



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0618382-4 A2**

(22) Data de Depósito: 09/11/2006
(43) Data da Publicação: 30/08/2011
(RPI 2121)



(51) Int.Cl.:

C12N 15/60
C12N 15/82
C12N 9/88
A01H 5/00
A01H 5/10

(54) Título: **MÉTODOS PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE AHAS EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA MELHORAR A TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA TOLERANTE A HERBICIDA, PARA SELECIONAR UMA CÉLULA DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, CASSETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 09/11/2005 US 60/735045

(73) Titular(es): Advanta Seeds, B.V., Basf Agrochemical Products B.V.

(72) Inventor(es): Alberto Javier Leon, Christine Olungu, Monica Mariel Morata

(74) Procurador(es): MOMSEN LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006068321 de 09/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/054555 de 18/05/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE ABAS EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA MELHORAR A TOLERANCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA TOLERANTE A HERBICIDA, PARA SELECIONAR UMA CÉLULA DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, CAS SETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO. Plantas de girassol resistentes a herbicida, polinucleotídeos isolados que codificam polipeptídeos de subunidade grande de ácido aceto-hidróxi sintase (AI-IASL), resistentes a herbicida e de tipo selvagem, e as sequências de aminoácido destes polipeptídeos são descritas. Os cassetes de expressão e vetores de transformação compreendendo os polinucleotídeos da invenção, assim como plantas e células hospedeiras transformadas com os polinucleotídeos, são descritos. Os métodos de usar os polinucleotídeos para melhorar a resistência de plantas a herbicidas, e métodos para controlar ervas daninhas na proximidade das plantas resistentes a herbicidas são também descritos.

“MÉTODOS PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE AHAS EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA MELHORAR A TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA TOLERANTE A HERBICIDA, PARA SELECIONAR UMA CÉLULA DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, CASSETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo de biotecnologia agrícola, particularmente à plantas de girassol resistentes a herbicida e novas seqüências de polinucleotídeo que codificam proteínas da grande subunidade de sintase de acetohidróxi ácido de girassol resistente a herbicida.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A sintase de acetohidróxi ácido (AHAS; EC 4.1.3.18, também conhecida como sintase de acetolactato ou ALS), é a primeira enzima que catalisa a síntese bioquímica de aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine," em *Plant Amino Acid*, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. Nova Iorque, Nova Iorque, páginas 227-247). A AHAS é o local de ação de cinco famílias de herbicida estruturalmente diversas, incluindo as sulfoniluréias LaRossa e Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2: 158-161), as imidazolinonas (Shaner e colaboradores (1984) *Plant Physiol.* 76: 545-546), as

triazolopirimidinas (Subramanian e Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines", em *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J.R. e Sonnet, P.E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D. C, páginas 277-288) e os

5 pirimidilóxibenzoatos (Subramanian e colaboradores (1990) *Plant Physiol.* 94: 239-244). Herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia são amplamente usados em agricultura moderna em virtude de sua eficácia em taxas de aplicação muito baixas e não-toxicidade relativa em animais. Inibindo a

10 atividade de AHAS, essas famílias de herbicidas impedem crescimento e desenvolvimento adicionais de plantas suscetíveis, incluindo muitas espécies de ervas daninhas. Vários exemplos de herbicidas de imidazolinona comercialmente disponíveis são PURSUIT® (imazethapyr), SCEPTER® (imazaquin) e ARSENAL® (imazapyr). Exemplos de herbicidas de

15 sulfoniluréia são chlorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, chlorimuron etila, thifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, ethametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron etila e halosulfuron.

Em virtude de sua eficácia e baixa toxicidade, herbicidas de

20 imidazolinona são favorecidos para aplicação através de pulverização por cima de uma ampla área de vegetação. A capacidade de pulverizar um herbicida por cima de uma ampla faixa de vegetação diminui os custos associados ao estabelecimento e manutenção da planta e diminui a necessidade de preparo do local antes de uso de tais produtos químicos.

25 Pulverização por cima de uma espécie tolerante desejada também resulta na capacidade de obter um potencial de rendimento máximo das espécies desejadas em virtude da ausência de espécies competitivas. Contudo, a capacidade de usar tais técnicas de pulverização aérea é dependente da presença de espécies resistentes à imidazolinona da vegetação desejada na

área de pulverização aérea.

Dentre as principais safras agrícolas, algumas espécies leguminosas, tal como soja, são naturalmente resistentes a herbicidas de imidazolinona em virtude de sua capacidade de metabolizar rapidamente os compostos herbicidas (Shaner e Robinson (1985) *Weed Sci.* 33: 469-471). Outras safras, tais como milho (Newhouse e colaboradores (1992) *Plant Physiol.* 100: 882-886) e arroz (Barrett e colaboradores (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, Nova Iorque, páginas 195-220) são um tanto suscetíveis a herbicidas de imidazolinona. A sensibilidade diferencial aos herbicidas de imidazolinona é dependente da natureza química do herbicida em particular e do metabolismo diferencial do composto de uma forma tóxica para uma não-tóxica em cada planta (Shaner e colaboradores (1984) *Plant Physiol.* 76: 545-546; Brown e colaboradores, (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* 27: 24-29). Outras diferenças fisiológicas da planta, tais como absorção e translocação, também exercem um papel importante na sensibilidade (Shaner e Robinson (1985) *Weed Sci.* 33: 469-471).

