frequency of codon usage deviates, preferably, no more than 25% from that of highly expressed plant genes and, more preferably, no more than about 10%. In addition, consideration

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

21

- is given to the percentage G+C content of the degenerate third base (monocotyledons appear to favor G+C in this position, whereas dicotyledons do not). It is also recognized that the XCG (where X is A, T, C, or G) nucleotide is the least preferred codon in dicots whereas the XTA codon is avoided in both monocots and dicots. Optimized AHAS nucleic acids of this invention also preferably have CG and TA doublet avoidance indices closely approximating those of the chosen host plant (i.e., *Oryza sativa*). More preferably these indices deviate from that of the host by no more than about 10-15%.
- 10 In addition to the nucleic acid molecules encoding the AHAS polypeptides described above, another aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that are antisense thereto. Antisense polynucleotides are thought to inhibit gene expression of a target polynucleotide by specifically binding the target polynucleotide and interfering with transcription, splicing, transport, translation and/or stability of the target polynucleotide. Methods are described in the prior art for targeting the antisense polynucleotide to the chromosomal DNA, to a primary RNA transcript or to a processed mRNA. Preferably, the target regions include splice sites, translation initiation codons, translation termination codons, and other sequences within the open reading frame.
- 20 The term "antisense," for the purposes of the invention, refers to a nucleic acid comprising a polynucleotide that is sufficiently complementary to all or a portion of a gene, primary transcript, or processed mRNA, so as to interfere with expression of the endogenous gene. "Complementary" polynucleotides are those that are capable of base pairing according to the standard Watson-Crick complementarity rules. Specifically, purines will base pair with pyrimidines to form a combination of guanine paired with cytosine (G:C) and adenine paired with either thymine (A:T) in the case of DNA, or adenine paired with uracil (A:U) in the case of RNA. It is understood that two polynucleotides may hybridize to each other even if they are not completely complementary to each other, provided that each has at least one region that is substantially complementary to the other. The term "antisense nucleic acid" includes single stranded RNA as well as double-stranded DNA expression cassettes that can be transcribed to produce an antisense RNA. "Active" antisense nucleic acids are antisense RNA molecules that are capable of selectively hybridizing with a primary transcript or mRNA encoding a polypeptide having at least 80% sequence identity with the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12.
- 40 In addition to the AHAS nucleic acids and polypeptides described above, the present invention encompasses these nucleic acids and polypeptides attached to a moiety. These moieties include, but are not limited to, detection moieties, hybridization moieties, purification moieties, delivery moieties, reaction moieties, binding moieties, and the like. A typical group of nucleic acids having moieties attached are probes and primers. Probes and primers typically comprise a substantially isolated oligonucleotide. The

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, preferably about 25, more preferably about 40, 50, or 75 consecutive nucleotides of a sense strand of the sequence set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, an anti-sense sequence of the sequence set forth SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or naturally occurring mutants thereof. Primers based on a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 can be used in PCR reactions to clone AHAS homologs. Probes based on the AHAS nucleotide sequences can be used to detect transcripts or genomic sequences encoding the same or homologous polypeptides. In preferred embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, e.g. the label group can be a radiolabel, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a genomic marker test kit for identifying cells which express an AHAS polypeptide, such as by measuring a level of an AHAS-encoding nucleic acid, in a sample of cells, e.g., detecting AHAS mRNA levels or determining whether a genomic AHAS gene has been mutated or deleted.

The invention further provides an isolated recombinant expression vector comprising an AHAS nucleic acid as described above, wherein expression of the vector in a host cell results in increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the host cell. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid," which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors." In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, which is

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. With respect to a recombinant expression vector, "operatively linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers, and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) and Gruber and Crosby, Inc. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Eds. Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, including the references therein. Regulatory sequences include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those that direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells or under certain conditions. It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of polypeptide desired, etc. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce polypeptides or peptides, including fusion polypeptides or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., AHAS polypeptides, fusion polypeptides, etc.).

In a preferred embodiment of the present invention, the AHAS polypeptides are expressed in plants and plant cells such as unicellular plant cells (such as algae) (See Falcatore *et al.*, 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251 and references therein) and plant cells from higher plants (e.g., the spermatophytes, such as crop plants). An AHAS polynucleotide may be "introduced" into a plant cell by any means, including transfection, transformation or transduction, electroporation, particle bombardment, agroinfection, biolistics and the like.

Suitable methods for transforming or transfecting host cells including plant cells can be found in Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) and other laboratory manuals such as *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium* protocols, Ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. As increased tolerance to imidazolinone herbicides is a general trait wished to be inherited into a wide variety of plants like maize, wheat, rye, oat, triticale, rice, barley, soybean, peanut, cotton, rapeseed and canola, manihot, pepper, sunflower and tagetes, solanaceous plants like potato, tobacco, eggplant, and tomato, *Vicia* species, pea, alfalfa, bushy plants (coffee, cacao, tea), *Salix* species, trees (oil palm, coconut), perennial grasses and forage crops, these crop plants are also preferred target plants for a genetic engineering as one further embodiment of the present invention. In a preferred embodiment, the plant is a rice plant. Forage crops include, but are not limited

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

limited to, Wheatgrass, Canarygrass, Bromegrass, Wildrye Grass, Bluegrass, Orchardgrass, Alfalfa, Sainfoin, Birdfoot Trefoil, Alsike Clover, Red Clover, and Sweet Clover.

5 In one embodiment of the present invention, transfection of an AHAS polynucleotide into a plant is achieved by *Agrobacterium* mediated gene transfer. One transformation method known to those of skill in the art is the dipping of a flowering plant into an *Agrobacterium* solution, wherein the *Agrobacterium* contains the AHAS nucleic acid, followed by breeding of the transformed gametes. *Agrobacterium* mediated plant transformation
10 can be performed using, for example, the GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383-396) or LBA4404 (Clontech) *Agrobacterium tumefaciens* strain. Transformation can be performed by standard transformation and regeneration techniques (Deblaere *et al.*, 1984, Nucl. Acids. Res. 13:4777-4789; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1985, - In Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., Methods In Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). For example, rapeseed can be transformed via cotyledon or hypocotyl transformation (Moloney *et al.*, 1989, Plant Cell Report 8:238-242; De Block *et al.*, 1989, Plant Physiol. 91:694-701). Use of antibiotics for *Agrobacterium* and plant selection depends on the binary vector and the *Agrobacterium* strain used for transformation. Rapeseed selection is normally performed using kanamycin as selectable plant marker. *Agrobacterium* mediated gene transfer to flax can be performed using, for example, a technique described by Mlynarova *et al.*, 1994, Plant Cell Report 13:282-285. Additionally, transformation of soybean can be performed using for example a technique described in European Patent No. 0424 047, U.S. Patent No. 5,322,783, European Patent No. 0397 687, U.S. Patent No. 5,376,543, or U.S. Patent No. 5,169,770. Transformation of maize can be achieved by particle bombardment, polyethylene glycol mediated DNA uptake or via the silicon carbide fiber technique. (See, for example, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-67826-7). A specific example of maize transformation is found in U.S. Patent No. 5,990,387, and a specific example of wheat transformation can be found in PCT Application No. WO 93/07258.

35 According to the present invention, the introduced AHAS polynucleotide may be maintained in the plant cell stably if it is incorporated into a non-chromosomal autonomous replicon or integrated into the plant chromosomes. Alternatively, the introduced AHAS polynucleotide may be present on an extra-chromosomal non-replicating vector and be transiently expressed or transiently active. In one embodiment, a homologous recombinant microorganism can be created wherein the AHAS polynucleotide is integrated
40 into a chromosome, a vector is prepared which contains at least a portion of an AHAS gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, e.g., functionally disrupt, the endogenous AHAS gene and to create an AHAS ge-

25

gene. To create a point mutation via homologous recombination, DNA-RNA hybrids can be used in a technique known as chimeraplasty (Cole-Strauss *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 and Kmiec, 1999, *Gene therapy American Scientist* 87(3):240-247). Other homologous recombination procedures in *Oryza* species are also well known in the art and are contemplated for use herein.

In the homologous recombination vector, the AHAS gene can be flanked at its 5' and 3' ends by an additional nucleic acid molecule of the AHAS gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous AHAS gene carried by the vector and an endogenous AHAS gene, in a microorganism or plant. The additional flanking AHAS nucleic acid molecule is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several hundreds of base pairs up to kilobases of flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (See, e.g., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R., 1987, *Cell* 51:503 for a description of homologous recombination vectors or Strepp *et al.*, 1998, *PNAS*, 95(8):4368-4373 for cDNA based recombination in *Physcomitrella patens*). However, since the AHAS gene normally differs from the AHAS gene at very few amino acids, a flanking sequence is not always necessary. The homologous recombination vector is introduced into a microorganism or plant cell (e.g., via polyethylene glycol mediated DNA), and cells in which the introduced AHAS gene has homologously recombined with the endogenous AHAS gene are selected using art-known techniques.

In another embodiment, recombinant microorganisms can be produced that contain selected systems that allow for regulated expression of the introduced gene. For example, inclusion of an AHAS gene on a vector placing it under control of the lac operon permits expression of the AHAS gene only in the presence of IPTG. Such regulatory systems are well known in the art.

Whether present in an extra-chromosomal non-replicating vector or a vector that is integrated into a chromosome, the AHAS polynucleotide preferably resides in a plant expression cassette. A plant expression cassette preferably contains regulatory sequences capable of driving gene expression in plant cells that are operatively linked so that each sequence can fulfill its function, for example, termination of transcription by polyadenylation signals. Preferred polyadenylation signals are those originating from *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA such as the gene 3 known as octopine synthase of the Ti-plasmid pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:835) or functional equivalents thereof, but also all other terminators functionally active in plants are suitable. As plant gene expression is very often not limited on transcriptional levels, a plant expression cassette preferably contains other operatively linked sequences like translational enhancers such as the overdrive-sequence containing the 5'-untranslated leader sequence from tobacco mosaic virus enhancing the polypeptide per RNA ratio (Gallie *et al.*, 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711). Examples of plant expression vectors

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- include those detailed in: Becker, D. *et al.*, 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; and Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Plant gene expression should be operatively linked to an appropriate promoter conferring gene expression in a timely, cell type-preferred, or tissue-preferred manner. Promoters useful in the expression cassettes of the invention include any promoter that is capable of initiating transcription in a plant cell. Such promoters include, but are not limited to those that can be obtained from plants, plant viruses and bacteria that contain genes that are expressed in plants, such as *Agrobacterium* and *Rhizobium*.

- The promoter may be constitutive, inducible, developmental stage-preferred, cell type-preferred, tissue-preferred or organ-preferred. Constitutive promoters are active under most conditions. Examples of constitutive promoters include the CaMV 19S and 35S promoters (Odell *et al.*, 1985, *Nature* 313:810-812), the α X CaMV 35S promoter (Kay *et al.*, 1987, *Science* 238:1299-1302) the Sep1 promoter, the rice actin promoter (McElroy *et al.*, 1990, *Plant Cell* 2:163-171), the *Arabidopsis* actin promoter, the ubiquitin promoter (Christensen *et al.*, 1989, *Plant Molec. Biol.* 18:675-689); pEmu (Last *et al.*, 1991, *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588), the figwort mosaic virus 35S promoter, the Smaas promoter (Velten *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:2723-2730), the GRP1-8 promoter, the cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter (U.S. Patent No. 5,683,439), promoters from the T-DNA of *Agrobacterium*, such as mannopine synthase, nopaline synthase, and octopine synthase, the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase (ssu-RUBISCO) promoter, and the like.

- Inducible promoters are active under certain environmental conditions, such as the presence or absence of a nutrient or metabolite, heat or cold, light, pathogen attack, anaerobic conditions, and the like. For example, the hsp80 promoter from *Brassica* is induced by heat shock; the PPDK promoter is induced by light; the PR-1 promoter from tobacco, *Arabidopsis*, and maize are inducible by infection with a pathogen; and the Adh1 promoter is induced by hypoxia and cold stress. Plant gene expression can also be facilitated via an inducible promoter (For review, see Gatz, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108). Chemically inducible promoters are especially suitable if time-specific gene expression is desired. Examples of such promoters are a salicylic acid inducible promoter (PCT Application No. WO 95/19443), a tetracycline inducible promoter (Gatz *et al.*, 1992, *Plant J.* 2:397-404) and an ethanol inducible promoter (PCT Application No. WO 93/21334).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- Developmental stage-preferred promoters are preferentially expressed at certain stages of development. Tissue and organ preferred promoters include those that are preferentially expressed in certain tissues or organs, such as leaves, roots, seeds, or xylem. Examples of tissue preferred and organ preferred promoters include, but are not limited to fruit-preferred, ovule-preferred, male tissue-preferred, seed-preferred, integument-preferred, tuber-preferred, stalk-preferred, pericarp-preferred, and leaf-preferred, stigma-preferred, pollen-preferred, anther-preferred, a petal-preferred, sepal-preferred, pedicel-preferred, silique-preferred, stem-preferred, root-preferred promoters and the like. Seed preferred promoters are preferentially expressed during seed development and/or germination. For example, seed preferred promoters can be embryo-preferred, endosperm preferred and seed coat-preferred. See Thompson *et al.*, 1989, *BioEssays* 10:108. Examples of seed preferred promoters include, but are not limited to cellulose synthase (*cs1A*), *Cim1*, gamma-zein, globulin-1, maize 19 kD zein (*cZ19B1*) and the like.
- Other suitable tissue-preferred or organ-preferred promoters include the napin-gene promoter from rapeseed (U.S. Patent No. 5,808,152), the USP-promoter from *Vicia faba* (Basumlein *et al.*, 1991, *Mol Gen Genet.* 225(3):459-67), the oleosin-promoter from *Arabidopsis* (PCT Application No. WO 98/45461), the phaseolin-promoter from *Phaseolus vulgaris* (U.S. Patent No. 5,504,200), the Bca4-promoter from Brassica (PCT Application No. WO 91/13880), or the legumin B4 promoter (LeB4; Basumlein *et al.*, 1992, *Plant Journal*, 2(2):283-9), as well as promoters conferring seed specific expression in monocot plants like maize, barley, wheat, rye, rice, etc. Suitable promoters to note are the *lpt2* or *lpt1*-gene promoter from barley (PCT Application No. WO 95/15389 and PCT Application No. WO 95/23230) or those described in PCT Application No. WO 99/16890 (promoters from the barley hordein-gene, rice glutelin gene, rice oryza gene, rice prolamins gene, wheat gliadin gene, wheat glutelin gene, oat glutelin gene, Sorghum kafirin-gene, and rye secalin gene).
- Other promoters useful in the expression cassettes of the invention include, but are not limited to, the major chlorophyll *a/b* binding protein promoter, histone promoters, the *Ap3* promoter, the β -conglycin promoter, the napin promoter, the soybean lectin promoter, the maize 15kD zein promoter, the 22kD zein promoter, the 27kD zein promoter, the *g*-zein promoter, the waxy, shrunken 1, shrunken 2, and bronze promoters, the *Zm13* promoter (U.S. Patent No. 5,088,189), the maize polygalacturonase promoters (PG) (U.S. Patent Nos. 5,412,085 and 5,545,546), and the 8GB8 promoter (U.S. Patent No. 5,470,359), as well as synthetic or other natural promoters.
- Additional flexibility in controlling heterologous gene expression in plants may be obtained by using DNA binding domains and response elements from heterologous sources (i.e., DNA binding domains from non-plant sources). An example of such a

heterologous DNA binding domain is the LaxA DNA binding domain (Brent and Ptashne, 1985, Cell 43:729-736).

Another aspect of the invention pertains to host cells into which a recombinant expression vector of the invention has been introduced. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but they also apply to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein. A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, an AHAS polynucleotide can be expressed in bacterial cells such as *C. glutamicum*, insect cells, fungal cells, or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells), algae, ciliates, plant cells, fungi or other microorganisms like *C. glutamicum*. Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (i.e., express) an AHAS polynucleotide. Accordingly, the invention further provides methods for producing AHAS polypeptides using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding an AHAS polypeptide has been introduced, or into which genome has been introduced a gene encoding a wild-type or AHAS polypeptide) in a suitable medium until AHAS polypeptide is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating AHAS polypeptides from the medium or the host cell. Another aspect of the invention pertains to isolated AHAS polypeptides, and biologically active portions thereof. An "isolated" or "purified" polypeptide or biologically active portion thereof is free of some of the cellular material when produced by recombinant DNA techniques, or chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of AHAS polypeptide in which the polypeptide is separated from some of the cellular components of the cells in which it is naturally or recombinantly produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of an AHAS polypeptide having less than about 30% (by dry weight) of non-AHAS material (also referred to herein as a "contaminating polypeptide"), more preferably less than about 20% of non-AHAS material, still more preferably less than about 10% of non-AHAS material, and most preferably less than about 5% non-AHAS material.

When the AHAS polypeptide, or biologically active portion thereof, is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the polypeptide preparation. The language

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

"substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of AHAS polypeptide in which the polypeptide is separated from chemical precursors or other chemicals that are involved in the synthesis of the polypeptide. In one embodiment, the language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of an AHAS polypeptide having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-AHAS chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-AHAS chemicals, still more preferably less than about 10% chemical precursors or non-AHAS chemicals, and most preferably less than about 5% chemical precursors or non-AHAS chemicals. In preferred embodiments, isolated polypeptides, or biologically active portions thereof, lack contaminating polypeptides from the same organism from which the AHAS polypeptide is derived. Typically, such polypeptides are produced by recombinant expression of, for example, a *Oryza sativa* AHAS polypeptide in plants other than *Oryza sativa* or microorganisms such as *C. glutamicum*, ciliates, algae, or fungi.

The AHAS polynucleotide and polypeptide sequences of the invention have a variety of uses. The nucleic acid and amino acid sequences of the present invention can be used to transform plants, thereby modulating the plant's tolerance to imidazolinone herbicides. Accordingly, the invention provides a method of producing a transgenic plant having increased tolerance to an imidazolinone herbicide comprising, (a) transforming a plant cell with one or more expression vectors comprising one or more variant AHAS nucleic acids, and (b) generating from the plant cell a transgenic plant with an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant. In one embodiment, the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine mutation as compared to a wild-type AHAS polypeptide.

The present invention includes methods of modifying a plant's tolerance to an imidazolinone herbicide comprising modifying the expression of one or more variant AHAS nucleic acids. The plant's tolerance to the imidazolinone herbicide can be increased or decreased as achieved by increasing or decreasing the expression of an AHAS polynucleotide, respectively. Preferably, the plant's tolerance to the imidazolinone herbicide is increased by increasing expression of an AHAS polynucleotide. In one embodiment, the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine mutation as compared to a wild-type AHAS polypeptide. Expression of an AHAS polynucleotide can be modified by any method known to those of skill in the art. The methods of increasing expression of AHAS polynucleotides can be used wherein the plant is either transgenic or not transgenic. In cases when the plant is transgenic, the plant can be transformed with a vector containing any of the above described AHAS coding nucleic acids, or the plant can be transformed with a promoter that directs expression of endogenous AHAS polynucleotides in the plant, for example. The invention provides that such a promoter can be tissue specific or devel-

- opmentally regulated. Alternatively, non-transgenic plants can have endogenous AHAS polynucleotide expression modified by inducing a native promoter. The expression of polynucleotides comprising a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 in target plants can be accomplished by, but is not limited to, one of the following examples: (a) constitutive promoter, (b) chemical-induced promoter, and (c) engineered promoter over-expression with for example zinc-finger derived transcription factors (Greisman & Pabo, 1997, *Science* 275:857).
- In a preferred embodiment, transcription of the AHAS polynucleotide is modulated using zinc-finger derived transcription factors (ZFPs) as described in Greisman and Pabo, 1997, *Science* 275:857 and manufactured by Sangamo Biosciences, Inc. These ZFPs comprise both a DNA recognition domain and a functional domain that causes activation or repression of a target nucleic acid such as an AHAS nucleic acid. Therefore, activating and repressing ZFPs can be created that specifically recognize the AHAS polynucleotide promoters described above and used to increase or decrease AHAS polynucleotide expression in a plant, thereby modulating the herbicide tolerance of the plant.
- As described in more detail above, the plants produced by the methods of the present invention can be monocots or dicots. The plants can be selected from maize, wheat, rye, oat, triticale, rice, barley, soybean, peanut, cotton, rapeseed, canola, manihot, pepper, sunflower, tagetes, solanaceous plants, potato, tobacco, eggplant, tomato, *Vicia* species, pea, alfalfa, coffee, cacao, tea, *Salix* species, oil palm, coconut, perennial grass and forage crops, for example. In a preferred embodiment, the plant is a rice plant. Forage crops include, but are not limited to, Wheatgrass, Canarygrass, Bromegrass, Wildrye Grass, Bluegrass, Orchardgrass, Alfalfa, Saloin, Birdsfoot Trefoil, Alsike Clover, Red Clover, and Sweet Clover. In each of the methods described above, the plant cell includes, but is not limited to, a protoplast, gamete producing cell, and a cell that regenerates into a whole plant. As used herein, the term "transgenic" refers to any plant, plant cell, callus, plant tissue, or plant part, that contains all or part of at least one recombinant polynucleotide. In many cases, all or part of the recombinant polynucleotide is stably integrated into a chromosome or stable extra-chromosomal element, so that it is passed on to successive generations.
- Tissue culture of various tissues of rice and regeneration of plants therefrom is well known and widely published. For example, reference may be had to Chu, Q. R., *et al.*, (1999) "Use of bridging parents with high anther culturability to improve plant regeneration and breeding value in rice", *Rice Biotechnology Quarterly* 36:25-28; Chu, Q. R., *et al.*, (1998), "A novel plant regeneration medium for rice anther culture of Southern U.S. crosses", *Rice Biotechnology Quarterly* 35:15-16; Chu, Q. R., *et al.*, (1997), "A novel basal medium for embryogenic callus induction of Southern US crosses", *Rice Biotech-*

nology Quarterly 32:19-20; and Oono, K., "Broadening the Genetic Variability By Tissue Culture Methods", Jap. J. Breed. 33 (Suppl.2), 306-307, illus. 1983, the disclosures of which are hereby incorporated herein in their entirety by reference.

- 5 As described above, the present invention teaches compositions and methods for increasing the imidazolinone tolerance of a rice plant or seed as compared to a wild-type variety of the plant or seed. In a preferred embodiment, the imidazolinone tolerance of a rice plant or seed is increased such that the plant or seed can withstand an imidazolinone herbicide application of preferably approximately 10-400 g ai ha⁻¹, more preferably 20-160 g ai ha⁻¹, and most preferably, 40-80 g ai ha⁻¹. As used herein, to "withstand" an imidazolinone herbicide application means that the plant is either not killed or not injured by such application.

- 15 Additionally provided herein is a method of controlling weeds within the vicinity of a rice plant, comprising applying an imidazolinone herbicide to the weeds and to the rice plant, wherein the rice plant has increased tolerance to the imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant, and wherein the imidazolinone tolerant rice plant comprises at least one variant AHAS nucleic acid. In one embodiment, the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine mutation as compared to a wild-type AHAS polypeptide. Preferably, the mutation is at an amino acid residue corresponding to position 98 of the sequence shown in SEQ ID NO:12. By providing for rice plants having increased tolerance to imidazolinone, a wide variety of formulations can be employed for protecting rice plants from weeds, so as to enhance plant growth and reduce competition for nutrients. An imidazolinone herbicide can be used by itself for pre-emergence, post-emergence, pre-planting, and at-planting control of weeds in areas surrounding the rice plants described herein or an imidazolinone herbicide formulation can be used that contains other additives. The imidazolinone herbicide can also be used as a seed treatment. Additives found in an imidazolinone herbicide formulation include other herbicides, detergents, adjuvants, spreading agents, sticking agents, stabilizing agents, or the like. The imidazolinone herbicide formulation can be a wet or dry preparation and can include, but is not limited to, flowable powders, emulsifiable concentrates and liquid concentrates. The imidazolinone herbicide and herbicide formulations can be applied in accordance with conventional methods, for example, by spraying, irrigation, dusting, or the like.

- 40 Throughout this application, various publications are referenced. The disclosures of all of these publications and those references cited within those publications in their entirety are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

It should also be understood that the foregoing relates to preferred embodiments of the present invention and that numerous changes may be made therein without departing from the scope of the invention. The invention is further illustrated by the following examples, which are not to be construed in any way as imposing limitations upon the scope thereof. On the contrary, it is to be clearly understood that resort may be had to various other embodiments, modifications, and equivalents thereof, which, after reading the description herein, may suggest themselves to those skilled in the art without departing from the spirit of the present invention and/or the scope of the appended claims.

EXAMPLES

Example 1

Mutagenesis and Selection of Imidazolinone Tolerant Rice Lines

Two samples of seeds (600 g each) of the rice cultivar IRGA 417 were treated with a 0.001 M sodium azide aqueous solution at pH 3 (phosphate buffer 0.067M) to produce M1 seed. This treatment was applied by soaking each seed-sample in a two-liter Erlenmeyer containing one liter of the sodium azide solution, under constant shaking, for 18 hours, at room temperature. After treatment, the seeds were rinsed in tap water and, later on, the seeds were partially dried-aerated on blotting paper sheets in order to extract the moisture from the seeds surface. Afterwards, treated seeds were directly sown at the field nursery.

The M1 seeds were planted in the field nursery with an experimental seed planter Wintersteiger at a rate of 50 plants per square meter. Check lines of a wild-type variety IRGA 417 were planted with push type planter. The lines were grown under flooding conditions until maturity (28% grain moisture) and were bulk harvested. The collected seed (M2) was dried in a convector drier for 14 hours at 45°C. The M2 seeds were kept in close storage until the next season.

The seed from M1 plants (M2 seed) was planted with an experimental seed planter for large areas (AVEC) at a rate of 50 kg/ha. An estimate of 3 ha was finally established comprising a population of 6×10^8 plants. Check lines of a wild-type variety IRGA 417 were planted with a push type planter. The entire area was subjected to a selection pressure with a mixture of two imidazolinone herbicides. Three separate applications of the imidazolinone herbicides were performed with a commercial sprayer in different directions to prevent any escape and resulting in a 3X treatment. A total volume of 222 l/ha was sprayed at 50 psi, with Teejets 8002 nozzles, in each application of imidazolinone herbicides.

The rate of the 1X treatment was a mixture of Aresnal (Imazapyr 75 g a.i./ha) and Cadre (Imazapic 24.85 g a.i./ha) in a water solution with a non-ionic surfactant (Citowet)

at the rate of 0.25% (v/v). The applications were performed at the four leaf stage of the rice plants. No rainfall was registered during the 7 days after treatments.

5 Observations were made at regular times to survey the entire area. After 90 days, the surviving individuals were labeled and transplanted to the greenhouse for asexual multiplication and seed production increasing. A total of 10 individual plants were grown, and the seed was harvested and dried in a seed incubator for 7 days at 50 °C. No plants from the check lines survived after the herbicide treatment.

10 Seed from selected M2 plants were planted in individual pots under greenhouse conditions. A 2X treatment was applied with a backpack R&D Sprayer, divided in two applications of 1X rate of Arsenal (Imazapyr 75 g a.i./ha) and Cadre (Imazapic 24.85 g a.i./ha) in a water solution with a non-ionic surfactant (Citowet) at the rate of 0.25% (v/v). Plants were grown until maturity (28% grain moisture) and hand harvested. The
15 collected seed was subjected to a dormancy breaking treatment of 7 days at 50°C and prepared for a late season planting in the north region.

20 Seed from the populations of three selected tolerant plants grown in the greenhouse was planted in the field at Las Palmas Chaco for seed increasing. The three populations identified as tolerant to imidazolinone herbicides were named IMINTA 1, IMINTA 4 and IMINTA 5. They were planted with a commercial rice planter at the rate of 50 kg/ha. A treatment of 2X imidazolinone herbicides, Arsenal (Imazapyr 75 g a.i./ha) and Cadre (Imazapic 24 g a.i./ha) in a water solution with a non-ionic surfactant (Citowet) at the rate of 0.25% (v/v) was applied at the four to five leaf stage of the rice plants. No
25 phytotoxic symptoms were observed in any of the three populations. The three populations out yielded the check plot treated with a regular grass herbicide. No segregants were observed and a highly homogenous population either in agronomic and tolerance traits was produced.

30 Example 2

Molecular Characterization of IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5

Genomic DNA was extracted from leaves of greenhouse grown seedlings from wild-type and variant IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5 rice lines and the AHAS gene was amplified by PCR. The PCR product was sequenced using standard protocols. Sequence analysis revealed a single base pair change in the coding region of the AHAS
35 gene that caused an amino acid change from Alanine at amino acid 96 in the wild-type line to Threonine 96 in the mutant lines. This mutation corresponds to an amino acid change at Alanine122 in the *Arabidopsis* AHAS sequence to Threonine 122. The AHAS nucleotide sequence for IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5 are shown in Figures 1A, C, and E, respectively as SEQ ID NOs:1, 3, and 5; and the deduced AHAS amino acid sequences of IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5 are shown in Figures 1B, D, and F
40 as SEQ ID NOs:2, 4, and 6, respectively. The nucleotide and deduced amino acid se-

34

quences of AHAS from the IRGA 417 wild-type rice strain are shown in Figures 1G and H, respectively, as SEQ ID NOs:7 and 8. Alignments of the AHAS nucleotide and amino acid sequences for IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5 are shown in Figures 2 and Figures 3, respectively. The rice AHAS gene consensus sequence is shown as
5 SEQ ID NO:9, and the deduced amino acid sequence of the rice AHAS consensus sequence is shown as SEQ ID NO:10. The polymorphism conferring the imidazolinone tolerance to the IMINTA 1, 4, and 5 lines is indicated in bold.

10 An example of a full length cDNA of an AHAS nucleic acid encoding a polypeptide conferring tolerance to imidazolinone herbicides is shown as SEQ ID NO:11, and the deduced amino acid sequence of the protein encoded by the AHAS gene is shown as SEQ ID NO: 12 in Figure 4.

Example 3

15 Tolerance to AHAS Herbicides Provided by IMINTA 1

A field trial was performed with the IMINTA 1 mutant line and IRGA 417 line, comparing performance in the presence and absence of imidazolinone treatment. The 1X imidazolinone treatment consisted of Arsenal (Imazapyr 75 g a.i./ha) and Cadre (Imazapic 24,85 g a.i./ha) in a water solution with a non-ionic surfactant (Citowet) at the rate of
20 0.25%. The varieties and treatments were set as indicated in Figure 5 as a random block design with three replications.

The results of the treatment are set out in Figure 6. There was no statistical difference among treatments in the number of plants/m², thus showing that the 3X herbicide application had no detrimental effect. Susceptible check lines sown along the plots did not
25 survive the herbicide treatment. The higher value in the after treatment IMINTA 3X plots could be due to tillering.