Plantas resistentes à imidazolinonas, sulfoniluréia, triazolopirimidinas e pirimidilóxi benzoatos foram produzidas com sucesso usando mutagênese de semente, micrósporo, pólen e caule em *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (isto é, canola) *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, beterraba sacarínica (*Beta vulgaris*) e *Oryza sativa* (Sebastian e colaboradores (1989) *Crop Sci.* 29: 1403-1408; Swanson e colaboradores, 1989 *Theor. Appl. Genet.* 78: 525-530; Newhouse e colaboradores (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83: 65-70; Sathasivan e colaboradores (1991) *Plant Physiol.* 97: 1044-1050; Mourand e colaboradores (1993) *J Heredity* 84: 91-96; Wright e Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 612-620; Patente U.S. 5.545.822). Em todos os casos, um único gene nuclear parcialmente dominante conferia resistência. Quatro plantas de trigo resistentes à imidazolinona foram também anteriormente isoladas após mutagênese de

semente de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse e colaboradores (1992) *Plant Physiol.* 100: 882-886). Estudos de hereditariedade confirmaram que um único gene parcialmente dominante conferia resistência. Baseado em estudos alélicos, os autores concluíram que as mutações nas quatro linhagens identificadas estavam localizadas no mesmo *locus*. Um dos genes de resistência no cultivar Fidel foi designado FS-4 (Newhouse e colaboradores (1992) *Plant Physiol.* 100: 882-886).

Populações de plantas que ocorrem naturalmente que foram descobertas ser resistentes a herbicidas de imidazolinona e/ou sulfoniluréia também têm sido usadas para desenvolver linhagens de cultivo de girassol resistentes a herbicida. Recentemente, duas linhagens de girassol que são resistentes a um herbicida de sulfoniluréia foram desenvolvidas usando germplasma originário de uma população silvestre de girassol comum (*Helianthus annuus*) como a fonte do traço de resistência a herbicida (Miller e Al-Khatib (2004) *Crop Sci.* 44: 1037-1038). Anteriormente, White e colaboradores ((2002) *Weed Sci.* 50: 432-437) tinham reportado que indivíduos de uma população silvestre de girassol comum de Dakota do Sul, E.U.A., tinham resistência cruzada a um herbicida de imidazolinona e um de sulfoniluréia. Análise de uma porção da região de codificação dos genes da grande subunidade de sintase de acetohidróxi ácido (AHASL) de indivíduos dessa população revelou uma mutação de ponto que resulta em uma substituição de aminoácido Ala para Val na proteína de AHASL de girassol que corresponde aAla₂₀₅ na proteína de AHASL de *Arabidopsis thaliana* do tipo silvestre (White e colaboradores (2003) *Weed Sci.* 51: 845-853).

Modelamento baseado em computador da conformação tridimensional do complexo AHAS-inibidor prevê vários aminoácidos na bolsa de ligação do inibidor proposto como sítios onde mutações induzidas provavelmente confeririam resistência seletiva à imidazolinonas (Ott e colaboradores (1996) *J Mol. Biol.* 263: 359-368). Plantas de trigo produzidas

com algumas dessas mutações racionalmente projetadas nos sítios de ligação propostos da enzima AHAS, na verdade, exibiram resistência específica a uma única classe de herbicidas (Ott e colaboradores (1996) *J Mol. Biol.* 263: 359-368).

5 Resistência de plantas a herbicidas de imidazolinona também foi reportada em uma série de patentes. As Patentes U.S. 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 e 6.222.100 descrevem, de modo geral, o uso de um gene de AHAS alterado para estimular resistência a herbicida em plantas e, especificamente, divulgam determinadas linhagens de
10 milho resistentes à imidazolinona. A Patente U.S. 5.013.659 divulga plantas exibindo resistência a herbicida em virtude de mutações em pelo menos um aminoácido em uma ou mais regiões conservadas. As mutações descritas aqui codificam resistência cruzada a imidazolinonas e sulfoniluréias ou resistência sulfoniluréia-específica, mas resistência imidazolinona-específica não é
15 descrita. A Patente U.S. 5.731.180 e Patente U.S. 5.767.361 divulgam um gene isolado tendo uma única substituição de aminoácido em uma sequência de aminoácido de AHAS de monocot do tipo silvestre que resulta em resistência imidazolinona-específica. Além disso, plantas de arroz que são resistentes a herbicidas que interferem com AHAS foram desenvolvidas
20 através de criação de mutação e também através da seleção de plantas resistentes a herbicida a partir de um acervo de plantas de arroz produzidas através de cultura de antera. Veja Patentes U.S. 5.545.822, 5.736.629, 5.773.703, 5.773.704, 5.952.553 e 6.274.796.

 Em plantas, como em todos os outros organismos examinados,
25 a enzima AHAS é compreendida de duas subunidades: uma grande subunidade (papel catalítico) e uma pequena subunidade (papel regulatório) (Duggleby e Pang (2000) *J Biochem. Mol. Biol.* 33: 1-36). A grande subunidade da AHAS (também referida aqui como AHASL) pode ser codificada por um único gene conforme no caso de *Arabidopsis*, arroz e

beterraba sacarínica ou através de múltiplos membros da família do gene, conforme em milho, canola e algodão. Substituições específicas de um único nucleotídeo na grande subunidade conferem à enzima um grau de insensibilidade a uma ou mais classes de herbicidas (Chang e Duggleby
5 (1998) *Biochem J.* 333: 765-777).

Por exemplo, trigo para pão, *Triticum aestivum* L., contém três genes da grande subunidade de sintase de acetohidróxi ácido homólogos. Cada um dos genes exibe expressão significativa baseado na resposta ao herbicida e dados bioquímicos de mutantes em cada um dos três genes
10 (Ascenzi e colaboradores (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, Espanha, Ref. No. S10-17). As seqüências de codificação de todos os três genes compartilham homologia extensiva a nível de nucleotídeo (WO 03/014357). Através de seqüenciamento dos genes *AHASL* de diversas variedades de *Triticum aestivum*, descobriu-se que a base
15 molecular de tolerância a herbicida na maioria das linhagens IMI-tolerantes (imidazolinona-tolerantes) é a mutação S653(*At*)N, indicando uma substituição de serina para asparagina em uma posição equivalente ao aminoácido serina 653 em *Arabidopsis thaliana* (WO 03/01436; WO 03/014357). Essa mutação é em virtude de um polimorfismo de um único
20 aminoácido (SNP) na seqüência de DNA que codifica a proteína de AHASL.

Múltiplos genes *AHASL* também são conhecidos por ocorrer em espécies de plantas dicotiledôneas. Recentemente, Kolkman e colaboradores ((2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159) reportaram a identificação, clonagem e seqüenciamento de três genes *AHASL* (*AHASL1*,
25 *AHASL2* e *AHASL3*) de genótipos do tipo silvestre e resistentes a herbicida de girassol (*Helianthus annuus* L.). Kolkman e colaboradores reportaram que a resistência a herbicida era em virtude da substituição Pro197Leu (usando a nomenclatura da posição de aminoácido de AHASL de *Arabidopsis*) ou a substituição Ala205Val na proteína de AHASL1 e que cada uma dessas

substituições proporcionava resistência a herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

5 Dada sua alta eficácia e baixa toxicidade, herbicidas de imidazolinona são favoráveis para uso agrícola. Contudo, a capacidade de usar herbicidas de imidazolinona em um sistema de produção de safra em particular depende da disponibilidade de variedades imidazolinona-resistentes da planta de safra de interesse. Para produzir tais variedades resistentes à imidazolinona, os produtores de plantas precisam desenvolver linhagens de cultivo com o traço de resistência à imidazolinona. Assim, linhagens de
10 cultivo resistentes à imidazolinona adicionais e variedades de plantas de safra, bem como métodos e composições para a produção e uso de linhagens de cultivo e variedades resistentes à imidazolinona são necessárias.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 A presente invenção proporciona plantas de girassol tendo resistência aumentada a herbicidas quando comparado com uma planta de girassol do tipo silvestre. Em particular, as plantas de girassol d antígeno têm resistência aumentada a herbicidas de imidazolinona quando comparado com uma planta de girassol do tipo silvestre. As plantas de girassol resistentes a herbicida da invenção compreendem pelo menos uma cópia de um gene ou
20 polinucleotídeo que codifica uma grande subunidade de sintase de acetohidróxi ácido (AHASL) resistente a herbicida. Tal proteína de AHASL resistente a herbicida compreende uma isoleucina na posição de aminoácido 188 ou posição equivalente. A planta de girassol resistente a herbicida da invenção pode conter uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais cópias de
25 um gene ou polinucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida da invenção. as plantas de girassol da invenção também incluem sementes e plantas de prole que compreendem pelo menos uma cópia de um gene ou polinucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida da invenção.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona plantas de girassol resistentes a herbicida que são da linhagem de girassol que foi designada como MUT9. Uma amostra de sementes da linhagem MUT9 foi depositada na American Type Culture Collection (ATCC) como No. de Depósito de Patente ATCC No. PTA-6325. Tais plantas de girassol MUT9 compreendem, em seus genomas, um gene AHASL1 que compreende a sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:1 e que codifica a proteína de AHASL1 compreendendo a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO:2. Quando comparado com a sequência de aminoácido da proteína de AHASL1 (SEQ ID NO:4) que é codificada por um gene AHASL1 (SEQ ID NO:3) de uma planta de girassol do tipo silvestre, a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO:2 tem uma única diferença de aminoácido com relação à sequência de aminoácido do tipo silvestre. Na sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO:2, há uma isoleucina na posição de aminoácido 102. Essa posição corresponde à posição 188 na proteína de AHASL1 de girassol de comprimento total codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:24 (No. de Acesso AY541451). Na sequência de aminoácido de AHASL1 do tipo silvestre da invenção (SEQ ID NO:4), essa posição de aminoácido equivalente tem uma treonina. A menos que de outro modo indicado, as posições de aminoácido mencionadas aqui para proteínas de AHASL de girassol correspondem às posições de aminoácido da sequência de aminoácido de comprimento total apresentada em SEQ ID NO:24.

A presente invenção ainda proporciona polinucleotídeos isolados e polipeptídeos isolados para proteínas de AHASL de girassol (*Helianthus annuus*). Os polinucleotídeos da invenção abrangem sequências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL do tipo silvestre e resistentes a herbicida incluindo, mas não limitado a, proteínas codificadas pelos genes *AHASL1*, *AHASL2* e *AHASL3* de girassol. As proteínas de

AHASL de girassol resistentes a herbicida da invenção são proteínas de AHASL resistentes à imidazolinona que compreendem um outro aminoácido que não treonina na posição 188 de uma proteína de AHASL1 de girassol do tipo silvestre ou posição equivalente. De preferência, o aminoácido na posição 188 ou posição equivalente é uma isoleucina. Os polinucleotídeos da invenção abrangem as seqüências de nucleotídeo apresentadas em SEQ ID NOs: 1 e 3, seqüências de nucleotídeo que codificam as seqüências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 4 e fragmentos e variantes das referidas seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas compreendendo atividade de AHAS.

A presente invenção proporciona cassetes de expressão para expressão dos polinucleotídeos da invenção em plantas, células de planta e outras células hospedeiras não-humanas. Os cassetes de expressão compreendem um promotor passível de expressão na planta, célula de planta ou outras células hospedeiras de interesse operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína de AHASL do tipo silvestre ou resistente a herbicida. Se necessário para objetivar expressão ao cloroplasta, o cassete de expressão também pode compreender uma seqüência de objetivação de cloroplasta operavelmente ligada que codifica um peptídeo de trânsito no cloroplasta para direcionar uma proteína de AHASL expressa ao cloroplasta. Os cassetes de expressão da invenção encontram uso em um método para intensificação da tolerância a herbicida de uma planta e uma célula hospedeira. O método envolve transformação da planta ou célula hospedeira com um cassete de expressão da invenção, em que o cassete de expressão compreende um promotor que é passível de expressão na planta ou célula hospedeira de interesse e o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida da invenção. O método ainda compreende regeneração de uma planta transformada a partir da célula de planta transformada.