Grain yield and yield components were evaluated to understand the effect of the treatment on the different physiological stages, and are shown in Figures 7 and 8, respectively. No statistical differences were found among treatments, although the absolute values showed a better performance of the IMINTA 1 3X. The analysis of the yield components showed a higher number of panicles per square meter and spikelets/panicle in the IMINTA 1 3X plots that have determined a higher yield than the other
30 treatments. In addition, a strong blanking percentage was observed due to low temperatures before and during flowering. The cold days and nights reduced the seed set and were the reason for low average yields.

Although there was no statistical differences among treatments, there was a higher grain yield value of the IMINTA 1 3X. As mentioned, more panicles and spikelets/panicle were found in these plots. Observations on other tolerant lines under higher appli-
40

cation treatments showed higher tillering and number of spikelets/panicle suggesting a possible effect of the herbicides on the differentiation process of tillers and flowers.

- 5 The IMINTA 4 and IMINTA 5 varieties are also field tested in the same manner as the IMINTA 1 variety. The grain yield and yield components are found to be comparable to the IMINTA 1 variety.

- 10 Because the tolerance in IMINTA 1, IMINTA 4, and IMINTA 5 is due to a mutation in the AHAS enzyme rendering it tolerant to inhibition by imidazolinone herbicides, the *in vitro* activity of AHAS extracted from wild-type plants (not having the mutation for tolerance) is compared to the *in vitro* activity of AHAS extracted from tolerant plants in the presence of varying concentrations of an imidazolinone herbicide.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

CLAIMS

We Claim:

- 5 1. A rice plant comprising a variant AHAS nucleic acid, wherein the variant AHAS nucleic acid confers upon the plant increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant, wherein the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide.
- 10 2. The rice plant of claim 1, wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 96 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12.
- 15 3. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5;
- (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
- 20 (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:8;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
- (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
- 25 (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.
4. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:1.
- 30 5. The rice plant of claim 1, wherein the at least one variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:3.
6. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:5.
- 35 7. The rice plant of claim 1, wherein the plant is not transgenic.
8. The rice plant of claim 7, wherein the plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or is a recombinant or genetically engineered derivative of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or of any progeny of
- 40

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

37

the plant of Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or is a plant that is a progeny of any of these plants.

- 5 9. The rice plant of claim 7, wherein the plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208, or is a progeny of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
- 10 10. The rice plant of claim 7, wherein the plant has the herbicide tolerance characteristics of the plant with a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
- 15 11. The rice plant of claim 7, wherein the rice plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
- 20 12. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is selected from the group consisting of 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolinecarboxylic acid, 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic acid, and a mixture of methyl 5-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluate and methyl 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluate.
- 25 13. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid.
- 30 14. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid.
- 35 15. A plant part of the rice plant of claim 1.
16. A plant cell of the rice plant of claim 1.
- 40 17. A seed produced by the rice plant of claim 1.
18. The seed of claim 17, wherein the seed contains the variant AHAS nucleic acid and wherein the seed is true breeding for an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant seed.
19. The rice plant of claim 1, wherein the plant is transgenic.

38

20. The transgenic rice plant of claim 19, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5;
 - (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:8;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
 - (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
 - (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.
21. The rice plant of claim 19, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:1.
22. The rice plant of claim 19, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:3.
23. The rice plant of claim 19, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:5.
24. An isolated AHAS nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide selected from the group consisting of:
- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
 - (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:8;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
 - (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
 - (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above,
- wherein the isolated AHAS nucleic acid encodes an AHAS polypeptide conferring increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type AHAS polypeptide.
25. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

26. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:3.
27. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:5.
28. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2.
29. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4.
30. The isolated AHAS nucleic acid of claim 24, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:8.
31. An isolated AHAS polypeptide, wherein the polypeptide is selected from the group of polypeptide sequences as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:12, wherein the polypeptide confers increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type AHAS polypeptide.
32. The isolated AHAS polypeptide of claim 31, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2.
33. The isolated AHAS polypeptide of claim 31, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4.
34. The isolated AHAS polypeptide of claim 31, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:8.
35. A method of controlling weeds within the vicinity of a rice plant, comprising applying an imidazolinone herbicide to the weeds and the plant, wherein the plant has increased tolerance to the imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant, wherein the plant comprises a variant AHAS nucleic acid encoding a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide.
36. The method of claim 31, wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 98 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12.

XO
40

- 37: The method of claim 31, wherein the variant AHAS nucleic acid is selected from the group consisting of:
- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
 - 5 (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:8;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
 - 10 (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
 - (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.
38. A method of producing a transgenic plant having increased tolerance to an imidazolinone herbicide comprising,
- 15 (a) transforming a plant cell with one or more expression vectors comprising at least one variant AHAS nucleic acid encoding a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide; and
 - 20 (b) generating from the plant cell a transgenic plant with an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant.
39. The method of Claim 38, wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 98 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12
- 25
40. The method of Claim 38, wherein the at least one variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
- 30 (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
 - (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:8;
 - 35 (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
 - (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
 - (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.
- 40

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Deduced Partial ARA5 amino acid sequence from IMRFA 1 rice line (SEQ ID NO:2)

5
10
15
20

LSAATAATGCGGCGGQGGVFPARGKVCBAAVCSAVSPV
TTPSSAPPTATPLKFWGPAEPRIGADILVEALSGGVHGVFAVPGGTSMKI
EQALTRSPVITNELFSEHQGRFAASQYARASQKVGVCVATSGPGANKLV
SALADALLDSVPMVATGGQVPRMGCGDAFQETPIVEVERSTIKENKVL
DVEDIPREVIQEAFFLASSGRPGPVLDIPKDIQQQKAVFVMDTSMILGY
IARLKKPPATELLEQVIELVGESDIPILYVGQCHASGDELKDFVELTGI
PVTTLMELGHPFSDDPLSLDMLGHEGTYYANTAVDKADILLAPGVHFD
KVTGKIEAFASRAKIVLIDIDPAKDGKQKQPVSYICADVKLALQGLNALL
DQSTTETSSDWFANWERELDQKKEVPLGVETFGKIKFPQYAIQVLDLTK
GKATLATGVCGHQGNALQYTTTKTTPQMLSSAGLGMGFGLPAAAGASVA
KPGVTVVLDGCGGFLNHIQELALCEKHLFVAVVLEHQELGRVQNEQ
KPYKARAAETFLGEPCESEKLYPVPVFIANGFELPAVKVTKKQEVRAAK
KMLDTFGFILLDITVPEQGHVLMPIPGGELFKIMILDGQGRVY

Figure 1C

Partial ARA5 nucleotide sequence from IMINTA 4 rice line (SEQ ID NO:3)

5 CCTTGTCCGCGCCGCGAC
GGCTAAGACCGGCGCTAAGAACCACTAGGCAACCAAGCTCTTCCCGCTC
GAGGCGCGGTGCGGCGCGCGCGCTCAGGTGCTCGCGCGGTGCGCGCGCTC
ACCGCGCGCTTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTTCCCGCGGTGCGGCGC
10 GCGCGACCGCGCTAAGGCGCGCGCACTCTCGTGGAGCGCTGCGCGCGGT
GCGCGCTCAGCGCGCTTTCGCTTACCGCGCGCGCGCGCGCTTCCCGCGCTC
CAGCGCGCTGCGCGCTTCCCGCGCTCAGCGCGCGCGCGCGCTTCCCGCGCTC
CGCGCGCGCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTCAGCGCGCGCGCGCTTCCCGCGC
15 GCGTCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
TCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CGCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
20 CTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
AGCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
ATTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GCGTCCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GCTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CCGCTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
25 GTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CGGTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CGGTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CATTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CAATTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
30 GACCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
AAGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GGGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
ACCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
35 TGGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
AACCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
GAACCTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
TGATGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
AGGCTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
40 TGGAGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
TTCTGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
AAGATGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
CCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
TGATCTTCCGCGCGCTTCCCGCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTTCCCGCGCTT
45 TTGCA

Figure 1D

Deduced Partial ANAS amino acid sequence from DCMFPA 4 rice line (SEQ ID NO:4)

5
10
15
20

LSAAATXKTQRIHQHQRHVFFPARGVGMAAVECSHAVFV
TPPFAFFATTFLEPFGYAEPRGADILVEALERCGVSDVFAITGGFEMKI
HQALRSFVITHELFREHQGRFAAASGYABSGHVGVVATSGGGMILV
SALADALLDSVPWVAITGQVPRDUGTDAFQDTTFIVEVTSITCKEYIL
DVEDIFPVITQEAFFLASSGGPGFVLVDIPDILQQAQAVFVNDTSMILPGY
IARLPFFAFELLEGVILNLVQESRPFILTVGGCSBASGOLNHFVHETGI
FVITTLGMLGMPFADDELSLRMLGMSITVANYAVIKADILLAFQVRFDD
KVTGCTEAFASRAKIVEIDIDIPAKIGKHKQFVBSICAVKIALQGLHALL
DQSTKTSSEDFSAHREKLDQOQUSFPLGXKTFGRKIPQYAIQVLEKILK
GKATIAVGQGBQHMALQYTTIKUPQMLSSAGLGMEGFLPALAGSVA
NPGVTVVDIDGGSFLMIIQKIALIRIEMLFVTVNLNMQHLMVQMD
HFYKARANTYLGMPESRSEITYDFVTIANGFNIPAVRYTKSEVRAAK
KMLITPGFVILDLIVPEQHEVLEPMLPSCGAFIDMILDGGBTFY

46

Figure 1F

Deduced Partial ANAS amino acid sequence from INHWA 5 rice line (SEQ ID NO:6)

5

AAAAATLSAAATATGTGRKHQRREVTFFARGRTGAAAVRCHAVFV
TFPSFAPFATFLRFNGFAEFPKGDILVEALSHCGVEDVFAITPGTSMKI
HQALTRSPVITIMLFRRHQGMFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATILV
SALADALLDSVPNAVITQGVPRRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKETLVL
10 DVEDIPRVIGRAFFLASGRPGFVLVDIPEDIQGMNAVFWDTSEMLPGY
IARLPKPPATELLLEQVLEILVGREREPILTVGGCCSASQDELERFVELTGI
FVTTILMELGHEFFSDDELSENLGMSQTVYANYAVDEKADLLAFQVEFDD
EVTGCKEAFASRAKIVHIDIDPAKIGENKQPHVHCADVLLAQGLEALL
DQSTRTSSDFSAHHELDQQRFFLQYKTFQEKLPQYAIQVLEHLAK
15 GHAIATGVGQHQMELQYTTIKRFRNLSSMGLGAMQGLFAAGASVA
NPGVTIVDIDGDSFLMIDQSLALIRIMLPVAVMVLRSQHLGMVVQMED
RFTKAMRAHTYLGSPECESEITYDFVTIANGFPIPAVAVPKESVRAAIK
IMLDTPGVLLDLIVFQKEVLEPMPGGGAFKIMILDGQRTV

20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

y8

Figure 1E

Deduced ANAS amino acid sequence from wild type I47 rice line (SEQ ID NO:8)

5 MATFAAAAAATLSAAATAATCGHIEHQHETVFARGHVGAAAVCEAVSPV
TTPSPAPFATPLHFWGPAHFHIGADILVEALERCOVSDVFAITOGAMKI
HQALTSFVITHELFREHQGEAFASGYANASGVGVCVATSGPGMELV
SALADALLDSVFNVAITQVFRMIGNDLFQFTFIVEVTRSTHENTLVL
10 DVEDIFEVIGDAFFLASSGHPGVVLDIPEDIDQGMVFPVMDTHMLPGY
IARLHGFATFELLNQVLEIVGHEHFPILYVGCCCSASGDKLRFVHETGI
FVTFHMLGHFFSDOPLSLHMLGHESTVYANYAVDKADILLAFGVHVD
KVTGKIEAVASSRAKIVHIDIDPAKIGHEHGFVHICADVILLALQGLHALL
DQSTHCESSDFSAMHHELDQCHHFPFGYETTFGHEKIFQYATQVLDHETK
GHALIATGVGQHQHAAQYTYTERPQHLSSAGLGAMGFGLFAAGASVA
15 HPGVTVVDIDGGSFLMHIQELALIRIELFVKVNLHNGHLOHVVQHEH
HFTANRAHFTLGHFECHEKNTDFVTIANGHIEAVKVTKEHVRALK
KMLDTGPFYLLDLVPEHENVLHNPCCGAFHMLDGGCHVY

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

	I1_rice	(386)	GCCTCGGGGCTCTGCGTCGCGCACTTCCGCGCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
	wt_I47	(401)	GCCTCGGGGCTCTGCGTCGCGCACTTCCGCGCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
	Consensus	(401)	GCCTCGGGGCTCTGCGTCGCGCACTTCCGCGCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	500
5	I1_rice	(420)	TCCGCGCTCGCGGACCGGCTGCTCGGCTCCGCTCCCGATGGTCCGCAATCAC	
	I4_rice	(420)	TCCGCGCTCGCGGACCGGCTGCTCGGCTCCGCTCCCGATGGTCCGCAATCAC	
	I5_rice	(436)	TCCGCGCTCGCGGACCGGCTGCTCGGCTCCGCTCCCGATGGTCCGCAATCAC	
	wt_I47	(451)	TCCGCGCTCGCGGACCGGCTGCTCGGCTCCGCTCCCGATGGTCCGCAATCAC	
	Consensus	(451)	TCCGCGCTCGCGGACCGGCTGCTCGGCTCCGCTCCCGATGGTCCGCAATCAC	550
10	I1_rice	(470)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCAATGTCGGCAACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	I4_rice	(470)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCAATGTCGGCAACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	I5_rice	(486)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCAATGTCGGCAACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	wt_I47	(501)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCAATGTCGGCAACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	Consensus	(501)	GGGCCAGGTCCCCCGCCGCAATGTCGGCAACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	600
	I1_rice	(520)	CCATGATCGAGGTTCACCCGCTCCATTCACCAAGCACATTAACCTTGTCTT	
	I4_rice	(520)	CCATGATCGAGGTTCACCCGCTCCATTCACCAAGCACATTAACCTTGTCTT	
	I5_rice	(536)	CCATGATCGAGGTTCACCCGCTCCATTCACCAAGCACATTAACCTTGTCTT	
	wt_I47	(551)	CCATGATCGAGGTTCACCCGCTCCATTCACCAAGCACATTAACCTTGTCTT	
	Consensus	(551)	CCATGATCGAGGTTCACCCGCTCCATTCACCAAGCACATTAACCTTGTCTT	650
	I1_rice	(570)	GATGTGAGGACATCCCCCGGCTCAGTACAGGAGCGCTTCTTCTCGCGTC	
	I4_rice	(570)	GATGTGAGGACATCCCCCGGCTCAGTACAGGAGCGCTTCTTCTCGCGTC	
	I5_rice	(586)	GATGTGAGGACATCCCCCGGCTCAGTACAGGAGCGCTTCTTCTCGCGTC	
	wt_I47	(601)	GATGTGAGGACATCCCCCGGCTCAGTACAGGAGCGCTTCTTCTCGCGTC	
	Consensus	(601)	GATGTGAGGACATCCCCCGGCTCAGTACAGGAGCGCTTCTTCTCGCGTC	700
	I1_rice	(620)	CTCGGGCGGCTCTGCGCCGGTCTGCTGCTCGCATCCCCAAGGACATCCAGC	
	I4_rice	(620)	CTCGGGCGGCTCTGCGCCGGTCTGCTGCTCGCATCCCCAAGGACATCCAGC	
	I5_rice	(636)	CTCGGGCGGCTCTGCGCCGGTCTGCTGCTCGCATCCCCAAGGACATCCAGC	
	wt_I47	(651)	CTCGGGCGGCTCTGCGCCGGTCTGCTGCTCGCATCCCCAAGGACATCCAGC	
	Consensus	(651)	CTCGGGCGGCTCTGCGCCGGTCTGCTGCTCGCATCCCCAAGGACATCCAGC	750
	I1_rice	(670)	AGCAGATGAGCTGTGCGAGTCTGCGACACCTCGATGATCTACCGGGGTAC	
	I4_rice	(670)	AGCAGATGAGCTGTGCGAGTCTGCGACACCTCGATGATCTACCGGGGTAC	
	I5_rice	(686)	AGCAGATGAGCTGTGCGAGTCTGCGACACCTCGATGATCTACCGGGGTAC	
	wt_I47	(701)	AGCAGATGAGCTGTGCGAGTCTGCGACACCTCGATGATCTACCGGGGTAC	
	Consensus	(701)	AGCAGATGAGCTGTGCGAGTCTGCGACACCTCGATGATCTACCGGGGTAC	800
	I1_rice	(720)	ATTGCAAGGCTGCCCAAGCCACCGCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	I4_rice	(720)	ATTGCAAGGCTGCCCAAGCCACCGCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	I5_rice	(736)	ATTGCAAGGCTGCCCAAGCCACCGCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	wt_I47	(751)	ATTGCAAGGCTGCCCAAGCCACCGCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	Consensus	(751)	ATTGCAAGGCTGCCCAAGCCACCGCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	850
	I1_rice	(770)	GGCTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCGGTGGTGGCT	
	I4_rice	(770)	GGCTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCGGTGGTGGCT	
	I5_rice	(786)	GGCTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCGGTGGTGGCT	
	wt_I47	(801)	GGCTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCGGTGGTGGCT	
	Consensus	(801)	GGCTCTGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCCTATGTCGGTGGTGGCT	900
	I1_rice	(820)	GCTCTGCACTGGTGTGAAATTCGCGCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	I4_rice	(820)	GCTCTGCACTGGTGTGAAATTCGCGCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	I5_rice	(836)	GCTCTGCACTGGTGTGAAATTCGCGCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	wt_I47	(851)	GCTCTGCACTGGTGTGAAATTCGCGCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

11/21

	Consensus	(851)	GCTCTGCATCTGTGATGAAATGCGCCCGTTTGTGTGAGCTGACCGGCATC	901	950
	I1_rice	(870)	CCAGTTACAAACCACTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC		
	I4_rice	(870)	CCAGTTACAAACCACTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC		
5	I5_rice	(886)	CCAGTTACAAACCACTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC		
	wt_I47	(901)	CCAGTTACAAACCACTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC		
	Consensus	(901)	CCAGTTACAAACCACTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCCAGTGATGATCC	951	1000
	I1_rice	(920)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAATTTATG		
10	I4_rice	(920)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAATTTATG		
	I5_rice	(936)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAATTTATG		
	wt_I47	(951)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAATTTATG		
	Consensus	(951)	GTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTACGCAATTTATG	1001	1050
	I1_rice	(970)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
15	I4_rice	(970)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	I5_rice	(986)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	wt_I47	(1001)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	Consensus	(1001)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT	1051	1100
20	I1_rice	(1020)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	I4_rice	(1020)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	I5_rice	(1036)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	wt_I47	(1051)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT		
	Consensus	(1051)	CGGTGGATAAGGCTGACCTGTGTGCTTGCAATTTGGCGTGGCGTTTGATGAT	1101	1150
	I1_rice	(1070)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGTTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT		
	I4_rice	(1070)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGTTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT		
	I5_rice	(1086)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGTTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT		
30	wt_I47	(1101)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGTTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT		
	Consensus	(1101)	CATTGACATTGATCCAGCGGAGTTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT	1151	1200
	I1_rice	(1120)	CAATTGCGCCAGATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA		
	I4_rice	(1120)	CAATTGCGCCAGATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA		
35	I5_rice	(1136)	CAATTGCGCCAGATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA		
	wt_I47	(1151)	CAATTGCGCCAGATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA		
	Consensus	(1151)	CAATTGCGCCAGATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTA	1201	1250
	I1_rice	(1170)	GACCAGGCACAAACAAAGCAAGTTCTGATTTTAAATGCGTGGCACAAATGA		
40	I4_rice	(1170)	GACCAGGCACAAACAAAGCAAGTTCTGATTTTAAATGCGTGGCACAAATGA		
	I5_rice	(1186)	GACCAGGCACAAACAAAGCAAGTTCTGATTTTAAATGCGTGGCACAAATGA		
	wt_I47	(1201)	GACCAGGCACAAACAAAGCAAGTTCTGATTTTAAATGCGTGGCACAAATGA		
	Consensus	(1201)	GACCAGGCACAAACAAAGCAAGTTCTGATTTTAAATGCGTGGCACAAATGA	1251	1300
	I1_rice	(1220)	GTTGGACCAAGCAGAAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAGACTTTTGGTG		
45	I4_rice	(1220)	GTTGGACCAAGCAGAAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAGACTTTTGGTG		
	I5_rice	(1236)	GTTGGACCAAGCAGAAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAGACTTTTGGTG		
	wt_I47	(1251)	GTTGGACCAAGCAGAAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAGACTTTTGGTG		
	Consensus	(1251)	GTTGGACCAAGCAGAAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAGACTTTTGGTG	1301	1350
50	I1_rice	(1270)	AAGAGATCCACCCCAATATGCTATTCAAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA		
	I4_rice	(1270)	AAGAGATCCACCCCAATATGCTATTCAAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA		
	I5_rice	(1286)	AAGAGATCCACCCCAATATGCTATTCAAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA		
	wt_I47	(1301)	AAGAGATCCACCCCAATATGCTATTCAAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA		
55	Consensus	(1301)	AAGAGATCCACCCCAATATGCTATTCAAGGTGCTGGATGAGCTGACGAAA	1351	1400

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12/21

	I1_rice	(1320)	GGGAGGCCAATCATCGCTACTGGTGTGTGGACACACCAGATGTGGGCGGC
	I4_rice	(1320)	GGGAGGCCAATCATCGCTACTGGTGTGTGGACACACCAGATGTGGGCGGC
	I5_rice	(1336)	GGGAGGCCAATCATCGCTACTGGTGTGTGGACACACCAGATGTGGGCGGC
	wt_I47	(1351)	GGGAGGCCAATCATCGCTACTGGTGTGTGGACACACCAGATGTGGGCGGC
5	Consensus	(1351)	GGGAGGCCAATCATCGCTACTGGTGTGTGGACACACCAGATGTGGGCGGC 1401 1450
	I1_rice	(1370)	ACAAETTTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
	I4_rice	(1370)	ACAAETTTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
	I5_rice	(1386)	ACAAETTTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
10	wt_I47	(1401)	ACAAETTTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC
	Consensus	(1401)	ACAAETTTACACCTACAAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC 1451 1500
	I1_rice	(1420)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGACCTGGTGTCTTCGTGGCT
	I4_rice	(1420)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGACCTGGTGTCTTCGTGGCT
15	I5_rice	(1436)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGACCTGGTGTCTTCGTGGCT
	wt_I47	(1451)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGACCTGGTGTCTTCGTGGCT
	Consensus	(1451)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGACCTGGTGTCTTCGTGGCT 1501 1550
	I1_rice	(1470)	AACCCAGGTGTACACAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTGGCTTCTCTCAT
20	I4_rice	(1470)	AACCCAGGTGTACACAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTGGCTTCTCTCAT
	I5_rice	(1486)	AACCCAGGTGTACACAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTGGCTTCTCTCAT
	wt_I47	(1501)	AACCCAGGTGTACACAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTGGCTTCTCTCAT
	Consensus	(1501)	AACCCAGGTGTACACAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTGGCTTCTCTCAT 1551 1600
25	I1_rice	(1520)	GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACTCCCGGTGAAGG
	I4_rice	(1520)	GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACTCCCGGTGAAGG
	I5_rice	(1536)	GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACTCCCGGTGAAGG
	wt_I47	(1551)	GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACTCCCGGTGAAGG
	Consensus	(1551)	GAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACTCCCGGTGAAGG 1601 1650
30	I1_rice	(1570)	TGATGGTGTGTACACACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGT
	I4_rice	(1570)	TGATGGTGTGTACACACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGT
	I5_rice	(1586)	TGATGGTGTGTACACACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGT
	wt_I47	(1601)	TGATGGTGTGTACACACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGT
35	Consensus	(1601)	TGATGGTGTGTACACACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGT 1651 1700
	I1_rice	(1620)	AGGTTTTCAGGCCAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCAACCCAGATG
	I4_rice	(1620)	AGGTTTTCAGGCCAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCAACCCAGATG
40	I5_rice	(1636)	AGGTTTTCAGGCCAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCAACCCAGATG
	wt_I47	(1651)	AGGTTTTCAGGCCAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCAACCCAGATG
	Consensus	(1651)	AGGTTTTCAGGCCAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCAACCCAGATG 1701 1750
	I1_rice	(1670)	TGAGGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAGGGTTCAATA
	I4_rice	(1670)	TGAGGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAGGGTTCAATA
45	I5_rice	(1686)	TGAGGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAGGGTTCAATA
	wt_I47	(1701)	TGAGGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAGGGTTCAATA
	Consensus	(1701)	TGAGGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAGGGTTCAATA 1751 1800
	I1_rice	(1720)	TTCTGTCAGTCCGTGTACAAAGAGAGGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
50	I4_rice	(1720)	TTCTGTCAGTCCGTGTACAAAGAGAGGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
	I5_rice	(1736)	TTCTGTCAGTCCGTGTACAAAGAGAGGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
	wt_I47	(1751)	TTCTGTCAGTCCGTGTACAAAGAGAGGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG
	Consensus	(1751)	TTCTGTCAGTCCGTGTACAAAGAGAGGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG 1801 1850
55	I1_rice	(1770)	AAGATGCTCGATACCCGAGGGCCATCTTGTGGATATCATCGTCCCA
	I4_rice	(1770)	AAGATGCTCGATACCCGAGGGCCATCTTGTGGATATCATCGTCCCA

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12/21

	I5_rice	(1786)	AAGATCTCTGGATACCCCAAGGCCCACTTGTTCGATATCATCGTCCCA
	wt_I47	(1801)	AAGATCTCTGGATACCCCAAGGCCCACTTGTTCGATATCATCGTCCCA
	Consensus	(1801)	AAGATCTCTGGATACCCCAAGGCCCACTTGTTCGATATCATCGTCCCA
			1851 1900
5	I1_rice	(1820)	CCAGGAGCATGTCTGCTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGGCCATTCAAGGACA
	I4_rice	(1820)	CCAGGAGCATGTCTGCTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGGCCATTCAAGGACA
	I5_rice	(1836)	CCAGGAGCATGTCTGCTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGGCCATTCAAGGACA
	wt_I47	(1851)	CCAGGAGCATGTCTGCTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGGCCATTCAAGGACA
	Consensus	(1851)	CCAGGAGCATGTCTGCTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGGCCATTCAAGGACA
10			1901 1950
	I1_rice	(1870)	TGATCTCGATGGTGAATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	I4_rice	(1870)	TGATCTCGATGGTGAATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	I5_rice	(1886)	TGATCTCGATGGTGAATGCCAGGACTGTGTA-----
	wt_I47	(1901)	TGATCTCGATGGTGAATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
15	Consensus	(1901)	TGATCTCGATGGTGAATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
			1951 1986
	I1_rice	(1920)	TTGGCAAGCACCAAGCCCCGC-----
	I4_rice	(1920)	TTGGCA-----
	I5_rice	(1917)	-----
20	wt_I47	(1951)	TTGGCAAGCACCAAGCCCCGCATGTTGACCTGA
	Consensus	(1951)	TTGGCAAGCACCAAGCCCCGC

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

14/21

Figure 3

Alignment of amino acid sequences of DMI1A 1, DMI1A 4, and DMI1A 5 with wild-type rice AHA5 sequences

5			1	50
	I1_rice	(1)	-----LSAAATATCTGKKEHQHEVFPARGGVGAAAVRCSAVSPV	
	I4_rice	(1)	-----LSAAATATCTGKKEHQHEVFPARGGVGAAAVRCSAVSPV	
	I5_rice	(1)	-----AAAAATLSAAATATCTGKKEHQHEVFPARGGVGAAAVRCSAVSPV	
10	rice_wt_I47	(1)	MAATTAATAATLSAAATATCTGKKEHQHEVFPARGGVGAAAVRCSAVSPV	
	Consensus	(1)	AAAAATLSAAATATCTGKKEHQHEVFPARGGVGAAAVRCSAVSPV	
			51	100
	I1_rice	(40)	TFPSFAFPATFLFPGWPAKPRGADILVEALERCGVSDVFAYPGQISMKI	
	I4_rice	(40)	TFPSFAFPATFLFPGWPAKPRGADILVEALERCGVSDVFAYPGQISMKI	
15	I5_rice	(46)	TFPSFAFPATFLFPGWPAKPRGADILVEALERCGVSDVFAYPGQISMKI	
	rice_wt_I47	(51)	TFPSFAFPATFLFPGWPAKPRGADILVEALERCGVSDVFAYPGQISMKI	
	Consensus	(51)	TFPSFAFPATFLFPGWPAKPRGADILVEALERCGVSDVFAYPGQISMKI	
			101	150
	I1_rice	(90)	HQALTRSPVTNHLFRHQQGAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV	
20	I4_rice	(90)	HQALTRSPVTNHLFRHQQGAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV	
	I5_rice	(96)	HQALTRSPVTNHLFRHQQGAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV	
	rice_wt_I47	(101)	HQALTRSPVTNHLFRHQQGAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV	
	Consensus	(101)	HQALTRSPVTNHLFRHQQGAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV	
			151	200
25	I1_rice	(140)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKHNYLV	
	I4_rice	(140)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKHNYLV	
	I5_rice	(146)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKHNYLV	
	rice_wt_I47	(151)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKHNYLV	
	Consensus	(151)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTIKHNYLV	
30			201	250
	I1_rice	(190)	DVEDIFPVIGENFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQOMAVFVMDTSMILPGY	
	I4_rice	(190)	DVEDIFPVIGENFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQOMAVFVMDTSMILPGY	
	I5_rice	(196)	DVEDIFPVIGENFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQOMAVFVMDTSMILPGY	
	rice_wt_I47	(201)	DVEDIFPVIGENFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQOMAVFVMDTSMILPGY	
35	Consensus	(201)	DVEDIFPVIGENFFLASSGRPGFVLVDIPKDIQQOMAVFVMDTSMILPGY	
			251	300
	I1_rice	(240)	IARLKPFPATLLEQVILVVGSHRPFILYVGCCSASGDELRPFVFLRGI	
	I4_rice	(240)	IARLKPFPATLLEQVILVVGSHRPFILYVGCCSASGDELRPFVFLRGI	
	I5_rice	(246)	IARLKPFPATLLEQVILVVGSHRPFILYVGCCSASGDELRPFVFLRGI	
40	rice_wt_I47	(251)	IARLKPFPATLLEQVILVVGSHRPFILYVGCCSASGDELRPFVFLRGI	
	Consensus	(251)	IARLKPFPATLLEQVILVVGSHRPFILYVGCCSASGDELRPFVFLRGI	
			301	350
	I1_rice	(290)	FVTTLMGLGNFSDQFLSLMLGMSGVYANYAVDKADLLAFGVRFID	
	I4_rice	(290)	FVTTLMGLGNFSDQFLSLMLGMSGVYANYAVDKADLLAFGVRFID	
45	I5_rice	(296)	FVTTLMGLGNFSDQFLSLMLGMSGVYANYAVDKADLLAFGVRFID	
	rice_wt_I47	(301)	FVTTLMGLGNFSDQFLSLMLGMSGVYANYAVDKADLLAFGVRFID	
	Consensus	(301)	FVTTLMGLGNFSDQFLSLMLGMSGVYANYAVDKADLLAFGVRFID	
			351	400
	I1_rice	(340)	KVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGNEQPEVSIADVKILALQGLHALL	
50	I4_rice	(340)	KVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGNEQPEVSIADVKILALQGLHALL	
	I5_rice	(346)	KVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGNEQPEVSIADVKILALQGLHALL	
	rice_wt_I47	(351)	KVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGNEQPEVSIADVKILALQGLHALL	
	Consensus	(351)	KVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGNEQPEVSIADVKILALQGLHALL	
			401	450
55	I1_rice	(390)	DQSTHTSSDFSAMHSELDQQGRNFFLAGYETFGKELPPQYATQVLDELTK	
	I4_rice	(390)	DQSTHTSSDFSAMHSELDQQGRNFFLAGYETFGKELPPQYATQVLDELTK	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

	I1_rice	(396)	DQSTTKTSDDPSAMHKLDOQKREFFLOYETFGKIPQYAIQVLDKIAK	
	rice_wt_I47	(401)	DQSTTKTSDDPSAMHKLDOQKREFFLOYETFGKIPQYAIQVLDKIAK	
	Consensus	(401)	DQSTTKTSDDPSAMHKLDOQKREFFLOYETFGKIPQYAIQVLDKIAK	500
5	I1_rice	(440)	GEAIIATGVGQKQMSAAQYTTYKRPQNLSSAGLGANGFGLFAAGASVA	
	I4_rice	(440)	GEAIIATGVGQKQMSAAQYTTYKRPQNLSSAGLGANGFGLFAAGASVA	
	I5_rice	(446)	GEAIIATGVGQKQMSAAQYTTYKRPQNLSSAGLGANGFGLFAAGASVA	
	rice_wt_I47	(451)	GEAIIATGVGQKQMSAAQYTTYKRPQNLSSAGLGANGFGLFAAGASVA	
	Consensus	(451)	GEAIIATGVGQKQMSAAQYTTYKRPQNLSSAGLGANGFGLFAAGASVA	550
10	I1_rice	(490)	NFGVTVVDIDGDSFLMIQELALIRIDSLPVKVMVLNSQELGMVVQMED	
	I4_rice	(490)	NFGVTVVDIDGDSFLMIQELALIRIDSLPVKVMVLNSQELGMVVQMED	
	I5_rice	(496)	NFGVTVVDIDGDSFLMIQELALIRIDSLPVKVMVLNSQELGMVVQMED	
	rice_wt_I47	(501)	NFGVTVVDIDGDSFLMIQELALIRIDSLPVKVMVLNSQELGMVVQMED	
15	Consensus	(501)	NFGVTVVDIDGDSFLMIQELALIRIDSLPVKVMVLNSQELGMVVQMED	600
	I1_rice	(540)	RFYKANRAHTYLGMPSCSEKIYPDFVTIANGFMIIPAVKVTIKSEVRAATK	
	I4_rice	(540)	RFYKANRAHTYLGMPSCSEKIYPDFVTIANGFMIIPAVKVTIKSEVRAATK	
	I5_rice	(546)	RFYKANRAHTYLGMPSCSEKIYPDFVTIANGFMIIPAVKVTIKSEVRAATK	
20	rice_wt_I47	(551)	RFYKANRAHTYLGMPSCSEKIYPDFVTIANGFMIIPAVKVTIKSEVRAATK	
	Consensus	(551)	RFYKANRAHTYLGMPSCSEKIYPDFVTIANGFMIIPAVKVTIKSEVRAATK	644
	I1_rice	(590)	KMLDTFGPYLLDIIVFQHEVLFMIIPSGGAFKIMILDGCGRTVY	
	I4_rice	(590)	KMLDTFGPYLLDIIVFQHEVLFMIIPSGGAFKIMILDGCGRTVY	
25	I5_rice	(596)	KMLDTFGPYLLDIIVFQHEVLFMIIPSGGAFKIMILDGCGRTVY	
	rice_wt_I47	(601)	KMLDTFGPYLLDIIVFQHEVLFMIIPSGGAFKIMILDGCGRTVY	
	Consensus	(601)	KMLDTFGPYLLDIIVFQHEVLFMIIPSGGAFKIMILDGCGRTVY	

Figure 4B

Deduced full-length AHA5 amino acid sequence conferring resistance to imidazolinone herbicides (SEQ ID NO:12)

5 MMTFAAAABATLSAAATCTGGRHQRHVVFFARGSVGAAAVRCSAVSVV
TTPSTAFFPATFLRPNQFANFRGADILVEALERQGVSDVFAYPGGTSMKI
HQALTRSPVITDELFRHQQAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGHSLV
10 SALADALLDSVPMVAITQVPRMIGEDAFQSTPPIVETIRSTITHEITVL
DVEDIPVVIQHAFFLASGRPGFVLVDIPKDIQQQMAVFFMDTSMILPGY
IARLVKPPATLLKQVLEKINGEHRFTLYVGQCCSAGCHLRFVVLNGI
PPTFLMGLGNFSDDFLRLJMLGMBOTVYANYAVDKADLLAFQVHFID
EVTGKIEAFASRAKIVHDIDPAKIGHRQPEVSTICADVLLALQGLRLL
DQSTTSTSSDPSAMHMLDQQRKFFLGKTFPGHKIPQYAIQVLDELAK
15 GRATITATGVCQDQMSAAQYTTTKRPNQLSSAGLGAMSPGLPAAGASVA
NPGVTVVDIDGGSFLANTIQELALRIENLPVTVKVLNQLGNVVGED
RFXANRANTYLGHPCEAKIYDFVTIANGFPIPAVRVTKKSEVRRAIK
KGLDTPGPFVLLDILVPHQKRVLPMLPSGGAFKIMLDGCGRTVY

✓8

Figure 3

I	II	III
Iminta 1 Untreated	Irga 417	Iminta 1 Untreated
Iminta 1 3X	Iminta 1 Untreated	Iminta 1 3X
Irga 417	Iminta 1 3X	Irga 417

5

10/21

Figure 6

Treatments	Avg. N° of Plants/m ² before treatment	Avg. N° of Plants / m ² after treatment
IMMATA 1 3X	171	179
IMMATA 1 Untreated	168	164
IRGA 417	150	140

5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 7

Grain Yield 14% moisture

5

Treatments	Average GRAIN YIELD Kg/HA
IMINTA 1 3X	3323 a
IMINTA 1 TEST	2908 a
IRGA 417	2796 a
I.S.D.	763
C.V.%	11.2
F=	0.244

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Yield Components

Treatments	Panicle/m ²	1000 Grain Weight	% Blanking	Spikelets/panicle	Spikelets/m ²
IMRPA 1 3X	453 a	21.7567 a	37.26	59.23 a	26804 a
IMRPA 1 Untreated	405 ab	21.2567 b	37.05	51.60 b	21143 ab
IRGA 417	307 b	22.1067 a	27.99	62.10 a	19061 b
L.S.D.	116	0.4386	14.9	3.29	6889
C.V.%	13.2	0.9	19.2	2.52	13.6
P=	0.057	0.014	0.257	0.002	0.076

6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 0000055841	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/009641	International filing date (day/month/year) 30/08/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29/08/2003
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA
LIVORE, ALBERTO B.
PRIMA, ALBERTO R.
BIRK, IWONA
SINGH, BIJAY

<120> RICE PLANTS HAVING INCREASED TOLERANCE TO IMIDAZOLINONE
HERBICIDES

<130> PF 55841

<150> 60/498,895

<151> 2003-08-29

<150> 60/533,105

<151> 2003-12-30

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 1940

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

```
ccttggtccgc cgccgcgacg gccaaagaccg gcgtaagaa ccaccagcga caccacgtct 60
ttcccgctcg aggcgcgggtg ggggcggcgg cggtcagggtg ctccggcgggtg tccccgggtca 120
ccccgcgctc ccggcgcccg cgggccacgc cgctccggcc gtggggggccg gccgagcccc 180
gcaaggggcgc ggacatcctc gtggaggcgc tggagcgggtg cggcgtcagc gacgtgttcg 240
cctaccgggg. cggcacgtcc atggagatcc accaggcgtc gacgcgctcc cgggtcatca 300
ccaaccacct cttccgccac gaggcgggcy aggcgttcgc ggcgtccggg tacgcgcgcg 360
cgtccggccg cgtcggggtc tgcgtcgcca cctccggccc cggggcaacc aacctcgtgt 420
ccgcgctcgc cgacgcgctg ctgcactccg tcccgatggt cgccatcacg ggccagggtcc 480
ccgcgcgcat gatcgycacc gacgccttcc aggagacgcc catagtccag gtcacccgct 540
ccatcaccaa gcacaattac cttgtccttg atgtggagga catccccgc gtcatacagg 600
aagccttctt cctcgcgtcc tcgggcgcgt ctggcccggt gctggtcgac atccccaaag 660
acatccagca gcagatggct gtgccagtct gggacacctc gatgaatcta ccgggggtaca 720
ttgcacgcct gcccaagcca ccgcgcacag aattgcttga gcaggctctg cgtctgggtg 780
ggcagtcacg gcgcccatt ctctatgtcg gtgggtggctg ctctgcattc ggtgatgaat 840
tgccgcgggt tgttgagctg accggcatcc cagttacaac cactctgatg ggcctcggca 900
atttccccag tgatgatccg ttgtccctgc gcattgcttg gatgcatggc acggtgtacg 960
caaattatgc ggtggataag gctgacctgt tgcttgctatt tggcgtgcg gttgatgatc 1020
gtgtgacagg gaaaattgag gcttttgcaa gcagggccaa gattgtgcac attgacattg 1080
atccagcgga gattggaaag aacaagcaac cacatgtgtc aatttgcgca gatgttaagc 1140
ttgctttaca gggcttgaat gctctgctag accagagcac aacaaagaca agttctgatt 1200
ttagtgcggt gcacaatgag ttggaccagc agaagaggga gtttcctctg gggtaacaaga 1260
cttttggtga agagatccca ccgcaatatg ctattcaggt gctggatgag ctgacgaaag 1320
gggaggcaat catcgctact ggtgttggac agcaccagat gtgggcggca caatattaca 1380
cctacaagcg gccacggcag tggctgtctt cggctggtct gggcgcaatg ggatttgggc 1440
tgctgtctgc agctggtgct tctgtggcta acccagggtg cacagtgtt gatattgatg 1500
gggatggtag cttcctcatg aacattcagg agttggcatt gatccgcatt gagaacctcc 1560
cgggtgaagg gatgggtgtg aacaaccaac atttgggtat ggttgtgcaa tgggaggata 1620
ggttttacaa ggcaaatagg gcgcatacat acttgggcaa ccagaaatgt gagagtgaga 1680
```

64

tatatccaga ttttgtgact attgctaaag ggttcaatat tcttgcagtc cgtgtaacaa 1740
agaagagtga agtccgtgcc gccatcaaga agatgctoga taccacaggg ccatacttgt 1800
tggatatcat cgtccacac caggagcatg tgctgcctat gatcccaagt gggggcgcac 1860
tcaaggacat gatcctggat ggtgatggca ggactgtgta ttaatctata atctgtatgt 1920
tggcaaagca ccagcccgcc 1940

<210> 2
<211> 633
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 2
Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg
1 5 10 15
His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Val Arg
20 25 30
Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala
35 40 45
Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp
50 55 60
Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala
65 70 75 80
Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser
85 90 95
Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe
100 105 110
Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val
115 120 125
Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp
130 135 140
Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro
145 150 155 160
Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu
165 170 175
Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu
180 185 190
Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly
195 200 205
Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln
210 215 220
Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile
225 230 235 240

65

Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu
245 250 255

Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly
260 265 270

Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
275 280 285

Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp
290 295 300

Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
305 310 315 320

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
325 330 335

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
340 345 350

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
355 360 365

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
625 630

<210> 3
<211> 1925
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 3
ccttggtccgc cgccgcgacg gccaaagaccg gccgtaagaa ccaccagcga caccacgtct 60
ttcccgtctcg aggcgcgggtg ggggcggcgg cggtcagggtg ctccggcggtg tccccgggtca 120
ccccgcgctc ccgggcgccc ccggccacgc cgctccggcc gtgggggccc gccgagcccc 180
gcaaggggcgc ggacatcctc gtggaggcgc tggagcgggtg cggcgctcagc gacgtgttctg 240
cctacccggg cggcacgtcc atggagatcc accaggcgct gacgcgctcc ccggtcatca 300
ccaaccacct cttccgccac gagcaggcgg aggcgttcgc ggcgtccggg tacgcgcgcg 360
cgtccggccg cgtcgggggtc tgcgtcgcca cctccggccc cggggcaacc aacctcgtgt 420
ccgcgctcgc cgacgcgctg ctgcactccg tcccgatggt cgcacacacg ggccagggtcc 480
cccgcgcgat gatcggcacc gacgccttcc aggagacgcc catagtcgag gtcacccgct 540
ccatcaccaa gcacaattac cttgtccttg atgtggagga catccccgc gtcatacagg 600
aagccttctt cctcgcgtcc tggggccgct ctggcccggt gctggctcag atccccaaagg 660
acatccagca gcagatggct gtgccagctt gggacacctc gatgaatcta ccgggggtaca 720
ttgcacgcct gccaaagcca ccgcgcacag aattgcttga gcaggctctg cgtctggttg 780
gcgagtcacg gcgcccgaat ctctatgtcg gtggtggctg ctctgcatct ggtgatgaat 840
tgcgcgggtt tgttgagctg accggcatcc cagttacaac cactctgatg ggccctcggca 900
atttccccag tgatgatccg ttgtccctgc gcatgcttgg gatgcatggc acgggtgtacg 960
caaattatgc ggtggataag gctgacctgt tgcctgcatt tggcgctcgg tttgatgatc 1020
gtgtgacagg gaaaattgag gcttttgcaa gcaggggccaa gattgtgcac attgacattg 1080
atccagcggg gattggaaag aacaagcaac cacatgtgtc aatttgcgca gatgttaagc 1140
ttgctttaca gggcttgaat gctctgctag accagagcac aacaaagaca agttctgatt 1200
ttagtgctg gcacaatgag ttggaccagc agaagaggga gtttccctcg gggtagaaga 1260
cttttggtga agagatccca ccgcaatatg ctattcagggt gctggatgag ctgacgaaag 1320
gggaggcaat catcgctact ggtgttggac agcaccagat gtgggcggca caatattaca 1380
cctacaagcg gccacggcag tggctgtctt cggctgggtc gggcgcaatg ggatttgggc 1440
tgctgtctgc agctgggtgt tctgtggcta acccagggtg cacagttgtt gatattgatg 1500
gggatggtag cttcctcatg aacattcagg agttggcatt gatccgcatt gagaacctcc 1560
cgggtgaagg gatgggtgtg aacaaccaac atttgggtat ggttgtgcaa tgggaggata 1620
ggtttttaca ggcaaatagg gcgcatacat acttgggcaa ccagaaatgt gagagtgaga 1680
tatatccaga ttttgtgact attgctaaag ggttcaatat tcctgcagtc cgtgtaacaa 1740
agaagagtga agtccgtgcc gccatcaaga agatgctcga taccacaggg ccatacttgt 1800
tggatatcat cgtcccacac caggagcatg tgctgcctat gatcccaagt gggggcgcat 1860

tcaaggacat gatcctggat ggtgatggca ggactgtgta ttaatctata atctgtatgt 1920
 tggca 1925

<210> 4
 <211> 633
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 4
 Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg
 1 5 10 15
 His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg
 20 25 30
 Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala
 35 40 45
 Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp
 50 55 60
 Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala
 65 70 75 80
 Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser
 85 90 95
 Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe
 100 105 110
 Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val
 115 120 125
 Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp
 130 135 140
 Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro
 145 150 155 160
 Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu
 165 170 175
 Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu
 180 185 190
 Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly
 195 200 205
 Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln
 210 215 220
 Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu
 245 250 255

Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 260 265 270
 Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 275 280 285
 Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp
 290 295 300
 Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 305 310 315 320
 Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 325 330 335
 Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 340 345 350
 Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 355 360 365
 Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly
 370 375 380
 Leu Asn Ala Leu Leu Asp Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe
 385 390 395 400
 Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu
 405 410 415
 Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
 420 425 430
 Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro
 450 455 460
 Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
 465 470 475 480
 Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val
 485 490 495
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala
 500 505 510
 Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn
 515 520 525
 Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
 530 535 540
 Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile
 545 550 555 560

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

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

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

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

Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
625 630

<210> 5
<211> 1916
<212> DNA
<213> *Oryza sativa*

<400> 5

gcggccgcgg	ccgccacctt	gtccgcgcgc	gcgacggcca	agaccggccg	taagaaccac	60
cagcgacacc	acgtctttcc	cgctcgaggc	cgggtggggg	cgccggcggt	caggtgctcg	120
gcggtgtccc	cggtcacccc	gccgtccccg	gcgcgcgcgg	ccacgccgct	ccggccgtgg	180
gggcccggcg	agccccgcac	gggcgcggac	atcctcgtgg	aggcgtgga	gcggtgcggc	240
gtcagcgacg	tggtcgccca	cccgggcggc	acgtccatgg	agatccacca	ggcgtgacg	300
cgctccccgg	tcacacccaa	ccacctcttc	cgccacgagc	agggcgaggc	gttcgcggcg	360
tccgggtacg	cgcgcgcgtc	cggccgcgtc	ggggtctgcg	tcgccacctc	cgcccccggg	420
gcaaccaacc	tcgtgtccgc	gctcgccgac	gcgtgctcg	actccgtccc	gatggtcgcc	480
atcacggggc	agggtccccg	ccgcatgac	ggcaccgacg	ccttccagga	gacggccata	540
gtcgaggtca	cccgtctccat	caccaagcac	aattaccttg	tccttgatgt	ggaggacatc	600
ccccgcgtca	tacaggaagc	cttctctctc	cgctcctcgg	gccgtcctgg	cccgggtgctg	660
gtcgacatcc	ccaaggacat	ccagcagcag	atggctgtgc	cagtctggga	cacctcgatg	720
aatctaccgg	ggtacattgc	acgcctgccc	aagccacccg	cgacagaatt	gcttgagcag	780
gtcttgcgtc	tggttgggca	gtcacggcgc	cogattctct	atgtcggtgg	tggtgctctc	840
gcactctggtg	atgaattgcg	ccggtttggt	gagctgaccg	gcaccccagt	tacaaccact	900
ctgatggggc	tcggcaattt	ccccagtgat	gatccgttgt	ccctgcgcgt	gcttgggtg	960
catgggcacg	tgtacgcaaa	ttatgcgggtg	gataaggctg	acctgttgct	tgcatttggc	1020
gtgcggtttg	atgatcgtgt	gacagggaaa	attgaggctt	ttgcaagcag	ggccaagatt	1080
gtgcacattg	acattgatcc	agcggagatt	ggaaagaaca	agcaaccaca	tgtgtcaatt	1140
tgccgagatg	ttaagcttgc	tttacagggc	ttgaatgctc	tgctagacca	gagcacacca	1200
aagacaagtt	ctgatttttag	tgcggtggcac	aatgagttgg	accagcagaa	gagggagttt	1260
cctctggggg	acaagacttt	tggtgaagag	atcccaccgc	aatatgctat	tcagggtgctg	1320
gatgagctga	cgaaagggga	ggcaatcctc	gctactgggtg	ttggacagca	ccagatgtgg	1380
gcggcaccaat	attacacctc	caagcggcca	cggcagtggtg	tgtcttcggc	tggtctgggc	1440
gcaatgggat	ttgggctgcc	tgctgcagct	ggtgcttctg	tggtcaacct	aggtgtcaca	1500
gttgttgata	ttgatgggga	tggtagcttc	ctcatgaaca	ttcaggagtt	ggcattgatc	1560
cgcattgaga	acctcccggg	gaagggtgatg	gtgttgaaca	accaacattt	gggtatgggt	1620
gtgcaatggg	aggataggtt	ttacaaggca	aatagggcgc	atacatactt	gggcaaccca	1680
gaatgtgaga	gtgagatata	tccagatttt	gtgactattg	ctaaagggtt	caatattcct	1740
gcagtcctgtg	taacaaagaa	gagtgaagtc	cgtgccgcca	tcaagaagat	gctcgatacc	1800
ccagggcccat	acttgttgga	tatcatcgtc	ccacaccagg	agcatgtgct	gcctatgatc	1860
ccaagtgggg	gcgcattcaa	ggacatgatc	ctggatgggtg	atggcaggac	tgtgta	1916

20

<210> 6
<211> 638
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 6
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly
1 5 10 15
Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val
20 25 30
Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro
35 40 45
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu
50 55 60
Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly
65 70 75 80
Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His
85 90 95
Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe Arg His
100 105 110
Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly
115 120 125
Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
130 135 140
Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
145 150 155 160
Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
165 170 175
Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
180 185 190
Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe
195 200 205
Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro
210 215 220
Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met
225 230 235 240
Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu
245 250 255
Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile
260 265 270

71

Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg
 275 280 285

Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu
 290 295 300

Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met
 305 310 315 320

His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu
 325 330 335

Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

72

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

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

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

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

<210> 7
<211> 1986
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 7

atggctacga	ccgccgcggc	cgcggccgcc	accttgctccg	ccgccgcgac	ggccaagacc	60
ggccgtaaga	accaccagcg	acaccacgtc	tttcccgtctc	gagggccgggt	gggggcggcg	120
gcgggtcagg	gtcggggcgt	gtccccgggc	accccgccgt	ccccggcgcc	gccggccacg	180
ccgctccggc	cgtggggggc	ggccgagccc	cgcaaggggc	cggacatcct	cgtggaggcg	240
ctggagcggg	gcggcgctcag	cgacgtgttc	gcctaccogg	gcggcgcgctc	catggagatc	300
caccaggcgc	tgacgcgctc	cccggctcatc	accaaccacc	tcttccgcca	cgagcagggc	360
gagggcgttcg	cggcgctccgg	gtacgcgcgc	gcgtccggcc	gcgtccgggt	ctgcgtcgcc	420
acctccggcc	ccggggcaac	caacctcgtg	tccgcgctcg	ccgacgcgct	gctcgactcc	480
gtcccgatgg	tcgccatcac	gggccagggtc	ccccgccgca	tgatcggcac	cgacgccttc	540
caggagacgc	ccatagtcga	ggtcacccgc	tccatcacca	agcaccaatta	ccttgctcctt	600
gatgtggagg	acatcccccg	cgtcatacag	gaagccttct	tcctcgcgtc	ctcgggccgt	660
cctggccccg	tgctggctga	catccccaa	gacatccagc	agcagatggc	tgtgccagtc	720
tgggacacct	cgatgaatct	accgggggtac	attgcacgcc	tgcccaagcc	acccgcgaca	780
gaattgcttg	agcagggtctt	gcgtctgggt	ggcgagtcac	ggcgcccgat	tctctatgtc	840
ggtggtggct	gctctgcctc	tggtgatgaa	ttgcgcgggt	ttgttgagct	gaccggcatc	900
ccagttacaa	ccactctgat	gggcctcggc	aatttcccca	gtgatgatcc	gttgctccctg	960
cgcattgctt	ggatgcattg	cacgggtgtac	gcaaatattg	cgggtggataa	ggctgacctg	1020
ttgcttgcat	ttggcgtgcg	gtttgatgat	cgtgtgacag	ggaaaattga	ggctttttgca	1080
agcaggggcca	agattgtgca	cattgacatt	gatccagcgg	agattggaaa	gaacaagcaa	1140
ccacatgtgt	caatttgccg	agatgttaag	cttgctttac	agggcttgaa	tgctctgcta	1200
gaccagagca	caacaaagac	aagttctgat	tttagtgctg	ggcacaatga	gttggaccag	1260
cagaagagg	agtttctctc	gggggtacaag	acttttggtg	aagagatccc	accgcaatat	1320
gctattcagg	tgctggatga	gctgacgaaa	ggggaggcaa	tcacgcgtac	tggtggttga	1380
cagcaccaga	tgtggggcgg	acaatattac	acctacaagc	ggccacggca	gtggctgtct	1440
tcggctggct	tggggcgcaat	gggatttggg	ctgcctgctg	cagctgggtg	ttctgtggct	1500
aaccagggtg	tcacagttgt	tgatattgat	ggggatggta	gcttcctcat	gaacattcag	1560
gagttggcat	tgatccgcat	tgagaacctc	ccgggtgaagg	tgatgggtgt	gaacaaccaa	1620
catttgggta	tggttgtgca	atgggaggat	aggttttaca	aggcaaatag	ggcgcataca	1680
tacttgggca	accagaatg	tgagagtga	atatatccag	attttgtgac	tattgctaaa	1740
gggttcaata	ttcctgcagt	ccgtgtaaca	aagaagagtg	aagtccgtgc	cgccatcaag	1800
aagatgctcg	ataccccagg	gccatacttg	ttggatatca	tcgtcccaca	ccaggagcat	1860
gtgctgccta	tgatcccaag	tgggggcgca	ttcaaggaca	tgatccctgga	tggtgatggc	1920
aggactgtgt	attaatctat	aatctgtatg	ttggcaaagc	accagcccg	cctatgtttg	1980
acctga						1986

<210> 8
<211> 644

73

<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 8
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Ala Ala
1 5 10 15
Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro
20 25 30
Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
35 40 45
Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
50 55 60
Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
65 70 75 80
Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala
85 90 95
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
100 105 110
His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
115 120 125
Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro
130 135 140
Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
145 150 155 160
Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
165 170 175
Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
180 185 190
Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195 200 205
Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val
210 215 220
Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val
225 230 235 240
Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
245 250 255
Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu
260 265 270
Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
275 280 285

74
74

Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr
290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
340 345 350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
355 360 365

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

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
385 390 395 400

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

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

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

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
450 455 460

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

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

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
500 505 510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
515 520 525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
530 535 540

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
565 570 575

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

75

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro
595 600 605

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

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

<210> 9
<211> 1956
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oryza
consensus sequence

<400> 9
ggggcccggg ccgccacctt gtcgcccggc ggcagggcca agaccggcgg taagaaccac 60
cagcgacacc acgtctttcc cgctcgaggc cgggtggggg cggcggcggg cagggtgctcg 120
gcggtgtccc cggtcacccc gccgtccccg gcgcgcgcgg ccacgcgcgt ccggccgtgg 180
gggcccggcg agccccgcaa gggcgcgggc atcctcgtgg aggcgctgga gcggtgcggc 240
gtcagcgacg tgttcgccta cccggggcgg acgtccatgg agatccacca ggcgctgacg 300
cgctccccgg tcatcaccaa ccacctcttc cgccacgagc agggcgaggc gttcgcggcg 360
tcggggtacg cgcgcgcgct cggcgcgcgt ggggtctgcg tcgccacctc cggccccggg 420
gcaaccaacc tcgtgtccgc gctcgcgcgac gcgctgctcg actccgtccc gatggtcgcc 480
atcacggggc aggtcccccg ccgcatgatc ggcaccgacg ccttccagga gacgcccata 540
gtcgaggtca cccgctccat caccaagcac aattacctg tccttgatgt ggaggacatc 600
ccccgcgtca tacaggaagc cttcttcctc gcgtcctcgg gccgtcctgg cccggtgctg 660
gtcgacatcc ccaaggacat ccagcagcag atggctgtgc cagtctggga cacctcgatg 720
aatctaccgg ggtacattgc acgcctgccc aagccacccg cgacagaatt gcttgagcag 780
gtcttgcgtc tggttggcga gtcacggcgc ccgattctct atgtcgggtg tggctgctct 840
gcattctggt atgaattgog cgggtttggt gagctgaccg gcatcccagt tacaaccact 900
catggcacgg tgtacgcaaa ttatgcggtg gataaggctg acctgttgct tgcatttggc 1020
gtgcggtttg atgatcgtgt gacagggaaa attgaggctt ttgcaagcag ggccaagatt 1080
gtgcacattg acattgatcc agcggagatt ggaaagaaca agcaaccaca tgtgtcaatt 1140
tgccagatg ttaagcttgc ttacagggc ttgaatgtc tgcagacca gacacaaca 1200
aagacaagtt ctgattttag tgcgtggcac aatgagttgg accagcagaa gagggagttt 1260
cctctggggg acaagacttt tgggtgaagag atcccaccgc aatatgctat tcagggtgctg 1320
gatgagctga cgaaagggga ggcaatcatc gctactggtg ttggacagca ccagatgtgg 1380
gcggcacaat attacaccta caagcggcca cggcagtggt tgtcttcggc tggctctggg 1440
gcaatgggat ttgggctgcc tgcgtcagct ggtgcttctg tggctaacce aggtgtcaca 1500
gttggttgata ttgatgggga tggtagcttc ctcatgaaca ttcaggagtt ggcattgate 1560
cgcattgaga acctcccggg gaaggtgatg gtgttgaaaca accaaccattt gggtatgggt 1620
gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggca aatagggcgc atacatactt gggcaaccac 1680
gaatgtgaga gtgagatata tccagatttt gtgactattg ctaaagggtt caatattcct 1740
gcagtcctgt taacaaagaa gagtgaagtc cgtgccgcca tcaagaagat gctcgatacc 1800
ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccacaccagg agcatgtgct gcctatgatc 1860
ccaagtgggg gcgcattcaa ggacatgac ctggatgggt atggcaggac tgtgtattaa 1920
tctataatct gtatgttggc aaagcaccag cccggc 1956

7.6

<210> 10
<211> 639
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oryza
consensus sequence

<400> 10
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly
1 5 10 15
Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val
20 25 30
Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Pro
35 40 45
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu
50 55 60
Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly
65 70 75 80
Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His
85 90 95
Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe Arg His
100 105 110
Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly
115 120 125
Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
130 135 140
Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
145 150 155 160
Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
165 170 175
Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
180 185 190
Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu Ala Phe
195 200 205
Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro
210 215 220
Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr Ser Met
225 230 235 240

Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu
 245 250 255

Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Ile
 260 265 270

Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg
 275 280 285

Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu
 290 295 300

Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met
 305 310 315 320

His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu
 325 330 335

Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

78

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 1936
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 11
atggctacga ccgccgcggc cgcggccgcc accttgctcg ccgccgcgac ggccaagacc 60
ggcggtaaga accaccagcg acaccacgtc tttcccgcctc gagggcgggt gggggcggcg 120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgcggt ccccgcgcc gccggccacg 180
ccgctccggc cgtggggggc ggccgagccc cgcaaggggc cggacatcct cgtggaggcg 240
ctggagcggg gcggcgctcag cgacgtgttc gcctaccggg gcggcacgtc catggagatc 300
caccaggcgc tgacgcgctc cccgggtcatc accaaccacc tottcgcca cgagcagggc 360
gaggcgttcg cggcgctccgg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420
acctccggcc ccggggcaac caacctcggt tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccagggtc ccccgccgca tgatcggcac cgacgccttc 540
caggagacgc ccatagtcca ggtcaccgc tccatcacca agcacaatta ccttgctcctt 600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgtc ctcgggccgt 660
cctggccccg tgctggtcga catccccag gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc 720
tgggacacct cgatgaatct accgggggtac attgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca 780
gaattgcttg agcaggctctt gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
ggtggtgggt gctctgcac tggtgatgaa ttgcgcgggt ttgttgagct gaccggcatc 900
ccagttacaa ccactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg 960
cgcatgcttg ggatgcatgg caccgtgtac gcaaattatg cggaggataa ggctgacctg 1020
ttgcttgcat ttggcggtcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
agcaggggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
gaccagagca caacaaagac aagttctgat tttagtgcgt ggcacaatga gttggaccag 1260
cagaagaggg agtttccctc ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga 1380
cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctgggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtc ttctgtggct 1500
aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttccctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggatgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagttag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740

19
79

gggttcaata ttctgcagt cctgtgaaca aagaagagtg aagtcctgtgc cgccatcaag 1800
aagatgctcg ataccccagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tggatgatggc 1920
aggactgtgt acctga 1936

<210> 12
<211> 644
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 12
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Ala Ala
1 5 10 15
Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro
20 25 30
Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
35 40 45
Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
50 55 60
Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
65 70 75 80
Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr
85 90 95
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
100 105 110
His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
115 120 125
Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro
130 135 140
Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
145 150 155 160
Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
165 170 175
Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
180 185 190
Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195 200 205
Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val
210 215 220
Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val
225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
 245 250 255
 Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu
 260 265 270
 Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
 275 280 285
 Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr
 290 295 300
 Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
 325 330 335
 Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
 340 345 350
 Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
 355 360 365
 Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser
 370 375 380
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 385 390 395 400
 Asp Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
 405 410 415
 Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
 420 425 430
 Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
 435 440 445
 Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
 450 455 460
 Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser
 465 470 475 480
 Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
 485 490 495
 Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
 500 505 510
 Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
 515 520 525
 Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
 530 535 540

81

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
565 570 575

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

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro
595 600 605

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

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

PLANTAS DE ARROZ QUE TIENEN UNA TOLERANCIA INCREMENTADA A LOS HERBICIDAS DE IMIDAZOLINONA

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona en general con plantas que tienen una tolerancia incrementada a herbicidas de imidazolinona, Mas específicamente, la presente invención se relaciona con plantas de arroz obtenidas por mutagénesis e hibridización y transformación y que tienen una tolerancia incrementada a los herbicidas de imidazolinona

Antecedentes de la Invención

De acuerdo a una investigación con finqueros, las mayores restricciones para la producción de arroz son las malezas (Hidaka et al. Agrochemical Japan, 2000, 77: 21 – 29). El sembrado directo ha reducido los trabajos de transplantado, sin embargo esta tecnología ha ayudado a incrementar el problema de malezas. El uso de herbicidas en los cultivos es una práctica común en la mayor parte de las regiones arroceras que siembran directamente el arroz y/o en países en desarrollo que cultivan el arroz o por transplantado o por sembrado directo. Usualmente los herbicidas para rastrojos y malezas de hoja ancha son aplicados una o mas veces para controlar las malezas en los cultivos de arroz.