A presente invenção proporciona um método para aumento de atividade de AHAS em uma planta compreendendo transformação de uma célula de planta com uma estrutura de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeo operavelmente ligada a um promotor que aciona
5 expressão em uma célula de planta e regeneração de uma planta transformada a partir da célula de planta transformada. A seqüência de nucleotídeo é selecionada daquelas seqüências de nucleotídeo que codificam as proteínas de AHASL do tipo silvestre ou resistentes a herbicida da invenção, particularmente as seqüências de nucleotídeo apresentadas em SEQ ID NOs:
10 1 e 3 e seqüências de nucleotídeo que codificam as seqüências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 4 e fragmentos e variantes das mesmas. Uma planta produzida através desse método compreende atividade de AHAS aumentada ou atividade de AHAS resistente a herbicida aumentada quando comparado com uma planta não transformada.

15 A presente invenção proporciona um método para a produção de uma planta resistente a herbicida compreendendo transformação de uma célula de planta com uma estrutura de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeo operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula de planta e regeneração de uma planta transformada
20 a partir da referida célula de planta transformada. A seqüência de nucleotídeo é selecionada daquelas seqüências de nucleotídeo que codificam as proteínas de AHASL resistentes a herbicida da invenção, particularmente a seqüência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:1, a seqüência de nucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO:2 e os
25 fragmentos e variantes das mesmas. Uma planta resistente a herbicida produzida através desse método compreende resistência intensificada a pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona, quando comparado com uma planta não transformada.

A presente invenção proporciona um método para

intensificação de tolerância a herbicida em uma planta tolerante a herbicida. O método encontra uso na intensificação de resistência de uma planta que já é resistente a um nível de um herbicida que mataria ou prejudicaria significativamente uma planta do tipo silvestre. Tal planta tolerante a herbicida ou uma planta tolerante a herbicida que foi desenvolvida significa uma que não envolve DNA recombinante tal como, por exemplo, as plantas de girassol MUT9 da presente invenção. O método compreende transformação de uma planta tolerante a herbicida com uma estrutura de polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula de planta e regeneração de uma planta transformada a partir da célula de planta transformada. A sequência de nucleotídeo é selecionada daquelas sequências de nucleotídeo que codificam as proteínas de AHASL resistentes a herbicida da invenção, particularmente a sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:2 e fragmentos e variantes da mesma.

A presente invenção proporciona vetores de transformação compreendendo um gene marcador selecionável da invenção. O gene marcador selecionável compreende um promotor que aciona expressão em uma célula hospedeira operavelmente ligada a um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida da invenção. O vetor de transformação pode, adicionalmente, compreender um gene de interesse a ser expresso na célula hospedeira e também pode, se desejado, incluir uma sequência de objetivação de cloroplasta que está operavelmente ligada ao polinucleotídeo da invenção.

A presente invenção ainda proporciona métodos para uso dos vetores de transformação da invenção para selecionar células transformadas com o gene de interesse. Tais métodos envolvem a transformação de uma célula hospedeira com um vetor de transformação, exposição da célula a um nível de um herbicida de imidazolinona que mataria ou inibiria o crescimento

de uma célula hospedeira não transformada e identificação da célula hospedeira transformada por sua capacidade de crescer na presença do herbicida. Em uma modalidade da invenção, a célula hospedeira é uma célula de planta e o gene marcador selecionável compreende um promotor que
5 aciona expressão em uma célula de planta.

A presente invenção proporciona um método para controle de ervas daninhas na proximidade das plantas resistentes a herbicida da invenção, incluindo as plantas de girassol resistentes a herbicida descritas acima e plantas transformadas com os polinucleotídeos de AHASL resistentes
10 a herbicida da invenção. Tais plantas transformadas compreendem, em seus genomas, pelo menos um cassete de expressão compreendendo um promotor que aciona expressão de gene em uma célula de planta, em que o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo de AHASL da invenção. O método compreende aplicação de uma quantidade eficaz de um herbicida às
15 ervas daninhas e à planta resistente a herbicida, em que a planta resistente a herbicida tem resistência aumentada a pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona, quando comparado com uma planta não transformada ou do tipo silvestre.

As plantas da presente invenção podem ser transgênicas ou
20 não-transgênicas. Um exemplo de uma planta de girassol não-transgênica tendo resistência aumentada a herbicidas de imidazolinona e/ou sulfoniluréia inclui a planta de girassol (MUT9) tendo No. de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325; ou um derivado mutante, recombinante ou geneticamente manipulado da planta tendo No. de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325;
25 ou qualquer prole da planta tendo No. de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325; ou uma planta que é uma prole de qualquer uma dessas plantas; ou uma planta que compreende as características de resistência a herbicida da planta tendo No. de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325.

A presente invenção também proporciona plantas, órgãos de

planta, tecidos de planta, células de planta, sementes e células hospedeiras não-humanas que são transformadas com o pelo menos um polinucleotídeo, cassete de expressão ou vetor de transformação da invenção. Tais plantas, órgãos de planta, tecidos de planta, células de planta, sementes e células hospedeiras não-humanas transformadas têm tolerância ou resistência intensificada a pelo menos um herbicida, em níveis do herbicida que matariam ou inibiriam o crescimento de uma planta, tecido de planta, célula de planta ou célula hospedeira não-humana não transformada, respectivamente. De preferência, as plantas, tecidos de planta, células de planta e sementes transformadas da invenção são *Arabidopsis thaliana* e plantas de safra.

A presente invenção ainda proporciona polipeptídeos isolados compreendendo proteínas de AHASL de girassol do tipo silvestre e resistentes à imidazolinona. Os polipeptídeos isolados compreendem as seqüências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 4, as seqüências de aminoácido codificadas pelas seqüências de nucleotídeo apresentadas em SEQ ID NOs: 1 e 3 e fragmentos e variantes das referidas seqüências de aminoácido que codificam proteínas compreendendo atividade de AHAS.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um alinhamento de seqüência de nucleotídeo das seqüências de codificação do gene *AHASL1* de girassol resistente a herbicida (MUT9 SUNALS1; SEQ ID NO:1), do gene *AHASL 1* de girassol do tipo silvestre (RHA266; SEQ ID NO:3), um gene *AHASL* de *Arabidopsis thaliana* (No. de Acesso ao GenBank NM_114714; SEQ ID NO:9), um gene *AHASL* de *Zea mays* (No. de Acesso ao GenBank X63553; SEQ ID NO:25), o gene *AHASL* resistente a herbicida de *Xanthium* sp. (No. de Acesso ao GenBank U16279; SEQ ID NO:5) e o gene *AHASL* do tipo silvestre de *Xanthium* sp. (No. de Acesso ao GenBank U16280; SEQ ID NO:7). O sítio da mutação em MUT SUNALS1 (SEQ ID NO:1) é indicado por um asterisco. A mutação é

uma transição C para T na posição de nucleotídeo 305 de SEQ ID NO:1.