Hierbas, juncias y arroz maleza ("arroz rojo") han sido las principales especies con alta adaptación a los mismos ambientes donde el arroz es cultivado. Estas malezas se encuentran distribuidas en todo el mundo y son difíciles de controlar en los cultivos de arroz. El arroz rojo pertenece a las mismas especies del arroz cultivado

(*Oryza sativa* L). La similitud genética del arroz comercial y el arroz rojo ha hecho difícil el control con herbicidas del arroz rojo. Muchas prácticas de cultivo ayudan en el control de malezas y son convenientes para un mejor cuidado del medio ambiente, tales como la preparación de la tierra, la nivelación de la tierra, diques y profundidad del agua, la rotación de la tierra, las semillas certificadas, sistemas de plantas apropiados y las fechas de plantado. Aunque estas prácticas de cultivo pueden ayudar a reducir la acumulación de semillas de malezas y el desarrollo de malezas tolerantes a los herbicidas, ellas imponen ciertas restricciones e incrementan el costo de las cosechas.

A pesar de las muchas recomendaciones para una mejores prácticas de cultivo, los finqueros todavía confían en el uso de herbicidas como la mejor herramienta para el control de malezas. El uso y abuso de algunos de estos químicos ha resultado en el desarrollo de malezas tolerantes como la grama de agua (barnyardgrass) (*Echinochloa crus galli*) resistente al Propanil y Butachlor. En estos casos, es conveniente tener otros herbicidas con diferentes modos de actuar y con la habilidad para controlar la mayoría de estas especies de malezas, así que su aplicación puede ser alternada con los herbicidas comúnmente usados.

La sintasa de acetohidroxiácido (AHAS; EC 4.1.3.18, sintasa de acetolactato (ALS)), codificada por el ácido nucleico de AHAS, es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de la cadena ramificada de amino ácidos valina, leucina e isoleucina (Singh B. K., 1999, Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina en: Singh B.K. (Ed) Plant Amino Acids. Marcel Dekker Inc. New York, New York, Pg 227 – 247). AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicidas estructuralmente diversas que incluye las sulfonilureas (LaRossa RA and Falcò SC, 1984, Trends Biotechnol. 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner et al., 1984, Plant Physiol. 76: 545-546), las triazolopirimidinas en (ED) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural

84

biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C pg 277 – 288) y las pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al., 1990, Plant Physiol. 94: 239 – 244). Los herbicidas de Imidazolinona y sulfonilurea son ampliamente empleados en la agricultura moderna debido a su efectividad con aplicaciones muy bajas y relativa no toxicidad a los animales. Al Inhibir la actividad de AHAS, estas familias de herbicidas previenen el crecimiento y desarrollo de plantas susceptibles incluyendo muchas especies de malezas. Algunos ejemplos de herbicidas de imidazolinona disponibles comercialmente son PURSUIT (imazetapir) SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son el clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifesulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflurosulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil y halosulfuron.

Debido a su alta efectividad y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona son favorecidos para su aplicación por rociado sobre áreas amplias de vegetación. La posibilidad de rociar el herbicida sobre un área amplia de vegetación disminuye el costo asociado con el establecimiento de la plantación y su mantenimiento, y disminuye la necesidad de preparación del sitio, anterior al uso de esos químicos. El rociado sobre las especies tolerante objetivo también conduce a poder alcanzar un máximo potencial de rendimiento de las especies objetivo debido a la ausencia de especies competitivas. Sin embargo, la posibilidad de usar esas técnicas de rociado depende de la presencia de especies tolerantes a la imidazolinona en la vegetación deseada en las áreas de rociado.

Entre los cultivos agrícolas principales, algunas especies tales como la soya son naturalmente resistentes a los herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad

85

para metabolizar rápidamente los compuestos del herbicidas (Shaner y Robson, 1985, Weed Sci. 33: 469-471) . Otros cultivos tales como el maíz (Newhouse et al., 1992, Plant Physiol. 100:882 – 886) y arroz (Barret et al., 1989, Crop Safeners for Herbicides, Academic press New York, pp. 195 – 220) son susceptibles a los herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona es dependiente de la naturaleza química del herbicida particular y el metabolismo diferencial del compuesto de una forma tóxica a no tóxica en cada planta (Shaner et al., 1984, Plan Physiol. 76: 545-546, Brown et al., 1987, Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Otras diferencias fisiológicas de las plantas tales como absorción y translocación también juegan un papel importante en la sensibilidad (Shaner and Robson, 1985, Weed Sci. 33:469 – 471).

Variedades de cultivos resistentes a las imidazolinonas, sulfonilureas y trizolopirimidinas han sido exitosamente producidos usando semilla, microsporo, polen y mutagénesis de callos en *Zea mays*, *Brassia napus*, *Glycine max*, y *Nicotiana tabacum* (sebastian et al., 1989, Crop Sci. 29: 1403 – 1408); Swanson et al., 1989, Theor. Apli. Gnet. 78: 525-530; Newhouse et al., 1991, Theor. Appl. Gnet. 83:65-70; Sathasivan et al., 1991, Plan Physiol. 97:1044-1050; Mourand et al., 1993, J Heredity 84:91– 96). En todos los casos, un gen nuclear parcialmente dominante, singular, confirió la resistencia. Cuatro plantas de trigo resistentes a la imidazolinona fueron también previamente aisladas siguiendo mutagénesis de semillas de *Triticum aestivum* L. Cv Fidel (Newhouse et al., 1993, Plan Physiol. 100:882 –886). Estudios de herencia confirmaron que un gen nuclear parcialmente dominante, singular, confirió la resistencia. Basado en estudios alélicos, los autores concluyeron que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas fueron localizadas en el mismo lugar. Uno de los genes resistentes de la variedad Fidel fue designado FS-4 (Newhouse et al., 1992, Plan Physiol. 100: 882-886).

8.6

Modelación basada en computador de las conformaciones tridimensionales del complejo inhibidor de AHAS predice numerosos amino ácidos en el bolsillo fijador inhibidor propuesto como sitios donde las mutaciones inducidas conferirían la resistencia selectiva a las Imidazolinonas (Ott et al., 1996, J. Mol. Biol. 263: 359 – 368). Plantas de tabaco producidas con algunas de estas mutaciones racionalmente diseñadas en los sitios de fijación propuestos de la enzima de AHAS han efectivamente exhibido una resistencia específica a una clase singular de herbicidas (Ott et al., 1996, J. Mol. Biol. 263: 359 – 368).

La resistencia de las plantas a los herbicidas de imidazolinona ha sido también reportada en numerosas patentes. Patentes US No 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 y 6,222,100 describen en general el uso de un ácido nucleico de AHAS alterado para obtener resistencia a los herbicidas en plantas, y especialmente descubren ciertas líneas de maíz resistentes a la imidazolinona. La Patente US No 5,013,659 descubre plantas que exhiben resistencia a los herbicidas que poseen mutaciones en al menos un amino ácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas allí incorporan o resistencia cruzada para imidazolinona y sulfonilureas o resistencia específica para sulfonilurea, pero resistencia específica para imidazolinona no es descrita. Adicionalmente, la Patente US No 5,731,180 y la Patente US No 5,767,631 analizan un gen aislado que tiene una sustitución singular de amino ácido en una secuencia de amino ácido de AHAS de monocot de tipo salvaje que resulta en una resistencia específica a la imidazolinona.

Plantas de arroz transgénico y resistente a los herbicidas han sido también descritas. Un arroz mutante resistente al herbicida sulfonilurea, derivado por presión selectiva en tejido calloso cultivado fue descrito, donde la resistencia fue atribuida a una enzima de AHAS mutada (Terakawa et al., "Rice mutant Resistant to the herbicide

Bensulfuron Methyl (BSM) by in vitro selection" Japan . J. Breed., 1992 vol. 42. 267 – 275). Otras variedades de plantas de arroz resistentes a los herbicidas han sido descritas en las patentes y aplicaciones de patentes, incluyendo WO 97/41218, WO 01/85970 y las Patentes US Nos. 5,545,822, 5,736,629, 5,773,704 , Patente US No 5,773,703, 5,952, 553, y 6,274,796. La patente US No 5,55.822 descubre una línea de plantas de arroz que tienen una resistencia a los herbicidas metabólicamente basada que interfiere con la enzima de la planta sintasa acetohidroxiacida; es decir, la resistencia al herbicida de estas plantas de arroz no es debida a una enzima de AHAS resistente. La WO 97/41218 descubre una línea de plantas de arroz que tienen una variante de enzima de AHAS que es resistente a los herbicidas que interfiere con la enzima de la planta de tipo-salvaje sintasa acetohidroxiacida. Esta línea de plantas de arroz fue desarrollada exponiendo las semillas de arroz al mutágeno de ester etil de ácido metálsulfónico (EMS) y separando millones de progenies resistentes al herbicida.

Lo que es requerido en el arte es la identificación de más líneas de arroz que incorporen genes resistentes a la imidazolinona. También son requeridas en el arte plantas de arroz que tengan una mayor tolerancia a los herbicidas tales como imidazolinona y que contengan al menos un ácido nucleico de AHAS alterado. Son también requeridos métodos para controlar el crecimiento de las malezas alrededor de las plantas de arroz. Estos compuestos y métodos permitirán el uso de técnicas de sobre rociado para la aplicación de herbicidas a áreas de arroz.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona plantas de arroz que tienen variantes de ácidos nucleicos de AHAS, las cuales tienen una mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona en comparación con una variedad tipo-salvaje de la planta. En una

28

incorporación, la planta de arroz incluye una variante de ácido nucleico de AHAS. En otra incorporación, la variante de ácido nucleico de AHAS codifica un variante de proteína de AHAS que incluye una sustitución de alanina a treonina en comparación a una proteína de AHAS de tipo salvaje. También son proporcionadas partes de planta y semillas de la planta derivadas de la plantas de arroz descritas aquí.

La variante de ácido nucleico de AHAS de la presente invención puede incluir un secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de : un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1; un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:3; un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:5; un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11, una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO: 4; una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO: 6; una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO: 12; un polinucleótido que comprende al menos 60 nucleótidos consecutivos de cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados ; y un polinucleótidos complementario a cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados, donde la variante de ácido nucleico de AHAS codifica un polipéptido de AHAS que confiere una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación a un polipéptido de AHAS del tipo salvaje.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas . En una incorporación, las plantas de la presente invención son no transgénicas. Ejemplos de plantas no transgénicas de arroz que tienen una mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona incluyen plantas de arroz que tienen NCIMB número de designación de depósito de patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 42208; o un mutante, recombinado, o un derivado genéticamente intervenido de una planta con NCIMB número de designación de depósito de patente NCIMB 41207, o NCIMB

8

89

42208; o cualquier progenie de la planta con número de designación de depósito de patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 42208, o una planta que es progenie de cualquiera de estas plantas.

En adición a las composiciones de la presente invención, muchos métodos son provistos. Descritos aquí hay métodos de modificar la tolerancia de las plantas de arroz a los herbicidas de imidazolinona que incluyen la modificación la expresión de un ácido nucleico de AHAS en la planta. También se describen métodos para producir plantas transgénicas que tienen un mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona que comprenden, transformar una célula de la planta con un vector de expresión que comprende uno o mas variedades de ácido nucleico de AHAS que codifican una variedad de proteína de AHAS y generar la planta a partir de la célula de la planta. La invención incluye además un método para controlar malezas en la vecindad de la planta de arroz, que incluye la aplicación de un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de arroz, donde la planta de arroz tienen un mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación una variedad tipo salvaje de arroz y donde la planta incluye uno o mas ácidos nucleicos de AHAS que codifican una variante de proteína de AHAS que incluye una sustitución de alanina a treonina al compararse con la proteína de AHAS del tipo salvaje.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 A-B muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico de IMINTA 1 AHAS (SEQ ID NO:1) y la secuencia de amino ácido deducida de ella (SEQ ID NO:2). Las Figuras 1 C-D muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico de IMINTA 4 AHAS (SEQ ID NO:3) y la secuencia de amino ácido deducida de ella (SEQ ID NO:4). Las Figuras 1 E-F muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico de IMINTA 5 AHAS (SEQ ID NO:5) y la secuencia de amino ácido

90

deducida de ella (SEQ ID NO:8). Las Figuras 1 G-H muestran la secuencia de cADN parcial del ácido nucleico del tipo salvaje IRGA 417 AHAS (SEQ ID NO:7) y la secuencia de amino ácido deducida de ella (SEQ ID NO:8)

La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia de cADN de un gen amplificado de AHAS de ADN genómico de una línea IMINTA 1 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO:1), el gen de AHAS amplificado de ADN genómico de la línea IMINTA 4 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO:3), el gen de AHAS amplificado de ADN genómico de la línea IMINTA 5 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO:5), el gen de AHAS amplificado de ADN genómico de la línea de arroz tipo-salvaje IRGA 417 (SEQ ID NO:9). El polimorfismo nucleotídico que confiere la tolerancia a la imidazolinona a las líneas IMINTA 1,4 y 5 es indicado en negrita.

La Figura 3 muestra el alineamiento de amino ácidos de la secuencia de amino ácido deducida de la proteína codificada por el gen de AHAS de la línea IMINTA 1 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 2), la secuencia de amino ácido deducida de la proteína codificada por el gen de AHAS de la línea IMINTA 4 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 4), la secuencia de amino ácido deducida de la proteína codificada por el gen de AHAS de la línea IMINTA 5 tolerante a la imidazolinona (SEQ ID NO: 6), la secuencia de amino ácido deducida de la proteína codificada por el gen de AHAS de la línea de arroz tipo-salvaje IRGA 417 (SEQ ID NO:8), y una secuencia de consenso de amino ácido de AHAS de arroz (SEQ ID NO: 10). El polimorfismo que confiere la tolerancia a la imidazolinona a las líneas IMINTA 1,4 y 5 es indicado en negrita.

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

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

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

La Figura 6 es una tabla que muestra la respuesta de las líneas IRGA 417 e IMINTA 1 al tratamiento con imidazolinona.

La Figura 7 es una tabla que muestra el rendimiento de grano a un 14 % de humedad para las líneas IRGA 417 e IMINTA 1 después del tratamiento con imidazolinona.

La Figura 8 es una tabla que muestra la evaluación de los componentes de rendimiento en las líneas IRGA 417 e IMINTA 1 después del tratamiento con imidazolinona.

Descripción Detallada

La presente invención esta dirigida a plantas de arroz, partes de plantas de arroz y células de plantas de arroz que tienen una mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona. La presente invención también incluye las semillas producidas por las plantas de arroz descritas aquí y los métodos para controlar las malezas en vecindades de las plantas de arroz descritas aquí. Debe entenderse que como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, "un" o "una" puede significar uno o mas, dependiendo del contexto en el cual es usado. Así, por ejemplo, referencia a "una célula" puede significar que al menos una célula puede ser utilizada.

92

Como se usa aquí, el término "planta de arroz" se refiere a una planta que es un miembro del género *Oryza*. Las plantas de arroz de la presente invención pueden ser miembros del género *Oryza*, pero no limitados a, *O. alta*, *O. Australiensis*, *O. Barthii*, *O. Brachyantha*, *O. Eichingeri*, *O. Glaberrima*, *O. Glumaepatula*, *O. Grandiglumis*, *O. Granulata*, *O. Latifolia*, *O. longiglumis*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis*, *O. meyeriana*, *O. minuta*, *O. nivara*, *O. officinalis*, *O. punctata*, *O. rhizomatis*, *O. ridleyi*, *O. rufipogon*, *O. sativa*, y *O. shlechteri* e híbridos de ellos. Ejemplos de las subespecies de *O. Sativa* incluidos dentro de la presente invención son *Japonica* e *Indica*. Una variedad no limitante de *Japonica* es Niponbare, y un ejemplo no limitantes de *Indica* es la variedad 93-11.

El término "planta de arroz" busca incorporar plantas de arroz en cualquier etapa de madurez de su desarrollo, así como cualquier tejido u órgano (partes de plantas) tomadas o derivadas de cualquiera de tales plantas a menos que se indique claramente de otra manera por el contexto. Las partes de planta incluyen, pero no se limitan a tallos, raíces, flores, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, cultivos de anteras, gametofitos, esporofitos, polen, microporos, protoplastos y similares. La presente invención también incluye semillas producidas por las plantas de arroz de la presente invención. En una incorporación, las semillas son crías verdaderas de una mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación con las variedades de semillas de planta de arroz del tipo salvaje.

La presente invención describe una planta de arroz que comprende al menos una variedad de ácido nucleico de AHAS, donde la planta de arroz ha aumentado su tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación con la variedad tipo salvaje de la planta. Como se emplea aquí, el término "lugar del gen de AHAS" se refiere a

la posición de un gen de AHAS en un genoma, y los términos "gen de AHAS" y ácido nucleico de AHAS" se refieren a un ácido nucleico que codifica la enzima AHAS.

Como se emplea aquí, el término "variante (variedad) de ácido nucleico de AHAS" se refiere a un ácido nucleico de AHAS que tiene una secuencia mutada de un ácido nucleico de AHAS del tipo salvaje y que confiere a una planta en la cual esta expresada una mayor tolerancia a la imidazolinona. Como se emplea aquí, el término "variante de allele de AHAS" se refiere a un copia singular de un ácido nucleico de AHAS particular.

Concordantemente, la presente invención incluye una planta de arroz que comprende una variedad de ácido nucleico de AHAS, planta que tiene un mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación a una variedad de la planta del tipo salvaje y donde la variedad de ácido nucleico de AHAS codifica una variante de la proteína de AHAS que incluye una mutación de alanina a treonina en comparación a la proteína de AHAS de tipo salvaje. En una incorporación preferida, la mutación de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en el SEQ ID No:12. En una incorporación preferida, la variante de ácido nucleico de AHAS es seleccionada de un grupo integrado de una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID NO: 1; una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID No:3; una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID No:5; una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID No: 11; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 6; y un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 12.

La presente invención incluye partes de plantas de arroz que incluyen una o mas
aleles de AHAS, donde las plantas de arroz han incrementado su tolerancia al
herbicida de imidazolinona en comparación a una variedad de la planta del tipo
salvaje. Las aleles de AHAS pueden incluir una secuencia nucleotida seleccionada
de un grupo consistente de una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID NO: 1;
una secuencia polinucleótido mostrada en SEQ ID No:3; una secuencia
polinucleótido mostrada en SEQ ID No:5; una secuencia polinucleótido mostrada en
SEQ ID No: 11; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID
NO: 2; un polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 4; un
polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 6; y un
polinucleótido que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 12; un
polinucleótido que comprende al menos 60 nucleótidos consecutivos de cualquiera
de los polinucleótidos anteriormente mencionados; y un polinucleótido
complementario de cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados.

En una incorporación, las plantas de arroz comprenden dos variedades diferentes de
ácido nucleico de AHAS. En otra incorporación la planta de arroz incluye una
variante de ácido nucleico de AHAS, donde el ácido nucleico comprende la
secuencia polinucleótida de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:5.
Preferiblemente, al menos una de las variedades de ácido nucleico de AHAS
comprende una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de
SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5.

El herbicida de imidazolinona puede ser seleccionado pero no se limita a , PURSUIT
(imazetapir), CADRE ® (imazapic), RAPTOR ® (imazamox), SCEPTER ®
(imazaquin), ASSERT ® (imazetabenz), ARSENAL ® (imazapir), un derivado de
cualquiera de los herbicidas anteriormente mencionados, o un mezcla de dos o mas
de los herbicidas antes mencionados, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY

24
95

®). Mas específicamente, el herbicida de Imidazolinona puede ser seleccionado, pero no se limita a , ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-nicotínico; ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-3-quinolinacarboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-m-toluate y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolinona-2-il)-p-toluate. El uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolinona-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico es particularmente preferido.

Las plantas de arroz descritas aquí pueden ser o plantas de arroz trasgénico o plantas de arroz no trasgénico. Como se emplea aquí el término "trasgénico" se refiere a cualquier planta, célula de planta, callos, tejido de planta, o parte de planta, que contiene todas o al menos parte de un polinucleótido recombinado. En muchos casos, todas o parte del polinucleótido recombinado esta establemente integrado dentro de un cromosoma o un elemento extra.-cromosomal estable, así que es pasado a generaciones sucesivas. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinado" se refiere a un polinucleótido que ha sido alterado , rearrreglado o modificado por ingeniería genética. Los ejemplos incluyen cualquier polinucleótido clonado, o polinucleótidos, que están ligados o unidos a secuencias heterólogas. El término "recombinado" no se refiere a alteraciones de polinucleótidos que resultan de eventos que ocurren naturalmente, tales como las mutaciones espontáneas, o de mutagénesis no espontánea seguida por una crianza selectiva. Las plantas que contienen mutaciones que se derivan de mutagénesis no espontánea y crianza selectiva son referidas aquí como plantas no trasgénicas y son incluidas en la presente invención.

Un ejemplo de una planta de arroz no transgénico que comprende una variedad de ácido nucleico de AHAS es la línea de planta depositada con el NCIMB que tiene un Número NCIMB de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, designado aquí como la línea de arroz AHAS IMINTA 1. La secuencia polinucleótida parcial que corresponde al gen de AHAS IMINTA 1 es mostrado en SEQ ID NO:1.

Otro ejemplo de una planta de arroz no transgénico que comprende una ácido nucleico de AHAS es la línea de planta depositada con el NCIMB que tiene un Número NCIMB de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41207, designado aquí como la línea de arroz AHAS IMINTA 4. La secuencia polinucleótida parcial que corresponde al gen de AHAS IMINTA 4 es mostrado en SEQ ID NO:3.

Otro ejemplo de una planta de arroz no transgénico que comprende un ácido nucleico de AHAS es la línea de planta depositada con el NCIMB que tiene un Número NCIMB de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41208, designado aquí como la línea de arroz AHAS IMINTA 5. La secuencia polinucleótida parcial que corresponde al gen de AHAS IMINTA 5 es mostrado en SEQ ID NO:5.

Depósitos separados de cerca de 2500 semillas de las líneas de trigo tolerantes a la imidazolinona fueron hechos en el NCIMB, Aberdeen, Scotland, UK en diciembre 22 de 2003. Estos depósitos fueron realizados de acuerdo con los términos y provisiones del Tratado de Budapest en relación con el depósito de microorganismos. Los depósitos fueron hechos por el término de al menos treinta años y al menos cinco años después del mas reciente requerimiento para el suministro de una muestra del depósito es recibido por el NCIMB. Las semillas depositadas fueron de acuerdo a los Números de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, y NCIMB 41208.

La presente invención incluye las plantas de arroz que tienen un Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; un mutante, un recombinado o un derivado genéticamente intervenido de la planta Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; cualquier progenie de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, o NCIMB 41208; y una planta que es la progenie de cualquiera de estas plantas. En una incorporación preferida, la planta de arroz de la presente invención adicionalmente tiene las características de tolerancia a los herbicidas de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIMB 41206, NCIMB 41207, y NCIMB 41208.

También están incluidos en la presente invención híbridos de las líneas de arroz IMINTA 1, 4 y 5 descritas aquí e híbridos de IMINTA 1, 4 y 5 con otras plantas de arroz.

Los términos "variedad de cultivo (cultivar)" y "variante" se refieren a un grupo de plantas dentro de una especie, definidos por compartir un grupo común de características o rasgos aceptados por expertos en el arte como suficientes para distinguir un "variedad de un cultivo" o variedad de otro cultivo o variedad. Con ninguno de los términos se implica que todas las plantas de cualquier variedad sean genéticamente idénticas respecto del genoma total o molecular o que cualquier planta dada sea un homocigoto en todas las posiciones. Una variedad es considerado "cría verdadera" para un rasgo particular si, cuando el cultivar o variedad es auto-polinizado, todos los progenies contienen el rasgo. El término "línea de cría" o "línea" se refiere a un grupo de plantas dentro de una variedad definida por el compartir un grupo de características o rasgos aceptados por los expertos en el arte como suficientes para distinguir una línea de cría o línea de otra línea de cría o línea. En ninguno de los términos se implica que todas las plantas de una línea de cría o línea sean

genéticamente idénticas al nivel del gene total o molecular o que cualquier planta sea un homocigoto en todas las posiciones. Una línea de cría o línea es considerada una "línea verdadera" para un rasgo particular si, la línea de cría verdadera es auto-polinizada, todos los progenies contienen el rasgo. En la presente invención, el rasgo se deriva de una mutación en un gen de AHAS de la planta de arroz o semilla.

Debe entenderse que la planta de arroz de la presente invención puede incluir un ácido nucleico de AHAS del tipo salvaje en adición a una variedad de ácido nucleico de AHAS. Como se describe en el Ejemplo 2, se contempla que las líneas de arroz IMINTA 1, 4 y 5 contengan una mutación en solo un alelo de AHAS. En consecuencia, la presente invención incluye una planta de arroz que comprende al menos una variedad de ácido nucleico de AHAS en adición a uno o mas ácidos nucleicos de AHAS del tipo salvaje.