A Figura 2 é um alinhamento de seqüência de aminoácido da proteína de AHASL1 de girassol resistente a herbicida (MUT9 SUNALS1; SEQ ID NO:2), da proteína de AHASL1 de girassol do tipo silvestre (RHA266; SEQ ID NO:4), uma proteína de AHASL de *Arabidopsis thaliana* (No. de Acesso ao GenBank NM_114714; SEQ ID NO:10), uma proteína de AHASL de *Zea mays* (No. de Acesso ao GenBank X63553; SEQ ID NO:26), a proteína de AHASL resistente a herbicida de *Xanthium* sp. (No. de Acesso ao GenBank U16279; SEQ ID NO:6) e a proteína de AHASL do tipo silvestre de *Xanthium* sp. (No. de Acesso ao GenBank U16280; SEQ ID NO:8). O asterisco indica o sítio da única substituição de aminoácido (Thr para Ile) encontrada na proteína de AHASL1 de girassol resistente a herbicida. Esse sítio de substituição corresponde à posição de aminoácido 102 na seqüência de aminoácido de AHASL1 de comprimento parcial apresentada em SEQ ID NO:2. A posição equivalente dessa substituição na seqüência de aminoácido de AHASL1 de comprimento total apresentada em SEQ ID NO:24 é 188.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido listadas na Listagem de Seqüência em anexo são mostradas usando abreviações de letras padrões para bases de nucleotídeo e o código com três letras para aminoácidos. As seqüências de nucleotídeo seguem a convenção padrão de começar na extremidade 5' da seqüência e prosseguir (isto é, da esquerda para a direita em cada linha) para a extremidade 3'. Apenas uma fita de cada seqüência de nucleotídeo é mostrada, mas a fita complementar deve ser entendida como estando incluída quando de qualquer referência à fita mostrada. As seqüências de aminoácido seguem a convenção padrão de começar no amino término da seqüência e prosseguir (isto é, da esquerda para a direita em cada linha) para o carboxi término.

SEQ ID NO:1 apresenta a seqüência de nucleotídeo de

comprimento parcial que codifica uma proteína de AHASL1 resistente a herbicida da linhagem de girassol MUT9.

5 SEQ ID NO:2 apresenta a sequência de aminoácido de comprimento parcial da proteína de AHASL1 resistente a herbicida codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3 apresenta a sequência de nucleotídeo de comprimento parcial que codifica a proteína de AHASL1 do tipo silvestre da linhagem de girassol RHA266.

10 SEQ ID NO:4 apresenta a sequência de aminoácido de comprimento parcial da proteína de AHASL1 do tipo silvestre codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:5 é a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank U16279.

15 SEQ ID NO:6 é a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank U16279.

SEQ ID NO:7 é a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank U16280.

SEQ ID NO:8 é a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank U16280.

20 SEQ ID NO:9 é a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank NM_114714.

SEQ ID NO:10 é a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank NM_114714.

25 SEQ ID NO:11 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador C2359-FI que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:12 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALSR1 que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:13 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador SUNALS1-F1 que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:14 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS1-8R que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:15 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-2R que é descrito no Exemplo 2.

5 SEQ ID NO:16 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-2F que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:17 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-3R que é descrito no Exemplo 2.

10 SEQ ID NO:18 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-3F que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:19 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-4F que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:20 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-6R que é descrito no Exemplo 2.

15 SEQ ID NO:21 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-7F que é descrito no Exemplo 2.

SEQ ID NO:22 apresenta a sequência de nucleotídeo do iniciador ALS-8F que é descrito no Exemplo 2.

20 SEQ ID NO:23 é a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank AY541451.

SEQ ID NO:24 é a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank AY41451.

SEQ ID NO:25 é a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank X63553.

25 SEQ ID NO:26 é a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao GenBank X63553.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere à plantas de girassol tendo resistência aumentada a herbicidas quando comparado com a planta de

girassol do tipo silvestre. Plantas de girassol resistentes a herbicida foram produzidas conforme descrito aqui abaixo através de exposição de plantas de girassol do tipo silvestre (com relação à resistência ao herbicida) a um mutagene, deixando as plantas maturar e reproduzir e selecionado plantas de prole que mostraram resistência intensificada a um herbicida de imidazolinona, com relação à resistência de uma planta de girassol do tipo silvestre. A invenção proporciona uma linhagem de girassol resistente a herbicida que é referida aqui como MUT9.

A partir das plantas de girassol resistentes a herbicida MUT9 e plantas de girassol do tipo silvestre, a região de codificação de um gene da subunidade grande de sintase de acetohidróxi ácido (designada como AHASL1) foi isolada através de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) e seqüenciada. Comparando as seqüências de polinucleotídeo das plantas de girassol do tipo silvestre e resistentes a herbicida, descobriu-se que a região de codificação da seqüência de polinucleotídeo de AHASL1 da planta de girassol resistente a herbicida diferia da seqüência de polinucleotídeo de AHASL1 da planta de girassol do tipo silvestre por um único nucleotídeo, uma transição de C para T no nucleotídeo 305 (SEQ ID NO:1). Essa transição de C para T na seqüência de polinucleotídeo de AHASL1 resulta em uma substituição de treonina para isoleucina no aminoácido 102 em uma região conservada da seqüência de aminoácido prevista da proteína de AHASL1 de girassol resistente a herbicida (SEQ ID NO:2) com relação à posição de aminoácido equivalente da proteína de AHASL1 do tipo silvestre da linhagem de girassol RHA266 (aminoácido 108 de SEQ ID NO:4).

Em virtude do fato de a seqüência de nucleotídeo apresentada em SEQ ID NO:1 não corresponder a uma região de codificação de comprimento total de uma proteína de AHASL, a seqüência de aminoácido codificada pela mesma que é apresentada em SEQ ID NO:2 também tem

menos do que o comprimento total. Para facilitar comparação com outras seqüências de aminoácido de AHASL de girassol, as posições de aminoácido de proteínas de AHASL de girassol mencionadas aqui, a menos que de outro modo indicado ou evidente para o contexto no qual tais posições aparecem,

5 correspondem às posições de aminoácido da seqüência de aminoácido de comprimento total da proteína de AHASL1 de girassol codificada pela seqüência de nucleotídeo tendo No. de Acesso ao GenBank AY541451 (SEQ ID NO:24). Conseqüentemente, a substituição de treonina para isoleucina na

10 posição de aminoácido 102 de SEQ ID NO:2 corresponde à posição de aminoácido 188 na seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:24.

Embora uma variedade de substituições de aminoácido nas proteínas de AHASL do tipo silvestre sejam conhecidas por conferir resistência a herbicida sobre uma planta expressando tal proteína de AHASL substituída, uma proteína de AHASL compreendendo uma substituição de

15 aminoácido na posição 188 ou posição equivalente (por exemplo, posição 203 na proteína de AHASL de *Arabidopsis* codificada pela seqüência de nucleotídeo apresentada em No. de Acesso ao GenBank X51514) e que confere resistência a herbicida a uma planta compreendendo tal proteína de AHASL não foi anteriormente divulgada. Veja Exemplo 5 abaixo. Veja

20 também Hartnett e colaboradores (1990) "Herbicide-resistant plants carrying mutated acetolactate synthase genes", Em: *Managing Resistance to Agrochemicals: Fundamental Research to Practical Strategies*, Green e colaboradores (eds.), American Chemical Soc. Symp., Series No. 421, Washington, DC, EUA; Simpson (1998) *Down to Earth* 53(1): 26-35;

25 Bruniard (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.), Tese de Ph.D., North Dakota State University, Fargo, ND, EUA, páginas 1-78.; White e colaboradores (2002) *Weed Sci* 50: 432-437; e Kolkman e colaboradores (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159;

todos os quais são incorporados aqui por referência.

Assim, a presente invenção divulga uma nova substituição de aminoácido que pode ser usada para produzir proteínas de AHASL de girassol resistentes a herbicida, os polinucleotídeos que codificam tais proteínas e plantas, tecidos de planta, células de planta e sementes resistentes a herbicida. Em virtude do fato de a treonina que é encontrada na posição de aminoácido 188 nas proteínas de AHASL1 de girassol do tipo silvestre ou na posição equivalente em outras proteínas de AHASL, estar dentro de uma região de aminoácidos que é conservada entre espécies de planta, espera-se que a substituição por outro aminoácido, de preferência isoleucina, para essa mesma treonina conservada em outras proteínas de AHASL de girassol (por exemplo, AHASL2 e AHASL3 de girassol) ou de outras espécies de planta resulte em proteínas de AHASL resistentes a herbicida. Conseqüentemente, tais proteínas de AHASL resistentes a herbicida e os polinucleotídeos que codificam as mesmas encontram uso na produção de plantas, células de planta, tecidos de planta e sementes resistentes a herbicida através dos métodos divulgados aqui.

A presente invenção abrange, adicionalmente, polinucleotídeos de AHASL2 e AHASL3 de girassol isolados que codificam proteínas de AHASL2 e AHASL3 resistentes a herbicida, respectivamente. Tais proteínas de AHASL2 e AHASL3 resistentes a herbicida compreendem, cada uma, um outro aminoácido que não treonina na posição 188 ou posição equivalentes. De preferência, em tais proteínas de AHASL2 e AHASL3 resistentes a herbicida, o aminoácido na posição 188 ou posição equivalente é isoleucina.

A invenção ainda se refere à moléculas de polinucleotídeo isoladas compreendendo seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas da grande subunidade de sintase de acetohidróxi ácido (AHASL) e a tais proteínas de AHASL. A invenção divulga o isolamento e seqüência de nucleotídeo de um polinucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL1 de

girassol resistente a herbicida de uma planta de girassol resistente a herbicida que foi produzida através de mutagênese química de plantas de girassol do tipo silvestre. As proteínas de AHASL1 de girassol resistentes a herbicida da invenção possuem uma substituição de treonina para isoleucina na posição 188 em suas respectivas seqüências de aminoácido quando comparado com a seqüência de aminoácido do tipo silvestre correspondente. A invenção ainda divulga o isolamento e seqüência de nucleotídeo de uma molécula de polinucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL1 de girassol do tipo silvestre.

A presente invenção proporciona moléculas de polinucleotídeo isoladas que codificam proteínas de AHASL de girassol (*Helianthus annuus* L.). Especificamente, a invenção proporciona moléculas de polinucleotídeo isoladas compreendendo: as seqüências de nucleotídeo apresentadas em SEQ ID NOs: 1 e 3 e as seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL compreendendo as seqüências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 4 e fragmentos e variantes de tais seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL funcionais.