Adicionalmente a las plantas de arroz, la presente invención involucra proteínas de AHAS aisladas y ácidos nucleicos que preferiblemente confieren una mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona en comparación con las proteínas de AHAS del tipo salvaje. Preferiblemente, los ácidos nucleicos de AHAS aislados codifican una proteína que tienen una mutación de alanina a treonina. Preferiblemente, la mutación de alanina a treonina esta localizada en un residuo de amino ácido que corresponde a la posición 96 de la SEQ ED NO:12. En una incorporación, el ácido nucleico aislado incluye un polinucleótido seleccionado de un grupo consistente de un polinucleótido como se define en la SEQ ED NO:1; un polinucleótido como se define en la SEQ ED NO:3; un polinucleótido como se define en la SEQ ED NO:5; un polinucleótido como se define en la SEQ ED NO: 11; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 2; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 4; un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 6; un

polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12; un polinucleótido que contiene al menos 60 nucleótidos consecutivos de cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados; y un polinucleótido complementario de cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados. En la presente incorporación, el ácido nucleico de AHAS aislado incluye una secuencia polinucleótida de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. 99

También como se emplea aquí, el término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refieren a RNA o ADN que es recto o ramificado, de trenzado doble o simple o un híbrido de ellos. El término también involucra híbridos de RNA/ADN. Estos términos también involucran secuencias no-traducidas localizadas en ambos extremos 3' y 5' de la región de codificación y al menos 200 nucleótidos de secuencia por debajo del extremo 3' de la región de codificación del gen. Bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras pueden ser usadas para antisentido, dsRNA y emparejamiento con ribozima. Por ejemplo, polinucleótidos que contienen C-5 propina análogos de uridina y citidina han mostrado fijar RNA con gran afinidad y ser potentes inhibidores antisentido de la expresión del gen. Otras modificaciones, tales como modificaciones a la columna fosfodiéster, o el 2'-hidroxi en el grupo de azúcar ribosa del RNA pueden también ser realizadas. Los polinucleótidos antisentido y ribozimas pueden consistir enteramente de ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos mezclados y deoxiribonucleótidos. Los polinucleótidos de la invención pueden ser producidos por cualquier medio, incluyendo preparación genómica, preparación cADN, síntesis in-vitro, RT-PCR y transcripción en-vitro o en vivo.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que esta sustancialmente separada de otras moléculas de ácido nucleico, las cuales están presentes en la fuente natural de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias que codifican otros polipéptidos),

100

Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" esta libre de algunas de las secuencias que naturalmente flanquean el ácido nucleico (por ejemplo, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón de ocurrencia natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado es considerado aislado. En varias incorporaciones, la molécula de ácido nucleico de AHAS aislada puede contener menos de cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias nucleótidas que naturalmente flanquean la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual el ácido nucleico es derivado (por ejemplo, un célula de *O. Sativa*). Un ácido nucleico es también considerado aislado si el ha sido alterado por intervención humana, o colocado en unas posiciones o localizaciones que no son su sitio natural, o si es introducido dentro de una célula por agroinfección, biolística, o cualquier otro método de transformación de plantas. Mas aun, una molécula de ácido nucleico "aislado", tal como una molécula cADN, puede estar libre de alguno de los otros materiales celulares con los cuales esta naturalmente asociada, o del medio de cultivo cuando es producida por técnicas de recombinación, o de los precursores químicos u otros químicos cuando es químicamente sintetizada. Específicamente excluidos de la definición de "ácidos nucleicos aislados" están : los cromosomas de ocurrencia natural (tales como los esparcidores de cromosomas), las bibliotecas de cromosomas artificiales, las bibliotecas genómicas, y las bibliotecas de cADN que existen o como una preparación de ácido nucleico in vitro o como una preparación de célula anfitriona transfectada/transformada, donde la célula anfitriona es o una preparación heterogénea in vitro o plateada como una población heterogénea de colonias individuales. También están específicamente excluidas las bibliotecas anteriores donde un ácido nucleico específico constituye menos del 5% de un número de insertos de ácido nucleico en las moléculas vectores. Además específicamente excluidas ADN genómico de célula completa y la preparaciones de RNA de célula completa (incluyendo las preparaciones de células completas que son mecánicamente cizalladas o digeridas enzimáticamente) Aun mas excluidas

específicamente están las preparaciones de célula completa encontradas o en una preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis donde el ácido nucleico de la invención no ha sido separado mas de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separando mas por escisión una banda individual de una población de banda heterogénea en un gel de agarosa o un secado (blot) de nylon)

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, es decir, un molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia nucleótida de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11 o una porción de ellas, puede ser aislada usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia provista aquí. Por ejemplo, un ADN de AHAS de *O. Sativa* puede ser aislado de una biblioteca de *O. Sativa* usando una porción de la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11. Mas aún, una molécula de ácido nucleico que involucra toda o una porción de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11 puede ser aislada por reacción en cadena de polimerasa usando primers de oligonucleótidos diseñados con base en esta secuencia. Por ejemplo, mRNA puede ser aislado de células de la planta (por ejemplo, por el procedimiento de extracción guanidinium-tiocianato de Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18:5294-5299), y cADN puede ser preparado usando transcriptasa reversa (por ejemplo, transcriptasa reversa MLV de Moloney, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa reversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petesburg , FL). Primers de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación de la reacción en cadena de polimerasa pueden ser diseñados basado en la secuencia nucleótida mostrada en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede ser amplificada usando cADN o, alternativamente, ADN genómico, como una plantilla y primers de oligonucleótidos apropiados de acuerdo a las técnicas de amplificación estándar PCR. La molécula

de ácido nucleico ampliada de esta manera puede ser clonada dentro de un vector apropiado y caracterizada por un análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, oligonucleótidos que corresponden a una secuencia nucleótida de AHAS pueden ser preparados por técnicas estándar sintéticas, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

Los ácidos nucleicos de AHAS de la presente invención pueden incluir una secuencia que codifica una proteína de AHAS (es decir, "regiones codificadoras"), así como secuencias no traducidas 5' y 3'. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluir solo las regiones codificadoras de un gen de AHAS, o pueden contener fragmentos genómicos completos aislados de ADN genómico. Una región codificadora de estas secuencias es indicada como una "posición ORF". Mas aun, la molécula de ácido nucleico de la invención puede incluir una porción de una región de codificación de un gen de AHAS, por ejemplo, un fragmento puede ser usado como un punta de prueba o primer. Las secuencias nucleótidas determinadas de la clonación de los genes de AHAS de *O. Sativa* permiten la generación de puntas de prueba y primers diseñados para ser usados en la identificación y/o clonado de homólogos de AHAS en otro tipo de células y organismos, así como homólogos de AHAS de otras plantas de arroz y especies relacionadas. La parte de la región codificadora puede también codificar un fragmento biológicamente activo de una proteína de AHAS.

Como es usado aquí, el término "parte biológicamente activa de" una proteína de AHAS hace referencia a una parte, por ejemplo, un dominio/motif, de una proteína de AHAS que, cuando se produce en una planta incrementa la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona en comparación con la variedad tipo salvaje de la planta. Métodos para cuantificar el incremento de la tolerancia a los herbicidas de imidazolinona son provistos en los ejemplos que se dan mas adelante. Porciones

biológicamente activas de una proteína de AHAS incluyen péptidos derivados de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12, las cuales incluyen menos amino ácidos que una proteína de AHAS de longitud total e imparten una mayor tolerancia del herbicida de imidazolinona una vez se expresan en una planta. Típicamente, porciones activas biológicamente (por ejemplo, péptidos que son, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, o mas amino ácidos en longitud) incluyen un dominio o motif con al menos una actividad de una proteína de AHAS. Mas aun, otras partes biológicamente activas en las cuales otras regiones del polipéptido son eliminadas, pueden preparadas por técnicas de recombinación y evaluadas para una o mas de las actividades descritas aquí. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de una proteína de AHAS incluyen uno o mas dominios conservados seleccionados de un grupo consistente de un Dominio A, un Dominio B, un Dominio C, un Dominio D y un Dominio E, donde el dominio conservado contiene una mutación.

La invención también proporciona quimérico de AHAS o polipéptidos fusión. Como se emplea aquí, un "polipéptido quimérico" de AHAS o "polipéptido fusión" incluye un polipéptido de AHAS operativamente conectado a un polipéptido de no AHAS. Un "polipéptido de no-AHAS" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia amino ácida que no es sustancialmente idéntica a un polipéptido de AHAS, por ejemplo, un polipéptido que no es una isoenzima de AHAS, el cual desempeña una función diferente que un polipéptido de AHAS. Como se emplea aquí con relación aun polipéptido fusión, el término "operativamente conectado" pretende indicar que el polipéptido de AHAS y el polipéptido de no AHAS están fusionados entre sí así que ambas secuencias satisfacen la función propuesta atribuida a la secuencia usada. El polipéptido de no AHAS puede ser fusionado a un terminal N o un terminal C de un polipéptido de AHAS. Por ejemplo, en una incorporación, el polipéptido fusión es un polipéptido fusión GST-AHAS en la cual la secuencia de AHAS es fusionada al

terminal C de la secuencia GST. Tales polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos de AHAS recombinados. En otra incorporación, el polipéptido de fusión es un polipéptido de AHAS que contiene una secuencia de señal heteróloga en su terminal N. En ciertas células anfitrionas (por ejemplo, células anfitrionas mamíferas), la expresión y/o secreción de un polipéptido de AHAS puede ser incrementada a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de AHAS que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con un polipéptido de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12 puede ser creada introduciendo una o mas sustituciones, adiciones, o eliminaciones de nucleótidos dentro de la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11 tal que una o mas de las sustituciones, adiciones o eliminaciones de amino ácidos son introducidas en los polipéptidos codificados. Mutaciones pueden ser introducidas en las secuencias de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11 por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis PCR- mediada. Preferiblemente, sustituciones de amino ácidos conservadoras son realizadas en uno mas residuos de amino ácidos no esenciales predichos.

Una "sustitución de amino ácido conservadora" es una en la que el residuo de amino ácido es reemplazado con un residuo de amino ácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de amino ácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el arte. Estas familias incluyen amino ácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina,

105

prolina, fenilalanina, metionina, triptofan) cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). Así, un residuo de amino ácido no esencial predicho en un polipéptido de AHAS es preferiblemente reemplazado con otro residuo de amino ácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra incorporación, mutaciones pueden ser introducidas aleatoriamente a lo largo de todo o parte de una secuencia codificadora de AHAS, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser separados para una actividad de AHAS descrita aquí para identificar mutante que retienen actividad de AHAS. Luego de la mutagénesis de la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11, el polipéptido codificado puede ser expresado recombinadamente y la actividad del polipéptido puede ser determinada analizando la tolerancia a la imidazolinona de la planta que expresa el polipéptido como se describe en los ejemplos de mas adelante.

Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de amino ácidos, las secuencias son alineadas para una optima comparación (por ejemplo, brechas pueden ser introducidas en la secuencia de un polipéptido para un alineamiento óptimo con el otro polipéptido). Los residuos de amino ácidos en posiciones de amino ácidos correspondientes son luego comparadas. Cuando una posición en una secuencia es ocupada por el mismo residuo de amino ácido que en la posición correspondiente de la otra secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El mismo tipo de comparación puede ser hecha entre dos secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por la secuencias (por ejemplo, porcentaje de identidad de secuencia = $\frac{\text{número de posiciones idénticas}}{\text{número de posiciones totales}} \times 100$). Para los propósitos de la invención, el porcentaje de secuencia idéntica entre dos ácidos nucleicos o secuencias de

25
106

polipéptidos es determinado usando el programa Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600 Wisconsin Ave, Bethesda, MD 20814). Una pena de abertura de brecha de 15 y una pena de extensión de brecha 6.66 son usadas para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Una pena de abertura de brecha de 10 y una pena de extensión de brecha de 0.1 son usadas para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los demás parámetros son establecidos en los ajustes defecto.

Debe entenderse que para el propósito de determinar la secuencia de identidad, cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de RNA, un nucleótido de timidina es equivalente a un nucleótidos de uracil. Preferiblemente, los polipéptidos de AHAS aislados incluidos en la presente invención son por lo menos cerca de 50 -60 %, preferiblemente al menos 60 - 70%, y mas preferiblemente al menos 70 -75 %, 75 - 80%, 80 - 85 %, 85 - 90%, o 90 - 95 % y mas preferiblemente cerca de 96%, 97 %, 98%, 99%, o mas idénticos a la integridad de la secuencia de amino ácidos mostrados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12. En otra incorporación, los polipéptidos de AHAS aislados incluidos en la presente invención son al menos 50 -60 %, preferiblemente al menos 60 - 70%, y mas preferiblemente al menos 70 -75 %, 75 - 80%, 80 - 85 %, 85 - 90%, o 90 - 95 % y mas preferiblemente cerca de 96%, 97 %, 98%, 99%, o mas idénticos a la integridad de la secuencia de amino ácidos mostrados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12.

Adicionalmente, ácidos nucleicos de AHAS optimizados pueden ser creados. Preferiblemente, un ácido nucleico de AHAS optimizado codifica en polipéptido de AHAS que modula la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona, y mas preferiblemente incrementa la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona con su sobre-expresión en la planta. Como se emplea aquí

"optimizado" se refiere a un ácido nucleico que es genéticamente ingeniado para incrementar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos de AHAS optimizados, la secuencia de ADN del gen puede ser modificada a 1) incluir codones preferidos para genes de plantas expresados altamente; 2) incluir un contenido A+T en la composición base de nucleótido a aquel sustancialmente encontrado en plantas, 3) formar una secuencia de iniciación de planta, 4) eliminar secuencias que causan desestabilización, poliadenilación inadecuada, degradación y terminación de RNA, o que forman ganchos de estructura secundaria o sitios de empalme de RNA. Mayores expresiones de ácidos nucleicos de AHAS en las plantas pueden ser alcanzados utilizando la distribución de frecuencia de uso de codones en plantas en general o una planta en particular: Métodos para optimizar la expresión de ácidos nucleicos en plantas pueden ser encontrados en EPA 0359472; EPA 0385962; Aplicación PCT No WO 91/16432; Patente US No. 5,380,831; Patente US No. 5,436,391; Perlack et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; y Murray et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17:477-498.

Como se emplea aquí, "frecuencia de uso de codones preferida" se refiere a la preferencia exhibida por una célula anfitrion específica al uso de codones de nucleótidos para especificar un amino ácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codon particular en un gen, el número de ocurrencias de tal codon en el gen es dividido por el número total de ocurrencias de todos los codones que especifican el mismo amino ácido en el gen. Similarmente, la frecuencia de uso de codones preferida exhibida por una célula anfitrion puede ser calculada promediando del uso de codones preferida en una gran número de genes expresados por la célula anfitrion. Es preferible que este análisis se limite a genes que están altamente expresados por la célula anfitrion. El porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de codones preferida para un gen sintético respecto del empleado por una célula anfitrion es calculado primero mediante la determinación del porcentaje de

desviación de la frecuencia de uso de un codon singular respecto del de la célula anfitrion seguido de obtener la desviación promedio sobre todos los codones. Como se define aquí, este calculo incluye codones únicos (por ejemplo, ATG y TGG). En términos generales, la desviación promedio total del uso de codones de un gen optimizado respecto de aquel de la célula anfitrion es calculado usando la ecuación 1

$$A = \frac{1}{Z} \sum_{n=1}^Z X_n - Y_n \times 100$$

donde X_n = frecuencia de uso de codones para la célula anfitrion; Y_n = frecuencia de uso de codones n en el gen sintético, n representa un codon individual que especifica un amino ácido y el número total de codones es Z. La desviación total de la frecuencia de uso de codones, A; para todos los amino ácido debe preferiblemente ser menor del 35%, y mas preferiblemente menor de 10%.

Por lo tanto, un ácido nucleico de AHAS puede ser optimizado así que su distribución de uso de codones se desvía, preferiblemente, no mas del 25% respecto de aquella originalmente expresada en los genes de la planta y, mas preferiblemente, no mas de cerca del 10%. Adicionalmente, se da consideración al porcentaje de contenido G + C de la tercera base degenerada (los monocotiledones parecen favorecer G + C en esta posición, mientras que los dicotiledones no). También se reconoce que el nucleótido XCG (donde X es A,T,C o G) es el codon menos preferido en dicot mientras que el codon XTA es evitado en ambos monocot y dicot. Los ácidos nucleicos optimizados de esta invención también preferiblemente tienen índices de evitado doble CG y TA aproximándose cercanamente a aquellos de la planta anfitriona escogida. (por ejemplo, *Oryza Sativa*). Mas preferiblemente estos índices se desvían de aquellos en el anfitrion en no mas del 10 - 15 %.

En adición a las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de AHAS descritos antes, otro aspecto de la invención hace relación a moléculas de ácido nucleico aisladas que son antisentido allí mismo. Se piensa que los polinucleótidos

antisentido inhiben la expresión de un polinucleótido objetivo mediante la fijación específicamente del polinucleótido objetivo e interfiriendo con la transcripción, empalme, transporte, traducción y/o estabilidad del polinucleótido objetivo. Se describen métodos en el arte previo para apuntar al polinucleótido antisentido al ADN cromosomal, a un transcrito RNA primario o a un mRNA procesado. Preferiblemente, las regiones objetivo incluye sitios de inserción, codones de iniciación de traducción, codones de terminación de traducción, y otras secuencias dentro del marco de lectura abierto.

El término "antisentido" para los propósitos de la presente invención, se refiere a los ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido que es suficientemente complementario a todo o a una parte del gen, transcrito primario, o mRNA procesado, así que interfiere con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de emparejamiento de base de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick estándar. Específicamente, las purinas se emparejan de base con pirimidinas para formar una combinación de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con cualquiera timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina emparejada con uracil (A:U) en el caso de RNA. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridarse mutuamente aun si ellos no son completamente complementarios entre si, siempre que cada uno tenga al menos una región que sustancialmente complementaria una de la otra. El término "ácido nucleico antisentido" incluye RNA de trenzado simple así como casetes de expresión de ADN de doble trenzado que pueden ser transcritos para producir un RNA antisentido. Ácidos nucleicos antisentido "activos" son moléculas de RNA antisentido que son capaces de hibridarse selectivamente con un transcrito primario o mRNA que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12.

En adición a los ácidos nucleicos de AHAS y a los polipéptidos descritos arriba, la presente invención involucra estos ácidos nucleicos y polipéptidos anexados a un moiety. Estos moieties incluyen, pero no se limitan a, moieties de detección, moieties de hibridización, moieties de purificación, moieties de entrega, moieties de reacción, moieties de fijación y similares. Un grupo típico de ácidos nucleicos que tienen moieties anexados son puntas de prueba y primers. Las puntas de prueba y primers típicamente incluyen un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido típicamente incluye una región de secuencia oligonucleótida que hibridiza bajo condiciones rigurosas al menos cerca de 12, preferiblemente cerca de 25, mas preferiblemente cerca de 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una trenza de sentido de la secuencia establecida en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11; una secuencia antisentido de la secuencia establecida en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11, o mutantes de ocurrencia natural de ellos. Primers basados en la secuencia nucleótida SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11 pueden ser usados en reacciones de PCR para clonar homólogos de AHAS. Puntas de prueba basadas en la secuencia de nucleótido de AHAS pueden ser usadas para detectar transcritores o secuencias genómicas que codifican los mismos polipéptidos homólogos. En incorporaciones preferidas, la punta de prueba comprende un grupo marcador anexo, por ejemplo el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un cofactor enzimático. Tales puntas de prueba pueden ser usadas como parte de un equipo de prueba de marcador genómico para identificar células que expresan un polipéptido de AHAS, tal como midiendo un nivel de ácido nucleico que codifica AHAS, en una muestra de células, por ejemplo, detectando niveles de AHAS mRNA o determinando si un gen de AHAS genómico ha sido mutado o eliminado.

La invención provee además un vector de expresión recombinado aislado que incluye ácido nucleico de AHAS como el descrito antes, donde la expresión del

vector en una célula anfitrion resulta en un incremento de la tolerancia a los herbicidas de imidazolina en comparación a una variedad del tipo salvaje de la célula anfitrion. Como es empleado aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido conectada. Un tipo de vector es un "plásmido" el cual se refiere a un aro de ADN de doble trenza circular dentro del cual segmentos adicionales de ADN pueden ser ligados. Otro tipo de vector es el vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden ser ligados dentro de un genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitrion en la cual han sido introducidos (por ejemplo, vectores bacteriales que tienen una replicación de origen bacterial y vectores episomales mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no-episomales mamíferos) están integrados dentro del genoma de una célula anfitrion una vez introducidos dentro de la célula anfitrion, y en consecuencia son replicados conjuntamente con el genoma anfitrion. Mas aun, ciertos vectores son capaces de conducir la expresión de los genes a los cuales están operativamente conectados. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinado son a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden ser usados de manera intercambiada ya que el plásmido es la forma de vector mas usada. Sin embargo, la invención esta formulada para incluir otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus, y virus adeno-asociados) los cuales sirven funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinados de la invención incluyen un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, lo que significa que los vectores de expresión recombinados incluyen uno o mas secuencias regulatorias, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas a ser usadas para expresión, la cual es operativamente conectada

a la secuencia de ácido nucleico a ser expresado. Con respecto a un vector de expresión recombinado, "operativamente conectado" es usado para indicar que la secuencia nucleótida de interés es conectada a la secuencia (s) regulatorias en una forma que permite la expresión de la secuencia nucleótida (por ejemplo, en una transcripción in vitro/sistema de traducción o en una célula anfitrion cuando el vector es introducido dentro de ella). El término "secuencia regulatoria" es usado para incluir promotores, incrementadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poliadenilación). Tales secuencias regulatorias son descritas, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) y Gruber and Crosby, en : Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Eds. Glick and Thompson, Capítulo 7, 89 –108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluyendo las referencias en ellos. Las secuencias reguladoras incluyen esas que conducen expresión constitutiva de una secuencia nucleótida en muchos tipos de células anfitrionas y esas que conducen expresión de una secuencia nucleótida solo en ciertas células anfitrionas o bajo ciertas condiciones. Será apreciado por aquellos experimentados en el arte que el diseño de los vectores de expresión puede depender en factores tales como la escogencia de la célula anfitrion a ser trasformada, el nivel de expresión de polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden ser introducidos dentro de células anfitrionas para así producir polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácido nucleico como el descrito aquí. (por ejemplo, polipéptidos de AHAS, polipéptidos de fusión).

En una incorporación preferida de la presente invención, los polipéptidos de AHAS son expresados en plantas y células de plantas tales como células de planta unicelular (tal como algas) (ver Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3): 239 – 252 y referencias allí) y células de plantas de plantas mas latas (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cosecha). Un polinucleótido de AHAS

puede ser introducido en una planta por cualquier medio, incluyendo trasfección, transformación o traducción, electroporación, bombardeo de partículas, agroinfección, biolística y similares.

Métodos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas incluyendo células de plantas pueden ser encontrados en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Métodos en Biología Molecular, 1955, Vol 44, *Agrobacterium* protocols, Ed: Gratland and davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Como el incremento a la tolerancia a los herbicidas de imidazolinona es un rasgo general que se desea sea heredado en una amplia variedad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, sorgo, arroz, cebada, soya, maní, algodón, rapeseed y canola, manihor, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas como papa, tabaco, berenjena y tomate, especies *Vicia*, arveja, alfafa, plantas arbustivas (café, cacao, te), especies *Salix*, árboles (palma de aceite, coco), pastos permanentes y cultivos de forraje, estas plantas de cultivo son también plantas objetivo para una ingeniería genética como una incorporación mas de la presente invención. En una incorporación preferida, la planta es de arroz. Cultivos de forraje incluyen, pero no se limitan a millo, alpiste, cebadilla, pastura de centeno, bluegras, hierba de huerto, alfalfa, salfoin, pie de pájaro, trébol de serradela, trébol alsike, trébol rojo, y trébol dulce.

En una incorporación de la presente invención. Trasfección de un polinucleótido de AHAS dentro de una planta es logrado por transferencia de gen mediada por *Agrobacterium*. Un método de transformación conocido a aquellos expertos en el arte es el sumergir un planta florecida en una solución de *Agrobacteria*, donde la *Agrobacteria* contiene el ácido nucleico de AHAS, seguido por la cría de los gametos transformados. La transformación de la planta mediada por *Agrobacterium* puede ser

realizada usando, por ejemplo, el GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Clontech) variedad *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación puede ser realizada por técnicas de transformación estándar y regeneración (Dablaere et al., 1994, Nucl. Acid. Res. 13:4777-4788; Gelvein, Stanton B and Shilperoot, Robert A, Planta Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ. 1995, - In Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. And Thomson, John E. Methods in Planta Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S, ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, canola puede ser trasformada vía cotiledón o transformación de hipocotil (Moioney et al, 1989, Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al, 1989, Plant Physiol, 91:694- 704). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y selección de la planta depende del vector binario y la variedad de *Agrobacterium* empleada en la transformación. La selección de canola es normalmente realizada usando kanamicina como un marcador de planta seleccionable. La transferencia de gen por *Agrobacterium* a la linaza puede ser realizada usando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13:282 -285. Adicionalmente la transformación de la soya puede ser realizada usando por ejemplo la técnica descrita en la Patente Europea No: 0424 047, la Patente US No, 5,322,783, la Patente Europea No 0397 687, la Patente US. No 5,376,543, o la Patente US No 5,169,770. La transformación del maíz puede ser lograda por bombardeo de partículas, toma de ADN mediada por polietileno glicol o vía una técnica de fibra de carburo de silicio. (ver, por ejemplo, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de transformación de maíz es encontrado en la Patente U.S No 5,990,387, y un ejemplo específico de transformación de trigo puede ser encontrado en la aplicación PCT No WO 93/07256.

De acuerdo a la presente invención, el polinucleótido de AHAS introducido puede ser mantenido en la célula de la planta establemente si es incorporado dentro de un replicón autónomo no-cromosomal o integrado dentro de los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido de AHAS puede estar presente en un vector no-replicante extra-cromosomal y ser expresado transientemente o transientemente activo. En una incorporación, un microorganismo recombinado homólogo puede ser creado donde el polinucleótido de AHAS es integrado dentro de un cromosoma, un vector es preparado el cual contiene al menos una porción de un gen de AHAS dentro del cual una eliminación, adición o sustitución ha sido introducida para así alterar, por ejemplo, perturbar funcionalmente, el gen de AHAS endógeno y crear un gen de AHAS. Para crear una mutación puntual vía recombinación homóloga, híbridos de ADN-RNA pueden ser usados en una técnica conocida como quimeroplasti (Cole- Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27 (5) :1323 – 1330 and Kmiec, 1999, Gene Therapy American Scientist 87(3):240 – 247). Otros procedimientos de recombinación homóloga es especies de son también conocidos en arte y son contemplados para usar aquí.

En el vector de recombinación homólogo, el gen de AHAS puede ser flanqueado a sus extremos 5' y 3' por una molécula de ácido nucleico adicional del gen de AHAS para permitir que la recombinación homóloga entre el gen de AHAS exógeno transportado por el vector y el gen de AHAS endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula de ácido nucleico de AHAS adicional que flanquea es de suficiente longitud para una exitosa recombinación homóloga con el gen endógeno. Típicamente, cientos de parejas de base hasta kilobases de ADN flanqueado (a ambos extremos 5' y 3') están incluidos en el vector (ver, por ejemplo, Thomas K. R, and Capecchi, M.R, 1987, Cell 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homólogos, o Strepp et al., 1998, PNAS, 95(8) 4368 – 4373 para recombinación basada en cADN en *Phycomitrella patens*) Sin embargo, puesto que

el gen de AHAS normalmente difiere del gen de AHAS en unos pocos amino ácidos, una secuencia de flaqueo no siempre es necesaria. El vector de recombinación homólogo es introducido dentro del microorganismo o célula de la planta (por ejemplo, vía ADN mediado por polietileno glicol), y las células en las cuales el gen de AHAS introducido se ha recombinado homológamente con el gen de AHAS endógeno son seleccionadas usando técnicas bien conocidas.

En otra incorporación, microorganismos recombinados pueden ser producidos conteniendo sistemas seleccionados que permiten una expresión regulada de l gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen de AHAS sobre un vector colocándolo bajo control del operon lac permite la expresión del gen de AHAS solo en presencia de IPTG. Tales sistemas regulatorios son bien conocidos en el arte.

Ya sea presente en un vector no replicante extra cromosomal o en un vector que esta integrado en un cromosoma, el polinucleótido de AHAS preferiblemente reside en un casete de expresión de la planta. Un casete de expresión de la planta preferiblemente contiene secuencias reguladoras capaces de manejar expresiones del gen en células de la planta que están operativamente conectadas así que cada secuencia puede realizar su función, por ejemplo, la terminación de transcripción por señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se originan de *Agrobacterium tumefaciens* t-ADN tal como el gen 3 conocido como octopina sintasa del Ti-plásmido pTIACH5 (Gielen et al, 1984, EMBO, J 3: 835) o equivalente funcionales de el, pero también otros destructores funcionalmente activos en plantas son adecuados. Como la expresión del gen de las plantas es a menudo no limitado en niveles de transcripción, un casete de expresión de la planta contiene preferiblemente otras secuencias operativamente conectadas como ampliadoras de traducción tal como la secuencia sobre-conducida que contiene la secuencia líder no traducida 5' del virus mosaico del tabaco ampliando la razón

polipéptido por RNA (gallie et al., 1987, Nucl. Acids. Research 15: 8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen esos detallados en: Becker, D. et al., 1992, Nuevos vectores binarios de plantas con marcadores seleccionables localizados próximos al borde izquierdo, Plant Mol. Bio. 20:1195-1197; Bevan, M.W. 1984, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12:8711-8721; and Vector for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plantas, vol 1, Engineering and Utilization, eds: Kung and R, Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38)

La expresión del gen de plantas debe estar operativamente conectada a un promotor apropiado que confiera una expresión del gen en una manera oportuna, tipo célula-preferido o tejido-preferido. Los promotores útiles en los casetes de expresión de la Invención incluyen cualquier promotor que sea capaz de iniciar transcripción en una célula de una planta. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a aquellos que pueden ser obtenidos de las plantas, virus de plantas y bacterias que contienen genes que están expresados en plantas, tal como *Agrobacterium* y *Rizobium*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, desarrollado-preferido, tipo célula-preferido, tejido-preferido u órgano-preferido. Los promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de las condiciones. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores CaMV 19S y 35S (Odell et al, 1985, Nature 313: 810 – 812), el promotor sX Ca MV 35 S (kay et al., 1987, Science 236: 1299 –1302) el promotor Sept 1, el promotor actina de arroz (McEroy et al., 1990, Plant cell 2:163 –171), el promotor actina *Arabidopsis*, el promotor ubiquitina (christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675 – 689); pEmu (Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81:581 – 588) el promotor 35 S de virus mosaico figwort, el promotor Smas (Velten et al., 1984, EMBO. J. 3: 2723 – 2730), el promotor GRP1-8, el promotor de deshidrogenasa de alcohol cinamil (Patente US No 5, 683, 439), promotores del T-ADN de *Agrobacterium*, tal como manopina sintasa, nopalina sintasa y octapina sintasa, el

promotor de la pequeña sub-unidad carboxiladas de bifosfato ribulosa (ssu-RUBISCO) y similares.

Los promotores inducibles son activos bajos ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque patógeno, condiciones anaeróbicas, y similares. Por ejemplo, el promotor hps80 de *Brassica* es inducido por impactos de calor; el promotor PDDK es inducido por luz; el promotor PR-1 del tabaco, *Arabidopsis*, y maíz son inducibles por infección con patógenos; y el promotor Adh1 es inducido por hipoxia y tensiones de frío. La expresión de un gen de planta puede también ser facilitada a través de un promotor inducible (Par revisión, ver Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol. 48: 89 –108). Promotores Inducibles químicamente son especialmente adecuados si una expresión del gen específica en el tiempo es deseada. Ejemplos de tales promotores es un promotor de ácido salicílico (Aplicación PCT No WO 95/19443) o el promotor inducible de tetraciclina (Gatz et al., 1992, Plant J. 2:397 – 404) y un promotor inducible de etanol (Aplicación PCT No. WO 93/21334)

Promotores desarrollo-orientados son preferencialmente expresados en ciertas etapas de desarrollo. Promotores tejido y órgano-preferidos incluyen esos que son preferiblemente expresados en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas o xylem . Ejemplos de promotores tejido y órgano-preferidos incluyen, pero no se limitan a promotores fruto-preferido, óvulo-preferido, tejido masculino-preferido, semilla-preferido, tegumento-preferido, tubérculo-preferido, tallo-preferido, pericarpio-preferido, y hoja-preferido, estigma-preferido; polen-preferido, antera-preferido, un pétalo-preferido, sépalo-preferido, pedicelo-preferido, silique-preferido, tallo-preferido, raíz-preferido y similares. Los promotores de semilla-preferido son expresados preferiblemente durante el desarrollo de la semilla y/o germinación, Por ejemplo, los promotores preferidos de semilla pueden ser embrión-preferidos,

endoesperma-preferidos y cobertura de semilla-preferidos. Ver Thomson et al, 1989, BioEssays 10:108. Ejemplos de promotores de semilla preferidos incluyen, pero no se limitan a celulosa sintasa (celA), Clim 1, gamma-zeína, globulina-1, maíz 19 kD zein a(cZ19B1) y similares.

Otros promotores adecuados tejido-preferido u órgano-preferido incluyen el promotor de gen-napina de canola (Patente US No. 5,608, 152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baeumlein et al., 1991, Mol Gen Genet, 225 (3): 459-67), el promotor oleosina de *Arabidopsis* (Aplicación PCT No. WO 98/45461), el promotor faseolin de *Phaseolus Vulgaris* (Patente US No. 5,504, 200), el promotor Bce-4 de Brassica (Aplicación PCT No. WO 91/13980), y el promotor legumina B4 (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2) 233-9), así como promotores que confieren expresiones específicas de semillas en plantas monocot como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Promotores adecuados para notar son el gene lpt2 o lpt1 de cebada (Aplicación PCT No. WO 95/15389 y Aplicación PCT No. WO 95/23230), o aquellas descritas en la aplicación PCT No WO 99/16890 (promotores del gen hordeína de cebada, gen de glutelina de arroz, gen de orizina de arroz, gen prolamina de arroz, gen gliadina de trigo, gen glutelina de trigo, gen glutelina de avena, gen kasirina de sorgo, y gen secalina de centeno).

Otros promotores útiles en el casete de expresión de la invención incluyen, pero no se limitan a, el promotor principal de proteína fijadora a/b de clorofila, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor β -conglicina, el promotor napina, el promotor de lectina de soya, el promotor de zeína 15 kD de maíz, el promotor de zeína 22 kD, el promotor de zeína 27 kD, el promotor de zeína g, los promotores encerrados, encogido-1, encogido-2 y bronce, el promotor Zm13 (Patente US No. 5, 086, 2169), los promotores poligalacturonasa de maíz, (PG) (Patentes US No. 5, 412,085 y

5.545,546) y el promotor SGB6 (Patente US No. 5, 470,359), así como promotores sintéticos u otros naturales.

Flexibilidad adicional para controlar expresión de gen heterólogo en plantas puede ser obtenida usando dominios fijadores de ADN y elementos de respuesta de fuentes heterólogas (por ejemplo, dominios fijadores de ADN de fuentes que no son plantas). Un ejemplo de tal dominio fijador de ADN es el dominio fijador de ADN LexA (brent and Patshne, 1985, Cell 43:729 -736).

Otro aspecto de la invención hace relación a las células anfitrionas dentro de las cuales un vector de expresión recombinado de la invención es introducido. Los términos "célula anfitriona" y "célula anfitriona recombinada" son usados de manera intercambiable aquí. Se entiende que tales términos se refieren no solo a la célula objeto particular pero que también se aplican al progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero están todavía incluidas dentro del alcance de los términos usados aquí. Una célula anfitrión puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polinucleótido de AHAS puede ser expresado en una célula bacteriana tal como *C. glutamicum*, células de insectos, células de hongos, y células de mamíferos (tales como células de ovarios de hamster Chino (CHO) o células COS), lagos, ciliados, células de plantas, hongos y otros microorganismos como *C. glutamicum*. Otras células anfitrionas adecuadas son bien conocidas para aquellos experimentados en el arte.

Una célula anfitriona de la invención, tal como una célula anfitriona procariótica o eucariótica en cultivo, puede ser usada para producir (es decir, expresar) un polinucleótido de AHAS. Concordantemente, la invención provee además métodos

para producir polipéptidos de AHAS usando las células anfitriona de la invención. En una incorporación, el método comprende cultivar la célula anfitriona de la invención (dentro de la cual un vector de expresión que codifica un polipéptido de AHAS ha sido introducido, o dentro de cuyo genoma ha sido introducido un gen codificando un polipéptido de tipo salvaje o de AHAS) en un medio adecuado hasta que el polipéptido de AHAS es producido. En otra incorporación, el método incluye además el aislamiento de polipéptidos de AHAS del medio o de la célula anfitriona. Otro aspecto de la invención hace relación a polipéptidos de AHAS aislados, y partes biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o parte biológicamente activa de él está libre de algo del material celular cuando es producido por técnicas de ADN recombinado, o precursores químicos u otros químicos cuando es químicamente sintetizado. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos de AHAS en los cuales el polipéptido es separado de alguno de los componentes celulares de la célula en la cual es natural o recombinadamente producido. En una incorporación el lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye la preparación de un polipéptido de AHAS que tiene menos del 30% (en peso seco) de material no-AHAS (también referido aquí como un "polipéptido contaminante"), mas preferiblemente menos de 20% de material no AHAS, todavía mas preferido menos de 10% de material no AHAS, y mas preferiblemente menos de cerca de 5% de material no AHAS.

Cuando el polipéptido de AHAS, o una parte biológicamente activa de él, es producido por recombinación, esta también sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de cerca del 20%, mas preferiblemente menos de 10% y más preferiblemente menos de 5% del volumen de la preparación de polipéptido. El lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos y otros químicos" incluye preparaciones de polipéptidos de AHAS en los cuales el polipéptido es separado de los precursores químicos u otros químicos que

están involucrados en la síntesis del polipéptido. En una incorporación, el lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos" incluye preparaciones de un polipéptido de AHAS que tiene menos del 30% (en peso seco) de precursores químicos de no AHAS, mas preferiblemente de cerca de 20% de precursores químicos de no AHAS, todavía mas preferido menos de 10% de precursores químicos de no AHAS, y mas preferiblemente menos de 5% de precursores químicos de no AHAS. En incorporaciones preferidas, los polipéptidos, o partes biológicamente activas de ellos, carecen de polipéptidos contaminantes del mismo organismo a partir del cual el polipéptido de AHAS es preparado. Típicamente, tales polipéptidos son producidos por expresiones recombinadas de, por ejemplo, un polipéptido de AHAS de *Oryza sativa* en plantas diferentes de *Oryza sativa* o microorganismos tales como *C. glutanlum*, ciliatos, lagas u hongos.

Las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de AHAS de la invención tienen una variedad de usos. Las secuencias de ácido nucleico y amino ácidos de la presente invención pueden ser usadas para transformar plantas, de esta forma modulando la tolerancia de la planta a herbicidas de imidazolinona. Concordantemente, la invención provee un método para producir plantas transgénicas que tienen una mayor tolerancia a los herbicidas de imidazolinona que incluyen (a) transformar la célula de una planta, con uno o más vectores de expresión que incluyen uno o mas variedades de ácidos nucleicos de AHAS, y (b) generando desde la célula de la planta una planta transgénica con una tolerancia incrementada a los herbicidas de imidazolinona en comparación a una variedad tipo salvaje de la planta. En una incorporación, la variante de ácido nucleico de AHAS codifica una variante de polipéptido de AHAS que incluye una mutación de alanina a treonina en comparación con un polipéptido del tipo salvaje.

La presente invención incluye métodos de modificar la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona que incluye modificar la expresión de uno o mas variedades de ácidos nucleicos de AHAS. La tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona puede ser aumentada o disminuida por el aumento o disminución de la expresión de polinucleótidos de AHAS, respectivamente. Preferiblemente, la tolerancia de la planta a los herbicidas de imidazolinona es incrementada por el aumento de la expresión de un polinucleótido de AHAS. En una incorporación, la variante de ácidos nucleicos de AHAS codifica una variante de polipéptido de AHAS que incluye una mutación de alanina a treonina en comparación con un polipéptido del tipo salvaje. La expresión de un polinucleótido de AHAS puede ser modificada por cualquier método conocido para aquellos expertos en el arte. Los métodos para incrementar la expresión de polinucleótidos de AHAS pueden ser usados si la planta es trasgénica o no trasgénica. En los casos cuando la planta es trasgénica, la planta puede ser trasformada con un vector que contiene cualquiera de los antes descritos ácidos nucleicos codificando AHAS, o la planta puede ser trasformada con un promotor que dirige la expresión de polinucleótidos endógenos en la planta, por ejemplo. La invención provee que tal promotor pueda ser tejido específico o regulado por el desarrollado. Alternativamente, las plantas no trasgénicas pueden tener una expresión de polinucleótidos de AHAS endógenos modificada por la inducción de un promotor nativo. La expresión de polinucleótidos que incluyen una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:11 en plantas objetivo puede ser lograda por, pero no se limita a, uno de los siguientes ejemplos: (a) un promotor constitutivo; (b) un promotor químicamente inducido; (c) expresión por un promotor ingeniado con por ejemplo factores de transcripción derivados de dedos de zinc. (Greisman & pabo, 1997, Science 275 :657).

En una incorporación preferida, la transcripción de los polinucleótidos de AHAS es modulada usando factores de transcripción derivados de dedos de zinc (ZFPs) como

es descrito en Gelsman and Pabo, 1997, Science 275:657 y manufacturado por Sangamo Biosciences, Inc. Estos ZFPs comprenden ambos, un dominio de reconocimiento de ADN y un dominio funcional que causa la activación o represión de un ácido nucleico objetivo tal como un ácido nucleico de AHAS. En consecuencia, ZFPs activantes o represores pueden ser creados que reconocen específicamente los promotores de polinucleótidos de AHAS descritos antes y usados para incrementar o reducir la expresión de polinucleótidos de AHAS en una planta, de esta manera modulando la tolerancia de la planta a los herbicidas.

Como se describe en mas detalle adelante, las plantas producidas por los métodos de la presente invención pueden ser monocot o dicot. Las plantas pueden ser seleccionadas de maíz, trigo, centeno, avena, sorgo, arroz, cebada, soya, maní, algodón, rapeseed y canola, manihor, plmlenta, girasol y tagetes, plantas solanáceas como papa, tabaco, berenjena y tomate, especies *Vicia*, arveja, alfafa, café, cacao, te), especies *Salix*, palma de aceite, coco), pastos permanentes y cultivos de forraje, por ejemplo. En una incorporación preferida, la planta es de arroz. Cultivos de forraje incluyen, pero no se limitan a, millo, alpieste, cebadilla, pastura de centeno, bluegras, hiema de huerto, alfalfa, salfoin, pie de pájaro, trébol de serradela, trébol alsike, trébol rojo, y trébol dulce.

En cada uno de los métodos descritos arriba, las células de la plantas incluyen, pero no se limitan a, un protoplasto, una célula productora de gameto, y una célula que se regenera en una planta completa. Como se emplea aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula de planta, callos, tejido de planta, o parte de planta, que contiene todo o parte de al menos un polinucleótido recombinado. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinado esta establemente integrado dentro de un cromosoma o un elemento extra cromosomal estable, así que es pasado a generaciones sucesivas.

Cultivo de tejidos o de varios tejidos de arroz y regeneración de plantas a partir de ellos es bien conocido y ampliamente publicado. Por ejemplo, referencia puede ser hecha a Chu, Q. R, et al., (1999) " Use of Bridging parents with high anther culturability to improve plant regeneration an breeding value in rice", Rice Biotechnology Quarterly 38:25-26; Chu. Q. R et al., (1998) " A novel planta regeneration medium for rice anther culture of Southern US crosses" Rice Biotechnology Quarterly 35:15-16; Chu. Q. R et al., (1997) " A novel basal medium for embryogenic callus induction of Southern US crosses", Rice Biotechnology Quarterly 32: 19 – 20; and Oono, K., "Broadening the Genetic Variability By Tissue Culture Methods" Jap. J. Breed. 33 (Suppl.2), 306 –307, Illus. 1983, cuyas exposiciones son en consecuencia incorporadas aquí en su integridad por referencia.

Como se describió antes, la presente invención enseña compuestos y métodos para incrementar la tolerancia a los herbicidas de imidazolinona de las plantas de arroz o semillas en comparación a una variedad del tipo salvaje de la planta o la semilla. En una incorporación preferida , la tolerancia a la imidazolinona de una planta de arroz o semilla es incrementada en tal forma que la planta o semilla pueden soportar una aplicación de herbicida de imidazolinona de preferiblemente aproximadamente 10 – 40 g.a.i – ha⁻¹ mas preferiblemente de 20 – 160 g.a.i – ha⁻¹ y mas preferiblemente , 40 – 80 g.a.i – ha⁻¹. Como se emplea aquí, " soportar" una aplicación de herbicida de imidazolinona significa que la planta ni es destruida ni lesionada por la aplicación.

Adicionalmente se provee aquí un método de controlar malezas en la vecindad de una planta de arroz , que incluye la aplicación de un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de arroz, la cual tiene un tolerancia incrementada al herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad del tipo salvaje de la planta de arroz, y donde la planta de arroz tolerante a la imidazolinona incluye al menos una

26

variante de ácido nucleico de AHAS que codifica una variante de polipéptido de AHAS. Preferiblemente, la mutación es en un residuo de amino ácido que corresponde a la posición 69 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO; 12. Al proveer una tolerancia incrementada a la imidazolinona a las plantas de arroz, una gran variedad de formulaciones pueden ser empleadas para proteger las plantas de arroz de las malezas, para así aumentar el crecimiento de la planta y reducir la competencia por los nutrientes. Un herbicida de imidazolinona puede ser usado por si solo para pre-aparición, post-aparición, preplantado, y para control en plantación de malezas en áreas que rodean las plantas de arroz descritas aquí o una formulación de herbicida de imidazolinona puede ser usado y que contiene otros aditivos. El herbicida de imidazolinona puede también ser usado como un tratamiento de semillas. Los aditivos encontrados en las formulaciones de herbicida de imidazolinona incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de esparcimiento, agentes de pegado, agentes estabilizantes o similares. La formulación de herbicida de imidazolinona puede ser una preparación seca o húmeda y puede incluir, pero no se limita a, polvos fluibles, concentrados emulsificables y concentrados líquidos. El herbicida de imidazolinona y las formulaciones de herbicida de imidazolinona pueden ser aplicados de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, por rociado, irrigación, expolvoreo, o similares.

A través de estas aplicaciones, varias publicaciones son referenciadas. Las exposiciones de todas estas publicaciones y esas referencias citadas dentro de esas publicaciones son aquí incorporadas en su integridad por referencia dentro de esta aplicación para describir más completamente el estado del arte con el cual se relaciona la invención.

Debe entenderse que lo anterior se relaciona con incorporaciones preferidas de la invención y que numerosos cambios pueden ser realizados a ellos sin apartarse del

alcance de la invención. La invención es ilustrada además por los siguientes ejemplos, que no han de ser constituidos en manera alguna como limitadores sobre el alcance de ellos. Por el contrario, debe entenderse claramente que pueden concurrirse a varias otras incorporaciones, modificaciones y equivalente de ellas, que después de leer esta descripción pueden surgir por si mismas a aquellos expertos en el arte, sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Mutágenesis y Selección de las líneas de Arroz Tolerantes a la Imidazolinona

Dos muestras de semillas (600 g cada una) de la variedad de arroz IRG417 fueron tratadas con una solución acuosa 0.01 M de azida de sodio a un pH 3 (amortiguadora de fosfato 0.067M) para producir la semilla M1. Este tratamiento fue aplicado empapando cada muestra de semilla en un Erlenmeyer de dos litros que contenía un litro de solución de azida de sodio, bajo agitación constante, durante 18 horas, a temperatura ambiente. Después del tratamiento, las semillas fueron enjuagadas en agua de la llave, mas tarde, las semillas fueron parcialmente secadas al aire sobre hojas de papel secante para extraer la humedad de la superficie de las semillas. Después, las semillas tratadas fueron plantadas directamente en el vivero de campo.

Las semillas M1 fueron plantadas en el vivero con un sembrador experimental Wintersteiger a una tasa de 50 plantas por metro cuadrado. Líneas de chequeo de la variedad tipo salvaje IRGA 417 fueron plantadas con sembrador de empuje. Las líneas fueron cultivadas bajo condiciones de inundación hasta madurez (26 % de humedad de grano) y fueron cosechadas en volumen. La semilla recogida (M2) fue

secada en un secador de convección durante 14 horas a 45 °C. Las semillas M2 fueron mantenidas en almacenamiento hasta la siguiente estación.

Las semillas de las plantas M1 (semillas M2) fue plantada con un sembrador experimental para grandes áreas (AVEC) a una tasa de 50 kg/ha. Un estimado de 3 ha fue finalmente definido que incluía una población de 6×10^6 plantas. Líneas de chequeo de la variedad tipo salvaje IRGA147 fueron plantadas con un sembrador de empuje. La totalidad del área fue sometida a una presión de selección con una mezcla de dos herbicidas de imidazolinona. Tres separaciones separadas de herbicidas de imidazolinona fueron realizadas con un rociador comercial en diferentes direcciones para prevenir cualquier escape y resultar en un tratamiento 3X. Un volumen total de 222 l/ha fue rociado a 50 psi, con boquillas de chorros T 8002, en cada aplicación de herbicida de imidazolinona.

La tasa del tratamiento 1X fue una mezcla de Arsenal (Imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (imazapir 24.85 g a.i/ha) en una solución acuosa con un surfactante no-iónico (Citowet) a la tasa de 0.25% (v/v). Las aplicaciones fueron realizadas en la etapa de la cuarta hoja de las plantas de arroz. No se registró lluvia durante los 7 días después del tratamiento.

Las observaciones fueron hechas a intervalos regulares para investigar la totalidad del área. Después de 90 días, los individuos sobrevivientes fueron marcados y transplantados a un invernadero para multiplicación asexual e incremento de la producción de semilla. Un total de 10 plantas individuales fueron crecidas, y las semillas fueron cosechadas y secadas en un incubador de semilla durante 7 días a 50 °C. Ninguna planta de las líneas de chequeo sobrevivió después del tratamiento con herbicida.

Las semillas de las plantas seleccionadas M2 fueron sembradas en materas individuales bajo condiciones de invernadero. Un tratamiento 2X fue aplicado con un rociador R&D de espalda, dividido en dos aplicaciones de 1X por tas de Arsenal (imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (imazapic 24.85 g a.i/ha) en una solución acuosa con un surfactante no iónico (Citowet) a una tasa de 0.25 (v/v) Las plantas fueron cosechadas hasta madurez (26% de humedad de grano) y recogidas a mano. La semilla recolectada fue sometida a un tratamiento de rompimiento en latencia de 7 días a 50 °C y preparado para una sesión tardía de plantado en la región norte.

③ Semilla de la población de las tres plantas tolerantes seleccionadas crecidas en el invernadero fueron plantadas en el campo en El Chaco de Las Palmas para el incremento de semilla. Las tres poblaciones identificadas como tolerantes a herbicidas de imidazolinona fueron denominadas IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5. Ellas fueron plantadas con un sembrador comercial de arroz a una tasa de 50 kg/ha. Un tratamiento de 2 X de herbicidas de imidazolinonas, Arsenal (Imazapir 75 g a.i/ha) y Cadre (Imazapic 24 g a.i/ha) en una solución acuosa con un surfactante no iónico (Citowet) a una tasa de 0.25% (v/v) fue aplicado a la etapa de la cuarta a quinta hoja de las plantas de arroz. Ningún síntoma fitotóxico fue observado en cualquiera de las tres poblaciones. Las tres poblaciones rindieron por encima del área de chequeo tratada con un herbicida regular. No se observaron segregantes y una población altamente homogénea tanto en rasgos agronómico y tolerancia fue producida.

Ejemplo 2

Caracterización Molecular de IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5

ADN genómico fue extraído de las hojas de semillas crecidas en invernadero de las variedades salvaje y las líneas de arroz IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 y el gen de AHAS fue amplificado mediante PCR. El producto de PCR fue secuenciado usando protocolos estándar. Los análisis de secuencia revelaron un cambio de pareja de

base singular en la región de codificación del gen de AHAS que causó un cambio de amino ácido de alanina en el amino ácido 96 en el línea tipo salvaje a Treonina 96 en las líneas mutadas. Esta mutación corresponde a un cambio de amino ácido en Alanina 112 en la secuencia de AHAS de *Arabidopsis* a Treonina 122. La secuencia nucleótida de AHAS para IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 son mostradas en las Figuras 1 A, C y E respectivamente como SEQ ID Nos 1, 3 y 5; y las secuencias de amino ácidos de AHAS deducidas son mostradas en la Figuras 1B, D y F como SEQ ID Nos: 2, 4 y 6 respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y amino ácidos de AHAS deducidos de la variedad de arroz de tipo salvaje IRGA 417 son mostradas en la Figuras 1G y H respectivamente, como SEQ ID Nos 7 y 8. Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos y amino ácidos de AHAS para IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 son mostrados en las Figuras 2 y Figura 3 respectivamente. La secuencia de consenso del gen de AHAS de arroz es mostrada en la SEQ ID NO: 9, y la secuencia de amino ácido deducida de la secuencia de consenso de AHAS de arroz es mostrada como SEQ ID NO: 10. El polimorfismo que confiere la tolerancia a la imidazolinona a las líneas IMINTA 1, 4 y 5 es indicada en negrita.

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

Ejemplo 3

Tolerancia a AHAS Herbicidas proveída por IMINTA 1

Una prueba de campo fue realizada con la línea mutada IMINTA 1 y la línea IRGA 417, comparando el desempeño en la presencia y ausencia del tratamiento de imidazolinona. El tratamiento 1X de imidazolinona consistió de Arsenal (Imazapir 75

g a.i/ha) y Cader (imazpic 24,85 g a.i/ha) en una solución con un surfactante no iónico (Citowet) a la tasa de 0.25 %. Las variedades y el tratamiento fueron establecidas como se indica en la Figura 5 como un diseño de bloque aleatorio con tres replicaciones.

Los resultados del tratamiento son mostrados en la Figura 6. No hubo diferencia estadística entre los tratamientos en el número de plantas /m², mostrando así que la aplicación de herbicida 3X no tuvo efectos dañinos. Líneas de chequeo sembradas a lo largo de los lotes no sobrevivieron al tratamiento de herbicida. El valor más alto en los lotes 3X de IMINTA después del tratamiento podía ser debido a la labranza.

El rendimiento de grano y los componentes de rendimiento fueron evaluados para entender el efecto del tratamiento sobre las diferentes etapas fisiológicas, y son mostrados en las figura 7 y 8, respectivamente.. No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos, aunque los valores absolutos mostraron un mejor desempeño de IMINTA 1 3 X. El análisis de los componentes de rendimiento mostró un mayor número de panículas por metro cuadrado y espiguillas/panículas en los lotes de IMINTA 1 3X que ha determinado un mas alto rendimiento que los otros tratamientos. Adicionalmente, un fuerte porcentaje de perturbación fue observado debido a las bajas temperaturas antes y durante el florecimiento. Los días y noches fríos redujeron el desarrollo de la semilla y fueron la razón para los bajos rendimientos promedio.

Aunque no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos, hubo un valor mas alto rendimiento de grano de la IMINTA 1 3X. Como se mencionó, mas panículas y espiguillas/panículas fue encontrado en estos lotes. Observaciones sobre otras líneas tolerantes bajo mas altos tratamientos de aplicación mostraron mas altos tallos

y número de espiguillas/panículas sugiriendo un posible efecto de los herbicidas en los procesos de diferenciación de tallos y flores

Las variedades IMINTA 4 e IMINTA 5 fueron también ensayadas en campo en la misma manera que la variedad IMINTA 1. El rendimiento de grano y de componentes de rendimiento fueron comparables a los encontrados para la variedad IMINTA 1.

Debido a que la tolerancia en IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 es debida a la mutación en la enzima de AHAS haciéndola tolerante a inhibición por los herbicidas de imidazolinona, la actividad in vitro de AHAS extraída de la variedad tipo salvaje de la planta (no teniendo la mutación para tolerancia) es comparada a la actividad in vitro de AHAS extraída de plantas tolerantes en la presencia de varias concentraciones de un herbicida de imidazolinona.

REIVINDICACIONES

Nosotros reivindicamos

1. Una planta de arroz que incluye una variante de ácido nucleico de AHAS, donde la variante de ácido nucleico de AHAS le confiere a la planta una mayor tolerancia a un herbicida de Imidazolinona en comparación a la de una variedad de la planta del tipo salvaje. Donde la variante de ácido nucleico de AHAS codifica una variante de polipéptido de AHAS que incluye una sustitución de una alanina a treonina en comparación al polipéptido de AHAS del tipo salvaje.
2. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en SEQ ID NO:12.
3. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de:
 - (a) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleotóido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y

(f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

4. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:1.
5. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde al menos una variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:3.
6. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:5.
7. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la planta no es transgénica.
8. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o es un recombinado o un derivado genéticamente ingeniado de un planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o de cualquier progenie de la planta de Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o es una planta que es una progenie de cualquiera de estas plantas.
9. La planta de arroz de la reivindicación 7, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM

41208; o es una progenie de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208.

10. La planta de arroz de la reivindicación 7, donde la planta tiene las características de tolerancia a herbicida de la planta con un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208.
11. La planta de arroz de la reivindicación 7, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207
12. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es seleccionado de un grupo consistente de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-nicotínico; ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-3-quinolnocarboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-5-metilnicotínico y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-m-toluate y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-p-toluate.
13. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-nicotínico.
14. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

15. Una parte de la planta de arroz de la reivindicación 1.
16. Una célula de la planta de arroz de la reivindicación 1..
17. Una semilla producida por la planta de arroz de la reivindicación 1.
18. La semilla de la reivindicación 17, donde la semilla contiene la variante de ácido nucleico de AHAS y donde la semilla es una cría verdadera para una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de la semilla de la planta de arroz de tipo salvaje.
19. La planta de arroz de la reivindicación 1. donde la planta es transgénica.
20. La planta transgénica de arroz de la reivindicación 19, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de:
 - (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

21. La planta de arroz de la reivindicación 19, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:1.
22. La planta de arroz de la reivindicación 19, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:3.
23. La planta de arroz de la reivindicación 19, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:5.
24. Un ácido nucleico de AHAS aislado , donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido seleccionado de un grupo integrado por:
 - (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

Donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido de AHAS que confiere una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación a un polipéptido de AHAS de tipo salvaje.

25. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1.
26. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:3.
27. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:5.
28. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2.
29. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:4.
30. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 24, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:6.
31. Un polipéptido de AHAS aislado, donde el polipéptido es seleccionado de un grupo de secuencia de polipéptido como se definen en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:12, donde el polipéptido confiere una mayor

tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación al polipéptido de AHAS del tipo salvaje.

32. El polipéptido aislado de la reivindicación 31, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2.
33. El polipéptido aislado de la reivindicación 31, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:4.
34. El polipéptido aislado de la reivindicación 31, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:6.
35. Un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende la aplicación de herbicida de imidazolinona a la maleza y a la planta, donde la planta tiene una mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación a una variedad de la planta del tipo salvaje, donde la planta incluye una variedad de ácido nucleico de AHAS que codifica una variedad de polipéptido de AHAS que incluye una sustitución de alanina a treonina en comparación con el polipéptido de AHAS de tipo salvaje.
36. El método de la reivindicación 31, donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en SEQ ID NO:12.
37. El método de la reivindicación 31, donde la variedad de ácido nucleico de AHAS es seleccionada de un grupo integrado por:

- (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
- (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
- (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
- (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
- (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
- (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

38. Un método de producir una planta transgénica que tiene una tolerancia al herbicida de imidazolinona incrementada que comprende

- (a) Transformar una célula de la planta con uno o mas vectores de expresión que incluyen al menos una variedad de ácido nucleico que codifica una variedad del polipéptido de AHAS que incluye una sustitución alanina a treonina en comparación con un polipéptido de AHAS del tipo salvaje; y
- (b) Generar a partir de la célula de la planta una planta transgénica con una tolerancia a un herbicida de imidazolinona incrementada en comparación a una variedad de la planta del tipo salvaje.