As moléculas de polinucleotídeo de AHASL resistentes a herbicida isoladas da invenção compreendem seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL resistentes a herbicida. Tais moléculas de polinucleotídeo podem ser usadas em estruturas de polinucleotídeo para a transformação de plantas, particularmente plantas de safra, para intensificar a resistência das plantas a herbicidas, particularmente herbicidas que são conhecidos por inibir a atividade de AHASL, mais particularmente herbicidas de imidazolinona. Tais estruturas de polinucleotídeo podem ser usadas em cassetes de expressão, vetores de expressão, vetores de transformação, plasmídeos e semelhantes. As plantas transgênicas obtidas após transformação com tais estruturas de polinucleotídeo mostram resistência aumentada a herbicidas que inibem a AHAS tais como, por exemplo,

herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

As composições da invenção incluem seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL. Em particular, a presente invenção proporciona moléculas de polinucleotídeo isoladas mostradas em
5 SEQ ID NOs: 2 e 4 e fragmentos e variantes das mesmas que codificam polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS. Ainda proporcionados são polipeptídeos tendo uma seqüência de aminoácido codificada por uma molécula de polinucleotídeo descrita aqui, por exemplo, aquelas apresentadas em SEQ ID NOs: 1 e 3 e fragmentos e variantes das mesmas que codificam
10 polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS.

A invenção abrange composições de proteína ou ácido nucleico substancialmente purificado ou isolado. Uma molécula de polinucleotídeo ou proteína "isolada" ou "purificada" ou porção biologicamente ativa das mesmas é substancial ou essencialmente livre de
15 componentes que normalmente acompanham ou interagem com a molécula de polinucleotídeo ou proteína, conforme encontrado em seu ambiente que ocorre naturalmente. Assim, uma molécula de polinucleotídeo ou proteína isolada ou purificada é substancialmente isenta de outro material celular ou meio de cultura quando produzida através de técnicas recombinantes ou
20 substancialmente isenta de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizada. De preferência, um ácido nucleico "isolado" é isento de seqüências (de preferência, seqüências de codificação de proteína) que flanqueiam naturalmente o ácido nucleico (isto é, seqüências localizadas nas extremidades 5' e 3' do ácido nucleico) no DNA genômico do
25 organismo do qual o ácido nucleico é derivado. Por exemplo, em várias modalidades, a molécula de polinucleotídeo isolada pode conter menos de cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeo que flanqueiam naturalmente a molécula de polinucleotídeo no DNA genômico da célula da qual o ácido nucleico é derivado. Uma proteína

que é substancialmente isenta de material celular inclui preparados de proteína tendo menos de cerca de 0%, 20%, 10%, 5% ou 1% (em peso seco) de proteína contaminante. Quando a proteína da invenção ou porção biologicamente ativa da mesma é recombinantemente produzida, de preferência, o meio de cultura representa menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% (em peso seco) dos precursores químicos ou produtos químicos que não são da proteína de interesse.

A presente invenção proporciona polipeptídeos isolados compreendendo proteínas de AHASL. Os polipeptídeos isolados compreendem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo das seqüências de aminoácido apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 4, as seqüências de aminoácido codificadas pelas seqüências de nucleotídeo apresentadas em SEQ ID NOs: 1 e 2 e fragmentos e variantes funcionais das referidas seqüências de aminoácido que codificam um polipeptídeo de AHASL compreendendo atividade de AHAS. Por "fragmentos e variantes funcionais" entenda-se fragmentos e variantes dos polipeptídeos exemplificados que compreendem atividade de AHAS.

Em determinadas modalidades da invenção, os métodos envolvem o uso de plantas tolerantes a herbicida ou plantas resistentes a herbicida. Por uma planta "tolerante a herbicida" ou "resistente a herbicida" entenda-se uma planta que é tolerante ou resistente a pelo menos um herbicida em um nível que normalmente mataria ou inibiria o crescimento de uma planta normal ou do tipo silvestre. Em uma modalidade da invenção, as plantas tolerantes a herbicida da invenção compreendem uma proteína de AHASL resistente a herbicida ou tolerante a herbicida. Por "proteína de AHASL tolerante a herbicida" ou "proteína de AHASL resistente a herbicida" entenda-se que tal proteína de AHASL mostra maior atividade de AHAS com relação à atividade de AHASL de uma proteína do tipo silvestre, quando na presença de pelo menos um herbicida que é conhecido por interferir com a

atividade de AHAS e em pelo menos uma concentração ou nível do herbicida que é conhecido por inibir a atividade de AHAS da proteína de AHASL do tipo silvestre. Além disso, a atividade de AHAS de tal proteína tolerante a herbicida ou resistente a herbicida pode ser referida aqui como atividade de AHAS "tolerante a herbicida" ou "resistente a herbicida".

Para a presente invenção, os termos "tolerante a herbicida" e "resistente a herbicida" são usados permutavelmente e se destinam a ter um significado equivalente e um escopo equivalente. Similarmente, os termos "tolerância a herbicida" e "resistência a herbicida" são usados permutavelmente e se destinam a ter um significado equivalente e um escopo equivalente. Da mesma forma, os termos "resistente à imidazolinona" e "resistência à imidazolinona" são usados permutavelmente e se destinam a ser de um significado equivalente e um escopo equivalente aos termos "tolerante à imidazolinona" e "tolerância à imidazolinona", respectivamente.

A invenção abrange polinucleotídeos de AHASL resistentes a herbicida e proteínas de AHASL resistentes a herbicida. Por "polinucleotídeo de AHASL resistentes a herbicida" entenda-se um polinucleotídeo que codifica uma proteína compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida. Por "proteína de AHASL resistente a herbicida" entenda-se uma proteína ou polipeptídeo que compreende atividade de AHAS resistente a herbicida.

Ainda, é reconhecido que uma proteína de AHASL resistente a herbicida ou tolerante a herbicida pode ser introduzida em uma planta através de transformação de uma planta ou ancestral da mesma com uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL tolerante a herbicida ou resistente a herbicida. Tais proteínas de AHASL tolerantes a herbicida ou resistentes a herbicida são codificadas pelos polinucleotídeos de *AHASL* tolerantes a herbicida ou resistentes a herbicida. Alternativamente, uma proteína de AHASL tolerante a herbicida ou resistente a herbicida pode

ocorrer em uma planta como um resultado de uma mutação que ocorre naturalmente ou induzida em um gene *AHASL* endógeno no genoma de uma planta ou progenitor da mesma.