39. El método de la reivindicación 38, donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de una secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en la SEQ ID NO:12

40. El método de la reivindicación 38, donde al menos una variedad del ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de :
- (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

42

Figura 1 A

Secuencia parcial de nucleótido de AHAS de la línea de Arroz IMINTA 1 (SEQ ID

NO:1)

5 CCTTGTCCGCGCCGCGCAC
GCCCCAGACCGCCCGTAAAGAACCAACGACGACGACGCTCTTTCCCGCTC
GAGCCCGGCTGGGGCGCGCGCGGTCAGGTGCTCGCGCGGTGTCCCCGGTC
ACCCCGCGCTCCCCCGCGCGCGCGCGCCACGCGCTCGCGCGGTGGGGGCG
GGCCGAGCCCGCAAGGGCGCGGACATCCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGT
10 GCGGCTCAGCGACGCTTTCCCGTACCGCGCGCGCACGTCCTTGGAGATC
CACCAGGCGCTGAGCGCGTCCCCGGTCATCACCACCAACCTCTTCCGCCA
CGAGCAGGCGGAGCGCTTCCCGCGTCCCGGTACCGCGCGCGCTCCCGCC
GCGTCCGGGTCTGCGTCCCGACCTCCCGCGCGCGCGGCAACCAACCTCTGT
TCCGCGCTCCCGCGCGCGCTGCTGAGTCCGTCCCGATGGTCCCGATCAC
15 GGGCAGGTCCCCCGCGCGCATGATCGGCAACGAGCGCTTCCAGGAGACGC
CCATAGTGGAGTCAACCGCTCCATCAGCAAGCACAATTACCTTGTCTT
GATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCAAGCAGGAGCGCTTCTTCTCTCGCTC
CTCGCGCGCTCTCGCGCGCGTCTGCTGAGATCCCGAAGGACATCCAGC
AGCAGATGGCTGTGCGAGTCTGGGACACCTCGATGAACTACCGCGGTAC
20 ATTGCAGCGCTGCCAAGCCACCGCGGACAGATTGCTTGAAGAGGTCTT
GCGTCTGGTGGCGAGTCAACCGCGCGGATCTCTATGTCTGGTGGTGGCT
GCTCTGCATCTGGTGAATTTGCGCGGTTTGTGAGCTGACCGGATC
CCAGTTACAACCACTCTGATGGCGCTCGGCAATTTCCCGAGTGAATCC
GTGTCTCTCGCATGCTTGGATGCATGGCAGCGTGTACCGCAATATATG
25 CGGTGGATAAGCTGACCTGTTCCTTGCATTTGGCGTCCGCTTGTATGAT
CGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAGCGCGCGCAAGATTTGTCA
CATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAACCAACCATGTGT
CAATTTGCGCAGGTGTAACTTGTCTTACAGGCGCTTGAATGCTCTGCTA
GACCAGACACAACCAAGCAGTTCTGATTTTATGCTCGTGGCAGATGA
30 GTTGGACGAGCAGAGAGGAGTTTCTCTGGCGTACAAAGCTTTTGGTG
AAGAGATGCCACCGCAATGTCTATTCAAGTCTGTGATGAGCTGACGAA
GGGAGGCAATCATCGCTACTGTGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGC
ACAAATATTACCTTACAAACCGCGCACCGGAGTGGCTGTCTTCCGCTGTCT
TGGGCGCAATGGATTTGGGCTGCGTCTGACGCTGGTCTCTCTGTGGCT
35 AACCCAGGTGTACAGTTGTGATATTGATGGGATGGTGACTTCTCTAT
GAACATTCAAGGATTTGGCATTTATCCGATTGAGAACCTCCCGGTGAAGG
TGATGGTGTGAAACCAACCAATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGAT
AGTTTTTACAAAGCAATAGGCGCATACCTACTTTGGCAACCCAGATG
TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGTTCAATA
40 TTCTGCAATCTGTGTAAACAAAGAGTGAAGTCCGTGCGCGCATCAAG
AAGATGCTCGATACCGCAGGCGCACTTGTGTGATATCATCGTCCCA
CCAGGAGCATGTCTGCTATGATCCCAAGTGGGCGCGCATTCAGGACA
TGATCTGTGATGTGTGAGGAGCTGTGTATATATATATCTGTATG
45 TTGGCAAGCACCAGCCCGC

Figura 1 B

Secuencia parcial deducida de amino ácido de AHAS de línea de arroz
IMINTA 1 (SEQ ID NO:2)

LSAATATGKKEQRENVFPARGVQAAAVECSAVSPV
TPSPAPPATFLRPGPAKPRGADILVEALERCGVEDVVAYPEGOTSMEL
HQALTRSPVTENILFHEEQGEAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATMLV
10 SALADALLDSVPNAVITQVPREMITQIDAFQETPIVEVTRSTENILVL
DVEDIPRTIQRAFFLASSGRPGFVLVDIPEDIQQOMAVFVMDTSMILPGY
IARLPKVPATELLSEQVLELVGSESRFLLYVGCCSASGDELRFVVKLTGI
PVTTEMLGHPFSDDFLMLGMSGTVYANYAVDKADLLAFQVRFD
RVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAKIGGKQPEVSIKADVKLALQGLHALL
15 DQSTTKTSNDPSAMENELQQKREFFLGKTYGKEIPFQYAIQVLDELTK
GEATITGVGQDQSSAAQYTTKPRQMLSSAGLGAMFGLFAAGASVA
NFGVTVVDIDGDSFLANIQELALIRIENLPPKVNVLNENILGAVVQED
RFXKARAAETYLGEPECESEKIYDFVTIAGQNLPAVAVTDESVAAIK
20 KMLDTFGFYLLDIIVPEQENVLPKIPSGGAFKIMILGGGRTVY

Figura 1 C

Secuencia parcial de nucleótido de AHAS de línea de arroz IMINTA 4 (SEQ ID

NO:3)

[illegible]

BA
45

Figura 1 D

Secuencia parcial deducida de amino ácido de AHAS de línea de arroz
IMINTA 4 (SEQ ID NO:4)

10 I S A A T A K T G R E H Q R E H V F F A R G R V G A A V R C S A V S P V
T P P E F A F F A C T F L R P G G F A E S F R G A D I L V E A L K C G V S D V F A Y P G G T E M K I
H Q A L E S P V T T E H L F R E D Q G E A F A A S G Y A R A S G R V G V C V A T S G P G E H L V
S A L A D A L L D S V F E F A I T G Q V F R E D D G T H A F Q E T F I V E V F E S T E K E H L V L
D V E D I P R V I Q E A F F L A S S G R P G P V L V D I P E D I Q Q M A V F P M D T E M L P G Y
I A R L P E P P A T E L L E Q V L A I N G E H R A P I L Y V G G C C E A S G D E L J O R F V E L T G I
F V T T L A G L G H F P S D D F L S L R M L G H G T V Y A N Y A V D K A D L L A F Q V E F I D
R V T G E P E A F A S R A K I V E I D I D P A K I G H R Q P E V E I C A D V K L A I Q G L H A L L
D Q S T T E T S S D P E A N H E L D Q Q E R E P L G Y A T F G E H P P Q Y A T Q V I D E L T E
15 G E A T I A T O V G Q R Q S D A Q T T T D R F Q M L S E M G L G A N G F G L P A A G A S V A
N P G V T V V D I D G D G S F L A M I Q E L A L I R I E H L P V K V A V L S Q M L G M V V Q M E D
R F Y K A N R A E T L G S P E C T S E K Y P E F V T I A G S H I P A V K V T I K S E V R A A I K
K M L D T P G P Y L L D I I V P E Q E H V L P M I P E G G A F K D M I L D G D G E T V Y
20

28
146

Figura 1E

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

5 GCGCCGCGCGCCGACCTTGTGCGCGCGCGCGAC
GCGCAAGACCGCGCGTAAGAACCAACAGCGACACCAAGTCTTTGCCGCTC
GAGCGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGTCAAGTCTCGCGCGTGTCCCGCGTC
ACCGCGCGCGTCCCGCGCGCGCGCGCGCAACCGCGTCCCGCGCGCGCGCGC
GCGCGCGCGCGCGCAAGCGCGCGCGCGCATCTCGTGGCGCGCGTGGAGCGGT
GCGCGCGTCAAGCGCGTGTTCGCGTACCGCGCGCGCGCGTCCATCGCGATC
10 CACCAAGCGCGTGAACCGCGTCCCGCGCGTCACTAACCAAGTCTTTGCCGCA
CGAGCAAGCGCGCGCGTTCGCGCGTCCCGCGTACCGCGCGCGCGTCCCGCGC
GCGTGGCGCGTCTCGTGGCGCGTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCAAGTCTG
TCGCGCGTCCCGCGCGCGTCTCGTGGTCCGCGTCCCGCGTGGTCCCGATCAC
GCGCGCGTCCCGCGCGCGCGCGCGTTCGCGCGCGCGCGCGTTCGCGCGCGCGC
15 CCATAGTGGAGTCAACCGCGTCCATCACCAAGCACAAATTAAGTCTGTCTT
GATGTGGAGCGCATCCCGCGCGTCAACAGCGCGCGTCTTCTGTGGCGTCTC
CTCGCGCGCGTCTGTGGCGCGTCTGTGGTGGCGCATCCCGCGCGCGCGTCCAGC
AGCAGATGGCTGTGGCGCGTGTGGCGCACCTCGATGAATCTACCGCGCGTAC
AATGACCGCGTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGTCTT
20 GCGTCTGTGTGGCGCGTCAACCGCGCGCGCGCGTCTGTGTGTGTGTGTGTGT
GCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CCAGTTCACCAAGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
25 CGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
30 AAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GCGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ACAAATTTACCAAGTTCACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC
TGCGCGCGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
AAGCGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
35 GACATTCAGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
AGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
40 AAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CCAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

45

Secuencia parcial deducida de amino ácido de AHAS de línea de arroz
IMINTA 5 (SEQ ID NO:6)

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000

Figura 1-III

Secuencia deducida de amino ácido de AHAS de una línea de arroz del tipo salvaje I47 (SEQ ID NO:8)

5 MATTAATAATLGAATAKTGRKNDQHEVFFARGKVGAAAVRCEAVSV
TPFPAPPATPLRFGWPAEPRGADILVEALRCOVHVFATPGQASMEI
EQALTSFVITHLFRHQGEFAAAGYARASGVGVGVATSGPGATHLV
SALADALLDSVPSWATPGQVPRMIGIDAFQETPIVETREITKHVYL
10 DVEDIPVIGIAFFLASSGEPGFVLVDLFDIQQGNVFFVDTREILPGY
IARLPVPAHELLEQVLRVGEHNFILYVGGCCASGDELERFVELTGI
PVTTHLMLGNFFGDDPLSLMLGMEQTVYANYAVDKADLLAFQVRFDD
KVTGICAFASRAKIVEHIDIPAKIGNDQPEVSTICADVKLALQGLNALL
DQPFETSDWFAHSEMLDQCKNSFFLGYKTFQKEIPQYATQVLDKLT
15 GRATLPGVGGQDSBAQYTYTIRFQMLSSAGLQAMZFGLPAAAGASVA
HFGVTVVDIDGDSFLNIIQELALIRIELPVKVMVLRHQHLMVVMED
RFXANANTYLGNPFCEHNYFDVFTIARGNHPAVKVTAKSEVRAATK
KMLDTFGPYLLDITVPHQEVLMILPSGGAFKIMILDGGRIVY

Alineamiento de una secuencia nucleótida de IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 con secuencia de AHAS del arroz tipo salvaje

[illegible]

	I1_rice	(386)	GCCTCGGGGCTCTGGCTGCGCACTCCGGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
	wt_I47	(401)	GCCTCGGGGCTCTGGCTGCGCACTCCGGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
	consenso	(401)	GCCTCGGGGCTCTGGCTGCGCACTCCGGGCCCCGGGGCAACCAACCTCGTG	
5	I1_rice	(420)	TCCGCGCTCGCCGACCGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCCGCATCAC	451 500
	I4_rice	(420)	TCCGCGCTCGCCGACCGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCCGCATCAC	
	I5_rice	(436)	TCCGCGCTCGCCGACCGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCCGCATCAC	
	wt_I47	(451)	TCCGCGCTCGCCGACCGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCCGCATCAC	
	consenso	(451)	TCCGCGCTCGCCGACCGCGCTGCTCGACTCCGTCGCGATGGTCCGCATCAC	
10	I1_rice	(470)	GGGCGAGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	501 550
	I4_rice	(470)	GGGCGAGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	I5_rice	(486)	GGGCGAGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	wt_I47	(501)	GGGCGAGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
	consenso	(501)	GGGCGAGTCCCCCGCCGATGATCGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGC	
15	I1_rice	(520)	CCATAGTCAGGTCACCCGCTCCATCACCAGGACAAATACCTTGTCTCT	551 600
	I4_rice	(520)	CCATAGTCAGGTCACCCGCTCCATCACCAGGACAAATACCTTGTCTCT	
	I5_rice	(536)	CCATAGTCAGGTCACCCGCTCCATCACCAGGACAAATACCTTGTCTCT	
	wt_I47	(551)	CCATAGTCAGGTCACCCGCTCCATCACCAGGACAAATACCTTGTCTCT	
	consenso	(551)	CCATAGTCAGGTCACCCGCTCCATCACCAGGACAAATACCTTGTCTCT	
20	I1_rice	(570)	GATGTGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAGGCTTCTTCTCTCGGTC	601 650
	I4_rice	(570)	GATGTGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAGGCTTCTTCTCTCGGTC	
	I5_rice	(586)	GATGTGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAGGCTTCTTCTCTCGGTC	
	wt_I47	(601)	GATGTGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAGGCTTCTTCTCTCGGTC	
	consenso	(601)	GATGTGAGGACATCCCCCGGTCATACAGGAGGCTTCTTCTCTCGGTC	
25	I1_rice	(620)	CTCGGCGGCTCTCTGGGCGGCTGCTGGTCCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	651 700
	I4_rice	(620)	CTCGGCGGCTCTCTGGGCGGCTGCTGGTCCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
	I5_rice	(636)	CTCGGCGGCTCTCTGGGCGGCTGCTGGTCCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
	wt_I47	(651)	CTCGGCGGCTCTCTGGGCGGCTGCTGGTCCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
	consenso	(651)	CTCGGCGGCTCTCTGGGCGGCTGCTGGTCCGACATCCCCAAGGACATCCAGC	
30	I1_rice	(670)	AGCAGATGAGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAAATCTACCGGGGTAC	701 750
	I4_rice	(670)	AGCAGATGAGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAAATCTACCGGGGTAC	
	I5_rice	(686)	AGCAGATGAGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAAATCTACCGGGGTAC	
	wt_I47	(701)	AGCAGATGAGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAAATCTACCGGGGTAC	
	consenso	(701)	AGCAGATGAGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAAATCTACCGGGGTAC	
35	I1_rice	(720)	ATTGCACGCTTCCCCAAGCCACCCCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	751 800
	I4_rice	(720)	ATTGCACGCTTCCCCAAGCCACCCCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	I5_rice	(736)	ATTGCACGCTTCCCCAAGCCACCCCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	wt_I47	(751)	ATTGCACGCTTCCCCAAGCCACCCCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
	consenso	(751)	ATTGCACGCTTCCCCAAGCCACCCCGGACAGAAATGCTTGGAGCAGGTCTT	
40	I1_rice	(770)	GGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGAATCTCTATGTCCGTTGGTGGCT	801 850
	I4_rice	(770)	GGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGAATCTCTATGTCCGTTGGTGGCT	
	I5_rice	(786)	GGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGAATCTCTATGTCCGTTGGTGGCT	
	wt_I47	(801)	GGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGAATCTCTATGTCCGTTGGTGGCT	
	consenso	(801)	GGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGAATCTCTATGTCCGTTGGTGGCT	
45	I1_rice	(820)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	851 900
	I4_rice	(820)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	I5_rice	(836)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
50	wt_I47	(851)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	consenso	(851)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
55	I1_rice	(870)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	I4_rice	(870)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	I5_rice	(886)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	wt_I47	(901)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	
	consenso	(901)	GCTCTGCACTGGTGAATGAATGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATC	

74
190
152

	consenso	(851)	GCTCTGCATCTGTGTGTAATTCGCCCGGTTTGTGTAGCTGACCGGCATC	901	950
	I1_rice	(870)	CCAGTTACACCACTCTGTATGGGCTTCGGCAATTTCCCACTGATGATCC		
	I4_rice	(870)	CCAGTTACACCACTCTGTATGGGCTTCGGCAATTTCCCACTGATGATCC		
5	I5_rice	(886)	CCAGTTACACCACTCTGTATGGGCTTCGGCAATTTCCCACTGATGATCC		
	wt_I47	(901)	CCAGTTACACCACTCTGTATGGGCTTCGGCAATTTCCCACTGATGATCC		
	consenso	(901)	CCAGTTACACCACTCTGTATGGGCTTCGGCAATTTCCCACTGATGATCC	951	1000
	I1_rice	(920)	GTGTCCCTTCGCATCTTGGGATGATGACACGGTGTACCCAAATTTATG		
10	I4_rice	(920)	GTGTCCCTTCGCATCTTGGGATGATGACACGGTGTACCCAAATTTATG		
	I5_rice	(936)	GTGTCCCTTCGCATCTTGGGATGATGACACGGTGTACCCAAATTTATG		
	wt_I47	(951)	GTGTCCCTTCGCATCTTGGGATGATGACACGGTGTACCCAAATTTATG		
	consenso	(951)	GTGTCCCTTCGCATCTTGGGATGATGACACGGTGTACCCAAATTTATG	1001	1050
	I1_rice	(970)	CGGTGGATTAAGGCTGACCTGTTCCTTCGATTTGGCGTCCGTTTGATGAT		
15	I4_rice	(970)	CGGTGGATTAAGGCTGACCTGTTCCTTCGATTTGGCGTCCGTTTGATGAT		
	I5_rice	(986)	CGGTGGATTAAGGCTGACCTGTTCCTTCGATTTGGCGTCCGTTTGATGAT		
	wt_I47	(1001)	CGGTGGATTAAGGCTGACCTGTTCCTTCGATTTGGCGTCCGTTTGATGAT		
	consenso	(1001)	CGGTGGATTAAGGCTGACCTGTTCCTTCGATTTGGCGTCCGTTTGATGAT	1051	1100
20	I1_rice	(1020)	CGTGTGACAGGGAAATTAAGGCTTTTGCAGCAGGGCCCAAGATTGTGCA		
	I4_rice	(1020)	CGTGTGACAGGGAAATTAAGGCTTTTGCAGCAGGGCCCAAGATTGTGCA		
	I5_rice	(1036)	CGTGTGACAGGGAAATTAAGGCTTTTGCAGCAGGGCCCAAGATTGTGCA		
	wt_I47	(1051)	CGTGTGACAGGGAAATTAAGGCTTTTGCAGCAGGGCCCAAGATTGTGCA		
25	consenso	(1051)	CGTGTGACAGGGAAATTAAGGCTTTTGCAGCAGGGCCCAAGATTGTGCA	1101	1150
	I1_rice	(1070)	CATTGACATTGATTCAGCGGAGTTGTGAAGAACAAAGCAACCACTGTGT		
	I4_rice	(1070)	CATTGACATTGATTCAGCGGAGTTGTGAAGAACAAAGCAACCACTGTGT		
	I5_rice	(1086)	CATTGACATTGATTCAGCGGAGTTGTGAAGAACAAAGCAACCACTGTGT		
30	wt_I47	(1101)	CATTGACATTGATTCAGCGGAGTTGTGAAGAACAAAGCAACCACTGTGT		
	consenso	(1101)	CATTGACATTGATTCAGCGGAGTTGTGAAGAACAAAGCAACCACTGTGT	1151	1200
	I1_rice	(1120)	CAATTTCGCAGATGTTAAGCTTCTTTACAGGGCTTGAACTCTCTCTA		
	I4_rice	(1120)	CAATTTCGCAGATGTTAAGCTTCTTTACAGGGCTTGAACTCTCTCTA		
35	I5_rice	(1136)	CAATTTCGCAGATGTTAAGCTTCTTTACAGGGCTTGAACTCTCTCTA		
	wt_I47	(1151)	CAATTTCGCAGATGTTAAGCTTCTTTACAGGGCTTGAACTCTCTCTA		
	consenso	(1151)	CAATTTCGCAGATGTTAAGCTTCTTTACAGGGCTTGAACTCTCTCTA	1201	1250
	I1_rice	(1170)	GACCAAGGCACAAAGAACAAAGTTGTGATTTAGTCCGTGGCACAATGA		
40	I4_rice	(1170)	GACCAAGGCACAAAGAACAAAGTTGTGATTTAGTCCGTGGCACAATGA		
	I5_rice	(1186)	GACCAAGGCACAAAGAACAAAGTTGTGATTTAGTCCGTGGCACAATGA		
	wt_I47	(1201)	GACCAAGGCACAAAGAACAAAGTTGTGATTTAGTCCGTGGCACAATGA		
	consenso	(1201)	GACCAAGGCACAAAGAACAAAGTTGTGATTTAGTCCGTGGCACAATGA	1251	1300
	I1_rice	(1220)	GTGTGACCAAGCAAGAGGGAGTTTCCCTCTGGGGTACAAAGCTTTTGGTG		
45	I4_rice	(1220)	GTGTGACCAAGCAAGAGGGAGTTTCCCTCTGGGGTACAAAGCTTTTGGTG		
	I5_rice	(1236)	GTGTGACCAAGCAAGAGGGAGTTTCCCTCTGGGGTACAAAGCTTTTGGTG		
	wt_I47	(1251)	GTGTGACCAAGCAAGAGGGAGTTTCCCTCTGGGGTACAAAGCTTTTGGTG		
	consenso	(1251)	GTGTGACCAAGCAAGAGGGAGTTTCCCTCTGGGGTACAAAGCTTTTGGTG	1301	1350
50	I1_rice	(1270)	AAGAGATCCCAAGCAATATGCTATTCAGGTCTGTGATGAGCTGACGAA		
	I4_rice	(1270)	AAGAGATCCCAAGCAATATGCTATTCAGGTCTGTGATGAGCTGACGAA		
	I5_rice	(1286)	AAGAGATCCCAAGCAATATGCTATTCAGGTCTGTGATGAGCTGACGAA		
	wt_I47	(1301)	AAGAGATCCCAAGCAATATGCTATTCAGGTCTGTGATGAGCTGACGAA		

72
153

5	I1_rice	(1320)	GGGAGGCAATCATGCGCTACTGGTGTGGAACAGCACAGATGTGGGCGGC	
	I4_rice	(1320)	GGGAGGCAATCATGCGCTACTGGTGTGGAACAGCACAGATGTGGGCGGC	
	I5_rice	(1336)	GGGAGGCAATCATGCGCTACTGGTGTGGAACAGCACAGATGTGGGCGGC	
	wt_I47	(1351)	GGGAGGCAATCATGCGCTACTGGTGTGGAACAGCACAGATGTGGGCGGC	
	consenso	(1351)	GGGAGGCAATCATGCGCTACTGGTGTGGAACAGCACAGATGTGGGCGGC	1401 1450
10	I1_rice	(1370)	ACAAATATACCTTACAGCGCGCCACCGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC	
	I4_rice	(1370)	ACAAATATACCTTACAGCGCGCCACCGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC	
	I5_rice	(1386)	ACAAATATACCTTACAGCGCGCCACCGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC	
	wt_I47	(1401)	ACAAATATACCTTACAGCGCGCCACCGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC	
	consenso	(1401)	ACAAATATACCTTACAGCGCGCCACCGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTC	1451 1500
15	I1_rice	(1420)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGTCTTCAGCTGGCTGTCTTCGGCT	
	I4_rice	(1420)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGTCTTCAGCTGGCTGTCTTCGGCT	
	I5_rice	(1436)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGTCTTCAGCTGGCTGTCTTCGGCT	
	wt_I47	(1451)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGTCTTCAGCTGGCTGTCTTCGGCT	
	consenso	(1451)	TGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGTCTTCAGCTGGCTGTCTTCGGCT	1501 1550
20	I1_rice	(1470)	AACCCAGGTGTCAAGTGTGATATATGAGGAGATGGTACCTTCCTCAT	
	I4_rice	(1470)	AACCCAGGTGTCAAGTGTGATATATGAGGAGATGGTACCTTCCTCAT	
	I5_rice	(1486)	AACCCAGGTGTCAAGTGTGATATATGAGGAGATGGTACCTTCCTCAT	
	wt_I47	(1501)	AACCCAGGTGTCAAGTGTGATATATGAGGAGATGGTACCTTCCTCAT	
	consenso	(1501)	AACCCAGGTGTCAAGTGTGATATATGAGGAGATGGTACCTTCCTCAT	1551 1600
25	I1_rice	(1520)	GAACATTCAGGATTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAG	
	I4_rice	(1520)	GAACATTCAGGATTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAG	
	I5_rice	(1536)	GAACATTCAGGATTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAG	
	wt_I47	(1551)	GAACATTCAGGATTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAG	
	consenso	(1551)	GAACATTCAGGATTTGGCATTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAG	1601 1650
30	I1_rice	(1570)	TGATGTTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGAT	
	I4_rice	(1570)	TGATGTTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGAT	
	I5_rice	(1586)	TGATGTTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGAT	
	wt_I47	(1601)	TGATGTTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGAT	
	consenso	(1601)	TGATGTTGTGAAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGAT	1651 1700
35	I1_rice	(1620)	AGGTTTACAAAGCCAAATGGGCGCATACCTTGGGCAACCCAGATG	
	I4_rice	(1620)	AGGTTTACAAAGCCAAATGGGCGCATACCTTGGGCAACCCAGATG	
	I5_rice	(1636)	AGGTTTACAAAGCCAAATGGGCGCATACCTTGGGCAACCCAGATG	
	wt_I47	(1651)	AGGTTTACAAAGCCAAATGGGCGCATACCTTGGGCAACCCAGATG	
	consenso	(1651)	AGGTTTACAAAGCCAAATGGGCGCATACCTTGGGCAACCCAGATG	1701 1750
40	I1_rice	(1670)	TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAAGGGTTCAATA	
	I4_rice	(1670)	TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAAGGGTTCAATA	
	I5_rice	(1686)	TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAAGGGTTCAATA	
	wt_I47	(1701)	TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAAGGGTTCAATA	
	consenso	(1701)	TGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTCCTAAAGGGTTCAATA	1751 1800
45	I1_rice	(1720)	TTCTGCAATCCGTGTAAACAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG	
	I4_rice	(1720)	TTCTGCAATCCGTGTAAACAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG	
	I5_rice	(1736)	TTCTGCAATCCGTGTAAACAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG	
	wt_I47	(1751)	TTCTGCAATCCGTGTAAACAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG	
	consenso	(1751)	TTCTGCAATCCGTGTAAACAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAG	1801 1850
50	I1_rice	(1770)	AAGAGGTCGATTAACCCAGGCGCCACCTTGTGAGATGATGCTGCCACA	
	wt_I47	(1770)	AAGAGGTCGATTAACCCAGGCGCCACCTTGTGAGATGATGCTGCCACA	
55	I1_rice	(1770)	AAGAGGTCGATTAACCCAGGCGCCACCTTGTGAGATGATGCTGCCACA	
	wt_I47	(1770)	AAGAGGTCGATTAACCCAGGCGCCACCTTGTGAGATGATGCTGCCACA	

78
192
154

	I5_rice	(1786)	AAATCTCTCGATACCCCAAGGCGCATCTTGTTCGATATCATCTCCACACA
	, wt_I47	(1801)	AAATCTCTCGATACCCCAAGGCGCATCTTGTTCGATATCATCTCCACACA
	consenso	(1801)	AAATCTCTCGATACCCCAAGGCGCATCTTGTTCGATATCATCTCCACACA
			1851 1900
5	I1_rice	(1820)	CCAGGACCATGTCTTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAGGACA
	I4_rice	(1820)	CCAGGACCATGTCTTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAGGACA
	I5_rice	(1836)	CCAGGACCATGTCTTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAGGACA
	wt_I47	(1851)	CCAGGACCATGTCTTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAGGACA
	consenso	(1851)	CCAGGACCATGTCTTCCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAGGACA
			1901 1950
10	I1_rice	(1870)	TGATCTCGATGGTGTATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	I4_rice	(1870)	TGATCTCGATGGTGTATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	I5_rice	(1886)	TGATCTCGATGGTGTATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	wt_I47	(1901)	TGATCTCGATGGTGTATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
	consenso	(1901)	TGATCTCGATGGTGTATGCCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
			1951 1986
	I1_rice	(1920)	TTCGCAAGCACCAAGCCCGC-----
	I4_rice	(1920)	TTCGCA-----
	I5_rice	(1917)	-----
20	, wt_I47	(1951)	TTCGCAAGCACCAAGCCCGCCTATGTTTACCTGA
	consenso	(1951)	TTCGCAAGCACCAAGCCCGC

24
155

Figura 3

Alineamiento de una secuencia amino ácida de IMINTA 1, IMINTA 4 e IMINTA 5 con secuencias de AHAS del arroz tipo salvaje

			1		50
	I1_rice	(1)	-----	LSAAATATKGGHGHQHEVFFARGGVGAAAVRCSAVSPV	
	I4_rice	(1)	-----	LSAAATATKGGHGHQHEVFFARGGVGAAAVRCSAVSPV	
	I5_rice	(1)	-----	AAAAATLSAAATATKGGHGHQHEVFFARGGVGAAAVRCSAVSPV	
10	rice_wt_I47	(1)	MDTHAAAAATLSAAATATKGGHGHQHEVFFARGGVGAAAVRCSAVSPV		
	consenso	(1)		AAAAATLSAAATATKGGHGHQHEVFFARGGVGAAAVRCSAVSPV	
			51		100
	I1_rice	(40)	TFPSFAPFATFLFPGFAPFPGADILVEALERCGVSDVFAYPGQ	[SMKI	
	I4_rice	(40)	TFPSFAPFATFLFPGFAPFPGADILVEALERCGVSDVFAYPGQ	[SMKI	
15	I5_rice	(46)	TFPSFAPFATFLFPGFAPFPGADILVEALERCGVSDVFAYPGQ	[SMKI	
	rice_wt_I47	(51)	TFPSFAPFATFLFPGFAPFPGADILVEALERCGVSDVFAYPGQ	[SMKI	
	consenso	(51)	TFPSFAPFATFLFPGFAPFPGADILVEALERCGVSDVFAYPGQ	TSMKI	
			101		150
	I1_rice	(90)	HQALATSPVITHELFTHHQGEAFVAAAGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV		
20	I4_rice	(90)	HQALATSPVITHELFTHHQGEAFVAAAGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV		
	I5_rice	(96)	HQALATSPVITHELFTHHQGEAFVAAAGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV		
	rice_wt_I47	(101)	HQALATSPVITHELFTHHQGEAFVAAAGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV		
	consenso	(101)	HQALATSPVITHELFTHHQGEAFVAAAGYARASGRVGVCVATSGPGATHLV		
			151		200
25	I1_rice	(140)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTTHNYLV		
	I4_rice	(140)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTTHNYLV		
	I5_rice	(146)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTTHNYLV		
	rice_wt_I47	(151)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTTHNYLV		
	consenso	(151)	SALADALLDSVFNVAITGQVPRMIGTDAFQETTFIVEVTRSTTHNYLV		
30			201		250
	I1_rice	(190)	DVEDIPNVIQEAFPLASSGRPGFVLNDIPKDIQQQMAVPMOTSEILPGY		
	I4_rice	(190)	DVEDIPNVIQEAFPLASSGRPGFVLNDIPKDIQQQMAVPMOTSEILPGY		
	I5_rice	(196)	DVEDIPNVIQEAFPLASSGRPGFVLNDIPKDIQQQMAVPMOTSEILPGY		
	rice_wt_I47	(201)	DVEDIPNVIQEAFPLASSGRPGFVLNDIPKDIQQQMAVPMOTSEILPGY		
35	consenso	(201)	DVEDIPNVIQEAFPLASSGRPGFVLNDIPKDIQQQMAVPMOTSEILPGY		
			251		300
	I1_rice	(240)	IARLKPFPATELLEQVLELVGSRERFPLYVGGCCSASGDELSEFVELTGI		
	I4_rice	(240)	IARLKPFPATELLEQVLELVGSRERFPLYVGGCCSASGDELSEFVELTGI		
	I5_rice	(246)	IARLKPFPATELLEQVLELVGSRERFPLYVGGCCSASGDELSEFVELTGI		
40	rice_wt_I47	(251)	IARLKPFPATELLEQVLELVGSRERFPLYVGGCCSASGDELSEFVELTGI		
	consenso	(251)	IARLKPFPATELLEQVLELVGSRERFPLYVGGCCSASGDELSEFVELTGI		
			301		350
	I1_rice	(290)	FVTTLMELGHPFEDDFLEMLGHSITVYANYAVDEADLLAFGVFDD		
	I4_rice	(290)	FVTTLMELGHPFEDDFLEMLGHSITVYANYAVDEADLLAFGVFDD		
45	I5_rice	(296)	FVTTLMELGHPFEDDFLEMLGHSITVYANYAVDEADLLAFGVFDD		
	rice_wt_I47	(301)	FVTTLMELGHPFEDDFLEMLGHSITVYANYAVDEADLLAFGVFDD		
	consenso	(301)	FVTTLMELGHPFEDDFLEMLGHSITVYANYAVDEADLLAFGVFDD		
			351		400
	I1_rice	(340)	KVTGKIAFASRAKIVEHIDDPAKIGKHQPHVSCADVKALQGLNALL		
50	I4_rice	(340)	KVTGKIAFASRAKIVEHIDDPAKIGKHQPHVSCADVKALQGLNALL		
	I5_rice	(346)	KVTGKIAFASRAKIVEHIDDPAKIGKHQPHVSCADVKALQGLNALL		
	rice_wt_I47	(351)	KVTGKIAFASRAKIVEHIDDPAKIGKHQPHVSCADVKALQGLNALL		
	consenso	(351)	KVTGKIAFASRAKIVEHIDDPAKIGKHQPHVSCADVKALQGLNALL		
			401		450
55	I1_rice	(390)	DQSTHSSSDPAMNNLDQQGHEVFLGDTFGHILPQTAICVLDLSTK		

194 JB

	I5_rice	(396)	DOSTTSTSSDPEAMSHLDOQHREFFLOTHYFGERIPQYAIQVLDHLEK	
	rice_wt_I47	(401)	DOSTTSTSSDPEAMSHLDOQHREFFLOTHYFGERIPQYAIQVLDHLEK	
	Consensus	(401)	DOSTTSTSSDPEAMSHLDOQHREFFLOTHYFGERIPQYAIQVLDHLEK	500
5	I1_rice	(440)	GHAIATGVVQDQMSAAGYTTTIRFQNLSSAGLGAMGFCLPAAGASVA	
	I4_rice	(440)	GHAIATGVVQDQMSAAGYTTTIRFQNLSSAGLGAMGFCLPAAGASVA	
	I5_rice	(446)	GHAIATGVVQDQMSAAGYTTTIRFQNLSSAGLGAMGFCLPAAGASVA	
	rice_wt_I47	(451)	GHAIATGVVQDQMSAAGYTTTIRFQNLSSAGLGAMGFCLPAAGASVA	
	consenso	(451)	GHAIATGVVQDQMSAAGYTTTIRFQNLSSAGLGAMGFCLPAAGASVA	550
10	I1_rice	(490)	HPGVTVVDIDGDSFLAQHIALIRIRHLPVVMVLSHQHLMGVVQMKD	
	I4_rice	(490)	HPGVTVVDIDGDSFLAQHIALIRIRHLPVVMVLSHQHLMGVVQMKD	
	I5_rice	(496)	HPGVTVVDIDGDSFLAQHIALIRIRHLPVVMVLSHQHLMGVVQMKD	
	rice_wt_I47	(501)	HPGVTVVDIDGDSFLAQHIALIRIRHLPVVMVLSHQHLMGVVQMKD	
15	consenso	(501)	HPGVTVVDIDGDSFLAQHIALIRIRHLPVVMVLSHQHLMGVVQMKD	600
	I1_rice	(540)	HPFKANRANTYLGSPFCESEKTYFDVVTIAGFNLPAVVTIKSEVRAAK	
	I4_rice	(540)	HPFKANRANTYLGSPFCESEKTYFDVVTIAGFNLPAVVTIKSEVRAAK	
	I5_rice	(546)	HPFKANRANTYLGSPFCESEKTYFDVVTIAGFNLPAVVTIKSEVRAAK	
20	rice_wt_I47	(551)	HPFKANRANTYLGSPFCESEKTYFDVVTIAGFNLPAVVTIKSEVRAAK	
	consenso	(551)	HPFKANRANTYLGSPFCESEKTYFDVVTIAGFNLPAVVTIKSEVRAAK	644
	I1_rice	(590)	IMLOTFQFVLLDIIVFQHEVLMIPSGGAFKIMILDGDSFTY	
	I4_rice	(590)	IMLOTFQFVLLDIIVFQHEVLMIPSGGAFKIMILDGDSFTY	
25	I5_rice	(596)	IMLOTFQFVLLDIIVFQHEVLMIPSGGAFKIMILDGDSFTY	
	rice_wt_I47	(601)	IMLOTFQFVLLDIIVFQHEVLMIPSGGAFKIMILDGDSFTY	
	consenso	(601)	IMLOTFQFVLLDIIVFQHEVLMIPSGGAFKIMILDGDSFTY	

796
158

Figura 4 B

Secuencia deducida de longitud completa de amino ácido de AHAS que
confiere la resistencia a la herbicidas de imidazolinona (SEQ ID NO:12)

5 MATTAAAAAALGAAATATGKHHQREHVFAAGHVGAAAVRCSAVSPV
TTPSPAPPATPLRPGAPAFPHGADILVHALERCOVEDVFAITPGOTSMRI
EQALERSFVTEHILFHEHQGEFAASGYARASCHVGVCTATSGGAMLV
SALDALLDSVPMVAITGQVFERMIGTDAFQETPTVEVTERSTIKENYLV
10 DWEDIPKVIQEAFFLASSGEPGVLVDPIDIDQOMAVFVMDTSMELPGY
IARLKKPPAMELLKQVLELVGHEHREPLVVGCCCSAGDELRFVVELTGI
FVITTLMLGSHVPSIDPLSLMLGHEHTTYANYAVDADLLAFGVETD
EVTOKIEAFASNAKIVEHIDGFAKIGHNDQFVEHICADVILALQGHALL
DQSTKPSGDFSAMHMLDQKREHPLGTICFGEHLPQYAIQVLEHETK
15 GHALIATGVGCHQSSAQYTTHEHFAHLSHAGLGAMHFGLPAAAGASVA
HFGVTVVDIDGGSFLAMTQELALIDIELFVKVMVLESQHLGAVVQED
KFKANRAHPLGHEVCEKITYDFVTTAGFNIPAVKVTOKREVNAAIK
KMLDTPGVLLDLIVFQDENVLPIIPSGCAFEDMILDGDGRVY

28
~~197~~
154

FIGURA 5

I	II	III
Iminta 1 no tratado	IRGA 417	Iminta 1 no tratado
Iminta 1 3X	Iminta 1 no tratado	Iminta 1 3X
IRGA 417	Iminta 1 3X	IRGA 417

FIGURA 6

Tratamientos	No de Plantas Promedio/m2 antes de tratamiento	No de Plantas Promedio/m2 después de tratamiento
Iminta 1 3X	171	179
Iminta 1 no tratado	168	164
IRGA 417	150	140

20
588
160

FIGURA 7
RENDIMIENTO DE GRANO 14% DE HUMEDAD

Tratamientos	Rendimiento Promedio de Grano Kg/ha
Iminta 1 3X	3323 a
Iminta 1 prueba	2808 a
IRGA 417	2796 a
1. s.d	763
c. v. %	11.2
p=	0.244

FIGURA 8

Componentes de rendimiento

Tratamientos	Panículas /m2	Peso de 1000 granos	% de perturbación	Espiguillas /panículas	Espiguillas /m2
Iminta 1 3X	453 a	21.7567 a	37.28	59.23 a	26804 a
Iminta 1 prueba	405 ab	21.2567 b	37.05	51.60 b	21145 ab
IRGA 417	307 b	22.1067 a	27.99	62.10 a	19061 b
1. s.d	116	0.4388	14.9	3.29	6889
c. v. %	13.2	0.9	19.2	2.52	13.6
p=	0.057	0.014	0.257	0.002	0.076

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/009641

68

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

161

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/009641

64

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

162

The present invention is directed to plants having increased tolerance to an imidazolinone herbicide. More particularly, the present invention includes rice plants containing at least one variant AHAS nucleic acid such as an imidazolinone tolerant IMINTA 1, 4 or 5 lines comprising an alanine to threonine substitution as compared to the wild-type AHAS. The present invention also includes seeds produced by these rice plants and methods of controlling weeds in the vicinity of these rice plants.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01H5/00 C12N15/29 C12N15/60 C12N9/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/097692 A1 (JANDER GEORG ET AL) 22 May 2003 (2003-05-22) the whole document	1-6, 15-40
X	US 5 013 659 A (BEDBROOK ET AL) 7 May 1991 (1991-05-07) cited in the application column 21, line 60 - column 22, line 17	1-6, 15-40
A	EP 0 461 355 A2 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 18 December 1991 (1991-12-18) the whole document	1-40.
A	WO 01/82685 A1 (AMERICAN CYANAMID COMPANY; PENG, JIANYING; HIRAYAMA, LYNNE; LOCHETTO,) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document	1-40
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2005

Date of mailing of the international search report

10/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Billang, J.



68

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. 16x
A	WO 01/85970 A2 (BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AN) 15 November 2001 (2001-11-15) the whole document	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/009641

65
165

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003097692	A1	22-05-2003	NONE	
US 5013659	A	07-05-1991	US 5605011 A US 5141870 A	25-02-1997 25-08-1992
EP 0461355	A2	18-12-1991	AT 154390 T AU 641496 B2 AU 7605891 A BR 9101864 A CA 2041728 A1 DE 69126474 D1 DE 69126474 T2 DK 461355 T3 ES 2104628 T3 GR 3023764 T3 KR 203387 B1 PT 97590 A , B US 5290753 A ZA 9103510 A	15-06-1997 23-09-1993 14-11-1991 17-12-1991 05-11-1991 17-07-1997 11-12-1997 25-08-1997 16-10-1997 30-09-1997 15-06-1999 28-02-1992 01-03-1994 26-02-1992
WO 0182685	A1	08-11-2001	AU 5920601 A BR 0110410 A CA 2407396 A1 EP 1284597 A1 JP 2003531593 T US 2003167538 A1	12-11-2001 01-07-2003 08-11-2001 26-02-2003 28-10-2003 04-09-2003
WO 0185970	A2	15-11-2001	AU 6135801 A CA 2445398 A1 EP 1280928 A2	20-11-2001 15-11-2001 05-02-2003

68
166

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2004/009841

International filing date (day/month/year)
30.08.2004

Priority date (day/month/year)
29.08.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A01H5/00, C12N15/29, C12N15/60, C12N9/88

Applicant
BASF AKTIENGESELLSCHAFT

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Bilang, J

Telephone No. +49 89 2399-8707



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/009641

69
167

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/009641

168

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-14, 18-40
	No: Claims	15-17
Inventive step (IS)	Yes: Claims	7-14
	No: Claims	1-6, 15-40
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-40
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

1. The present application discloses a rice mutant resistant to imidazolinone herbicides due to a mutation in the acetohydroxyacid synthase (AHAS; also known as acetolactate synthase) at amino acid position 96.
2. The rice plant of claim 1 does not need to be transgenic for all cells and plant tissues. Claims 15 to 17 thus embrace wild-type plant parts and therefore lack novelty (Article 33(2) PCT).
3. D1 (US 2003/0097692) discloses a mutated Arabidopsis AHAS having resistance to imidazolinone herbicides. The AHAS is mutated at position 122, which was known to be conserved between different AHAS and to be involved in herbicide sensitivity (see also D2: US 5,013,659, passage bridging col. 21 and 22). One of the specific mutations is from alanine to threonine. Position 122 of the Arabidopsis AHAS corresponds to position 96 of the rice enzyme.
4. The subject-matter of claims 1-6 and 15-40 is not considered to be based on an inventive activity (Article 33(3) PCT). It was known that the amino acid corresponding to amino acid 96 of the rice AHAS was involved in susceptibility to herbicides. Position 96 thus was an obvious choice for the skilled person who wanted to create a AHAS which is resistant to imidazolinone herbicides. It does not require inventive activity to repeat the disclosure of D1 with AHAS isolated from another source.
5. It should furthermore be noted that the subject-matter of claim 1 is not considered to be supported over its entire range. The claim embraces any mutation in the numerous alanine residues. The application, however, only discloses one mutation at a specific position.

The same argument applies to claim 7. The application only discloses one specific mutant.

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ EP

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference M/46152-PCT
International application No. PCT/EP2004/009641	International filing date (day/month/year) 30 August 2004	(Earliest) Priority date (day/month/year) 29 August 2003
Title of invention RICE PLANTS HAVING INCREASED TOLERANCE TO IMIDAZOLINONE HERBICIDES		
Box No. II APPLICANT(S)		
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) BASF Aktiengesellschaft D-67056 Ludwigshafen		Telephone No.
		Facsimile No.
		Teleprinter No.
		Applicant's registration No. with this Office
State (that is, country) of nationality: DE		State (that is, country) of residence: DE
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) LIVORE, Alberto, B. Dr. Scelzi 275/7 Concepcion del Uruguay 3260 Entre Rios Argentina		
State (that is, country) of nationality: AR		State (that is, country) of residence: AR
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) PRINA, Alberto, R. Calle 18 No. 328 Mercedes, 6600 Pcia. de Buenos Aires Argentina		
State (that is, country) of nationality: AR		State (that is, country) of residence: AR
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.		

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BIRK, Iwona
2608 Sunnystone Way
Raleigh
NC 27613
USA

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SINGH, Bijay
301 Connemara Drive
Cary
NC 27519
USA

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☐ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☒ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)Reitstötter, Kinzbach & Partner (GbR)
Patent Attorneys
Sternwartstraße 4
D-81679 Munich

Telephone No.

+49 (0) 89 9983970

Facsimile No.

+49 (0) 89 987304

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

Reitstötter-Kinzbach(Z.217)

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☐ the international application as originally filedthe description ☒ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☒ as amended under Article 34the drawings ☒ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: english

☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | | |
|--|---|-------|--------|
| 1. translation of international application | : | _____ | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | 9 | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 5. letter | : | 4 | sheets |
| 6. other (specify) Marked-up version of the claims | : | 10 | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received	not received
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing |
| 4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any: AV 35036 | 8. ☐ other (specify): _____ |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Munich, June 29, 2005



Dr. Thomas Wolter

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPRA on:

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To: WOLTER, Thomas Reitschötter, Kinzbach & Partner (G) Sternwartstr. 4 81679 München ALLEMAGNE		Patentanwälte Reitschötter, Kinzbach & Part. Eing. 04. Nov. 2005 Sternwartstr. 4 81679 München	PCT 174 NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (PCT Rule 71.1)
Applicant's or agent's file reference 0000055841 MH6152-PCT		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/EP2004/009841	International filing date (day/month/year) 30.08.2004	Priority date (day/month/year) 29.08.2003	
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.			

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the International preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER.**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/AB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office
 D-80298 Munich
 Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523656 epmu d
 Fax +49 89 2369 - 4485

Authorized Officer

Böckler, S

Tel. +49 89 2369-8080





PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000055841	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA18	
International application No. PCT/EP2004/009841	International filing date (day/month/year) 30.08.2004	Priority date (day/month/year) 29.08.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01H5/00, C12N15/29, C12N15/80, C12N9/88		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of 9 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 29.08.2005	Date of completion of this report 31.10.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80289 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523658 apmu d Fax: +49 89 2369 - 4465	Authorized Officer Bilang, J Telephone No. +49 89 2369-8707 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

176 78
International application No.
PCT/EP2004/009641

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

1-46 received on 29.08.2005 with letter of 29.08.2005

Drawings, Sheets

1/21-21/21 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-48
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	6-13, 23-30, 48
	No: Claims	1-5, 14-22, 31-45
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-48
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

128 #7828
International application No.
PCT/EP2004/009641

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing:

- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☒ received by this Authority as an amendment on

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional observations, if necessary:

1. The present application discloses a rice mutant resistant to imidazolinone herbicides due to a mutation in the acetohydroxyacid synthase (AHAS; also known as acetolactate synthase) at amino acid position 96.
2. D1 (US 2003/0097892) discloses a mutated Arabidopsis AHAS having resistance to imidazolinone herbicides. The AHAS is mutated at position 122, which was known to be conserved between different AHAS and to be involved in herbicide sensitivity (see also D2: US 5,013,659, passage bridging col. 21 and 22). One of the specific mutations is from alanine to threonine. Position 122 of the Arabidopsis AHAS corresponds to position 96 of the rice enzyme.
3. The subject-matter of claims 1-5, 14-22, and 31-45 is not considered to be based on an inventive activity (Article 33(3) PCT).

It was known that amino acid residue 122 of the Arabidopsis AHAS protein was involved in susceptibility to herbicides. Amino acid residue 122 of Arabidopsis corresponds to amino acid position 96 of the rice AHAS. Position 96 thus was an obvious choice for the skilled person who wanted to create a AHAS which is resistant to imidazolinone herbicides. It does not require inventive activity to repeat the disclosure of D1 with AHAS isolated from another source.

4. The applicant argued that it was not possible to conclude from D1 or D2 that a mutation at position 96 of the rice AHAS would result in a herbicide tolerant phenotype.
This authority is not convinced by the arguments of the applicant. A simple sequence comparison between the known AHAS proteins of Arabidopsis and rice indicates that the two enzymes are well conserved in their primary structure. The skilled person thus would expect that a mutation at positions corresponding to position 122 of the Arabidopsis AHAS would result in a herbicide tolerant enzyme.
It should be noted that position 122 of the Arabidopsis AHAS was even predicted to be involved in herbicide sensitivity based on theoretical considerations (D2). The confirmation of these considerations by D1 would suggest to the skilled person that this (conserved) position is involved in sensitivity to herbicides in other plant species as well.

18088

CLAIMS

We Claim:

1. A rice plant comprising a variant AHAS nucleic acid, wherein the variant AHAS nucleic acid confers upon the plant increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant, wherein the variant AHAS nucleic acid encodes a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide and wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 96 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12.
2. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5;
 - (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
 - (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
 - (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.
3. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:1.
4. The rice plant of claim 1, wherein the at least one variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:3.

181 23

5. The rice plant of claim 1, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:5.
6. The rice plant of claim 1, wherein the plant is not transgenic.
7. The rice plant of claim 6, wherein the plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or is a recombinant or genetically engineered derivative of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or of any progeny of the plant of Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or is a plant that is a progeny of any of these plants.
8. The rice plant of claim 6, wherein the plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208, or is a progeny of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
9. The rice plant of claim 6, wherein the plant has the herbicide tolerance characteristics of the plant with a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
10. The rice plant of claim 6, wherein the rice plant has a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208.
11. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is selected from the group consisting of 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolinecarboxylic acid, 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic acid, and a mixture of

182 88

methyl 6-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluate and methyl 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluate.

12. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid.

13. The rice plant of claim 1, wherein the imidazolinone herbicide is 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid.

14. A plant part of the rice plant of claim 1, wherein the plant part comprises the variant AHAS nucleic acid.

15. A plant cell of the rice plant of claim 1, wherein the plant cell comprises the variant AHAS nucleic acid.

16. A seed produced by the rice plant of claim 1, wherein seed plant part comprises the variant AHAS nucleic acid.

17. The seed of claim 16, wherein the seed contains the variant AHAS nucleic acid and wherein the seed is true breeding for an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant seed.

18. The rice plant of claim 1, wherein the plant is transgenic.

19. The transgenic rice plant of claim 18, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5;
- (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6;

- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
- (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
- (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.

20. The rice plant of claim 18, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:1.

21. The rice plant of claim 18, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:3.

22. The rice plant of claim 18, wherein the variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence as defined in SEQ ID NO:5.

23. A rice plant having the herbicide tolerance characteristics of the plant with a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208, and wherein the plant is selected from the group consisting of:

- (a) a plant having a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208;
- (b) a plant that is a recombinant or genetically engineered derivative of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208;
- (c) any progeny of the plant of Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or
- (d) a plant that is a progeny of any of the plants of the plants of (a) through (c).

24. The rice plant of claim 23, wherein the imidazolinone herbicide is selected from the group consisting of 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidiazolin-2-yl)-

184

nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolinecarboxylic acid, 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid, 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic acid, and a mixture of methyl 6-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluate and methyl 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluate.

25. The rice plant of claim 23, wherein the imidazolinone herbicide is 5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid.

26. The rice plant of claim 23, wherein the imidazolinone herbicide is 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(methoxymethyl)-nicotinic acid.

27. A plant part of the rice plant of claim 23, wherein the plant part comprises the variant AHAS nucleic acid.

28. A plant cell of the rice plant of claim 23, wherein the plant cell comprises the variant AHAS nucleic acid.

29. A seed produced by the rice plant of claim 23, wherein seed plant part comprises the variant AHAS nucleic acid.

30. The seed of claim 29, wherein the seed contains the variant AHAS nucleic acid and wherein the seed is true breeding for an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the rice plant seed.

31. An isolated AHAS nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
- (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;

(c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6;

(d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;

(e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and

(f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above,

wherein the isolated AHAS nucleic acid encodes an AHAS polypeptide conferring increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type AHAS polypeptide.

32. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1.

33. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:3.

34. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:5.

35. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2.

36. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4.

37. The isolated AHAS nucleic acid of claim 31, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:6.

186 88

38. An isolated AHAS polypeptide, wherein the polypeptide is selected from the group of polypeptide sequences as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, and SEQ ID NO:12, wherein the polypeptide confers increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type AHAS polypeptide.

39. The isolated AHAS polypeptide of claim 38, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2.

40. The isolated AHAS polypeptide of claim 38, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:4.

41. The isolated AHAS polypeptide of claim 38, wherein the polypeptide comprises a polypeptide as defined in SEQ ID NO:6.

42. A method of controlling weeds within the vicinity of a rice plant, comprising applying an imidazolinone herbicide to the weeds and the plant, wherein the plant has increased tolerance to the imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant, wherein the plant comprises a variant AHAS nucleic acid encoding a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide and wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 96 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12.

43. The method of claim 42, wherein the variant AHAS nucleic acid is selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
- (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6;

187 87

- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
- (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
- (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.

44. A method of producing a transgenic plant having increased tolerance to an imidazolinone herbicide comprising,

- (a) transforming a plant cell with one or more expression vectors comprising at least one variant AHAS nucleic acid encoding a variant AHAS polypeptide comprising an alanine to threonine substitution as compared to a wild-type AHAS polypeptide, wherein the alanine to threonine substitution corresponds to position 96 of the AHAS amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:12.; and
- (b) generating from the plant cell a transgenic plant with an increased tolerance to an imidazolinone herbicide as compared to a wild-type variety of the plant.

45. The method of Claim 44, wherein the at least one variant AHAS nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5;
- (b) a polynucleotide as defined in SEQ ID NO:11;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide as defined in SEQ ID NO:12;
- (e) a polynucleotide comprising at least 60 consecutive nucleotides of any of a) through d) above; and
- (f) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of any of a) through e) above.

46. A method of controlling weeds within the vicinity of a rice plant, comprising applying an imidazolinone herbicide to the weeds and the plant, wherein the plant comprises the herbicide tolerance characteristics of the plant with a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208, and wherein the plant is selected from the group consisting of:

- (a) a plant having a Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208;
- (b) a plant that is a recombinant or genetically engineered derivative of the plant with Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208;
- (c) any progeny of the plant of Patent Deposit Designation Number NCIMB 41206, NCIMB 41207, or NCIMB 41208; or
- (d) a plant that is a progeny of any of the plants of the plants of (a) through (c).

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA EFECTUAR

EXAMEN DE PATENTABILIDAD

JED

190

**SOBRE ESTAS REIVINDICACIONES SE DEBE HACER EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD**

1. Una planta de arroz que incluye una variante de ácido nucleico de AHAS, donde la variante de ácido nucleico de AHAS le confiere a la planta una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación a la de una variedad de la planta del tipo salvaje. Donde la variante de ácido nucleico de AHAS codifica una variante de polipéptido de AHAS que incluye una sustitución de una alanina a treonina en comparación al polipéptido de AHAS del tipo salvaje y en donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en SEQ ID NO:12.
2. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de:
 - (a) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleotóido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a). hasta (d) anteriores; y

191 22

(f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (e) anteriores.

3. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:1.
4. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde al menos una variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:3.
5. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:5.
6. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la planta no es trasgénica.
7. La planta de arroz de la reivindicación 6, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o es un recombinado o un derivado genéticamente ingeniado de un planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o de cualquier progenie de la planta de Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o es una planta que es una progenie de cualquiera de estas plantas.
8. La planta de arroz de la reivindicación 6, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208; o es una progenie de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208.
9. La planta de arroz de la reivindicación 6, donde la planta tiene las características de tolerancia a herbicida de la planta con un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208.

10. La planta de arroz de la reivindicación 6, donde la planta tiene un Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208.
11. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es seleccionado de un grupo consistente de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico; ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-3-quinolinocarboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-metilnicotínico y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-m-toluate y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolinona-2-yl)-p-toluate.
12. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico.
13. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-(metoximetil)-nicotínico.
14. Una parte de la planta de arroz de la reivindicación 1, donde la parte de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
15. Una célula de la planta de arroz de la reivindicación 1, donde la célula de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
16. Una semilla producida por la planta de arroz de la reivindicación 1, donde la semilla de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
17. La semilla de la reivindicación 16, donde la semilla contiene la variante de ácido nucleico de AHAS y donde la semilla es una cría verdadera para una mayor tolerancia a un

193 ~~84~~

herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de la semilla de la planta de arroz de tipo salvaje.

18. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde la planta es trasgénica.
19. La planta trasgénica de arroz de la reivindicación 18, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de:
 - (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.
20. La planta de arroz de la reivindicación 18, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:1.
21. La planta de arroz de la reivindicación 18, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:3.
22. La planta de arroz de la reivindicación 18, donde la variante de ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida como se define en SEQ ID NO:5.

144 25

23. Una planta de arroz que presenta la característica de tolerancia a herbicidas que presenta la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208 y en donde la planta se escoge de un grupo que consiste de:
- a) la planta que presenta Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208
 - b) Una planta que es el recombinante o el derivado genético de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208
 - c) Cualquier progenie de la planta que presenta Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208; o
 - d) La planta que es progenie de cualquiera de las plantas de a) a c)
24. La planta de arroz de la reivindicación 1, donde el herbicida de imidazolinona es seleccionado de un grupo consistente de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico; ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-3-quinolinocarboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-metilnicotínico y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-m-toluate y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolinona-2-yl)-p-toluate.
25. La planta de arroz de la reivindicación 23, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-nicotínico.
26. La planta de arroz de la reivindicación 23, donde el herbicida de imidazolinona es ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidiazolina-2-yl)-5-(metoximetil)-nicotínico.

27. Una parte de la planta de arroz de la reivindicación 2, donde la parte de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
28. Una célula de la planta de arroz de la reivindicación 23, donde la célula de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
29. Una semilla producida por la planta de arroz de la reivindicación 23, donde la semilla de la planta presenta la variante de ácido nucleico de AHAS.
30. La semilla de la reivindicación 29, donde la semilla contiene la variante de ácido nucleico de AHAS y donde la semilla es una cría verdadera para una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de la semilla de la planta de arroz de tipo salvaje.
31. Un ácido nucleico de AHAS aislado , donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido seleccionado de un grupo integrado por:
 - (a) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleotóido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

146 ~~28~~

Donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido de AHAS que confiere una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación a un polipéptido de AHAS de tipo salvaje.

32. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1.
33. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:3.
34. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:5.
35. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2.
36. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:4.
37. El ácido nucleico de AHAS aislado de la reivindicación 31, donde el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:6.
38. Un polipéptido de AHAS aislado, donde el polipéptido es seleccionado de un grupo de secuencia de polipéptido como se definen en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:12, donde el polipéptido confiere una mayor tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación al polipéptido de AHAS del tipo salvaje.
39. El polipéptido aislado de la reivindicación 38, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2.
40. El polipéptido aislado de la reivindicación 38, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:4.

197 ~~28~~

41. El polipéptido aislado de la reivindicación 38, donde el polipéptido incluye un polipéptido como se define en SEQ ID NO:6.
42. Un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende la aplicación de herbicida de imidazolinona a la maleza y a la planta, donde la planta tiene una mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona en comparación a una variedad de la planta del tipo salvaje, donde la planta incluye una variedad de ácido nucleico de AHAS que codifica una variedad de polipéptido de AHAS que incluye una sustitución de alanina a treonina en comparación con el polipéptido de AHAS de tipo salvaje, y donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de la secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en SEQ ID NO:12.
43. El método de la reivindicación 42, donde la variedad de ácido nucleico de AHAS es seleccionada de un grupo integrado por:
- (a) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
 - (b) un polinucleótido como se define en SEQ ID NO:11;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
 - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
 - (e) un polinucleótido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
 - (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores.

148 22

44. Un método de producir una planta trasgénica que tiene una tolerancia al herbicida de imidazolinona incrementada que comprende

- a) Transformar una célula de la planta con uno o mas vectores de expresión que incluyen al menos una variedad de ácido nucleico que codifica una variedad del polipéptido de AHAS que incluye una sustitución alanina a treonina en comparación con un polipéptido de AHAS del tipo salvaje; y donde la sustitución de alanina a treonina corresponde a la posición 96 de una secuencia de amino ácido de AHAS como se muestra en la SEQ ID NO:12; y
- (b) Generar a partir de la célula de la planta una planta trasgénica con una tolerancia a un herbicida de imidazolinona incrementada en comparación a una variedad de la planta del tipo salvaje.

45. El método de la reivindicación 44, donde al menos una variedad del ácido nucleico de AHAS incluye una secuencia polinucleótida seleccionada de un grupo consistente de :

- (a) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO: 5;
- (b) un polinucleotóido como se define en SEQ ID NO:11;
- (c) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO: 6;
- (d) un polinucleotóido que codifica un polipéptido como se define en SEQ ID NO:12;
- (e) un polinucleotóido que incluye al menos 60 nucleótidos consecutivos en cualquiera de hasta (a) hasta (d) anteriores; y
- (f) un polinucleótido complementario al polinucleótido de cualquiera de hasta (a) hasta (e) anteriores.

199 ~~200~~

46. Un método para controlar malezas dentro de la vecindad de una planta de arroz, que comprende la aplicación de herbicida de imidazolinona a la maleza y a la planta, donde la planta tiene una mayor tolerancia al herbicida de imidazolinona característico de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207, o NCIBM 41208, y donde la planta es seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la planta que presenta Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208
- b) una planta que es el recombinante o el derivado genético de la planta con Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208
- c) cualquier progenie de la planta que presenta Número de Designación de Depósito de Patente NCIBM 41206, NCIBM 41207 o NCIBM 41208; o
- d) la planta que es progenie de cualquiera de las plantas de a) a c).

FCC//ID-000004/WPC15245
Cns C-2006-00002869

~~200~~
200
201

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 06030120 00000000 Folios: 201
Fecha (AMD): 2006-03-27 17:34:41
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 17,874
FECHA : MARZO 6 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49935720	06/03/2006	33,816,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 15245-841-0015



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

201

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION (x)	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Descripción de la invención.	()	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

[Firma]
marzo 27 de 2006.