A presente invenção proporciona plantas, tecidos de planta, células de planta e células hospedeiras com resistência ou tolerância aumentada a pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia. A quantidade preferida ou concentração do herbicida é uma "quantidade eficaz" ou "concentração eficaz. Por "quantidade eficaz" e "concentração eficaz" entenda-se uma quantidade e concentração, respectivamente, que é suficiente para matar ou inibir o crescimento de uma planta, tecido de planta, célula de planta ou célula hospedeira do tipo silvestre similar, mas que a referida quantidade não mata ou inibe tão gravemente o crescimento das plantas, tecidos de planta, células de planta e células hospedeiras resistentes a herbicida da presente invenção. Tipicamente, a quantidade eficaz de um herbicida é uma quantidade que é rotineiramente usada em sistemas de produção agrícola para matar ervas daninhas de interesse. Tal quantidade é conhecida por aqueles habilitados na técnica ou pode ser facilmente determinada usando métodos conhecidos na técnica.

Os herbicidas da presente invenção são aqueles que interferem com a atividade da enzima AHAS, de modo que a atividade de AHAS é reduzida na presença do herbicida. Tais herbicidas podem também ser referidos aqui como "herbicidas que inibem a AHAS" ou simplesmente "inibidores de AHAS". Conforme usado aqui, um "herbicida que inibe a AHAS" ou "um inibidor de AHAS" não se destina a estar limitado a um único herbicida que interfere com a atividade da enzima AHAS. Assim, a menos que de outro modo estabelecido ou evidente a partir do contexto, um "herbicida que inibe a AHAS" ou um "inibidor de AHAS" pode ser um herbicida ou uma mistura de dois, três, quatro ou mais herbicidas, cada um dos quais interfere com a atividade da enzima AHAS.

Por "planta, tecido de planta, célula de planta ou célula hospedeira do tipo silvestre similar" entenda-se uma planta, tecido de planta, célula de planta ou célula hospedeira, respectivamente, que carece das características de resistência a herbicida e/ou um polinucleotídeo em particular da invenção que é divulgado aqui. O uso do termo "tipo silvestre", portanto, não se destina a implicar que uma planta, tecido de planta, célula de planta ou outra célula hospedeira carece de DNA recombinante em seu genoma e/ou não possui características de resistência à herbicida que são diferentes daquelas divulgadas aqui.

Conforme usado aqui, a menos que claramente de outro modo indicado, o termo "planta" se destina a significar uma planta em qualquer estágio de desenvolvimento, bem como qualquer parte ou partes de uma planta que podem estar presas ou separadas de uma planta intacta inteira. Tais partes de uma planta incluem, mas não estão limitadas a, órgãos, tecidos e células de uma planta. Exemplos de partes de planta em particular incluem um tronco, uma folha, uma raiz, uma inflorescência, uma flor, uma floreta, um fruto, um pedículo, um estame, uma antera, uma estigma, um estilo, um ovário, uma pétala, uma sépala, um carpelo, uma ponta de raiz, um revestimento de raiz, um pêlo de raiz, um pêlo de folha, um pêlo de semente, uma grão de pólen, um micrósporo, um cotilédone, um hipocótilo, um epicótula, xilema, floema, parênquima, endosperma, uma célula de companhia, uma célula de proteção e quaisquer outros órgãos, tecidos e células conhecidas de uma planta. Além disso, é reconhecido que uma semente é uma planta.

As plantas da presente invenção incluem plantas não-transgênicas e plantas transgênicas. Por "planta não-transgênicas" entenda-se uma planta que carece de DNA recombinante em seu genoma. Por "planta transgênica" entenda-se uma planta compreendendo DNA recombinante em seu genoma. Tal planta transgênica pode ser produzida através de introdução

de DNA recombinante no genoma da planta. Quando tal DNA recombinante é incorporado no genoma da planta transgênica, a prole da planta também pode compreender o DNA recombinante. Uma planta de prole que compreende pelo menos uma porção do DNA recombinante de pelo menos uma planta transgênica progenitora é também uma planta transgênica.

Para fins da presente invenção, a menos que de outro modo expressamente indicado ou evidente a partir do contexto, uma "planta de prole" é qualquer planta que descende de pelo menos uma planta da invenção e inclui, mas não está limitado a, descendentes de primeira, segunda, terceira, quarta, quinta, sexta, sétima, oitava, nona e décima gerações da planta da invenção. De preferência, tal prole ou descendentes compreendem resistência aumentada a pelo menos um herbicida quando comparado com uma planta do tipo silvestre. Mais preferivelmente, tal prole ou descendentes compreendem resistência aumentada a pelo menos um herbicida de imidazolinona quando comparado com uma planta do tipo silvestre. Ainda mais preferivelmente, tal prole ou descendentes compreendem as características de resistência a herbicida da planta com um Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325 e/ou uma proteína de AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição de aminoácido 188 ou posição equivalente.

A presente invenção proporciona a linhagem de girassol resistente a herbicida que é referida aqui como MUT9. Um depósito de pelo menos 2375 sementes da linhagem de girassol RHA266 MUT-9-1-1-2 (referido aqui como "MUT9") com o Depositório de Patente da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20110 EUA foi feita em 22 de Novembro de 2004 e atribuído o Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325. Em virtude de uma escassez de sementes da linhagem MUT9, menos de 2500 sementes da linhagem MUT9 foram inicialmente enviadas à ATCC. Em 4 de Fevereiro de 2005, os Requerentes fizeram um depósito suplementar de 125 sementes na ATCC para atingir um total de pelo menos

2500 sementes. O depósito da linhagem de girassol MUT9 foi feito durante um prazo de pelo menos 30 anos e pelo menos 5 anos após a solicitação mais recente para o fornecimento de uma amostra do depósito ter sido recebida pela ATCC. O depósito será mantido sob os termos do Tratado de Budapeste sob o International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. O depósito da linhagem de girassol MUT9 foi feito durante um prazo de 30 anos e pelo menos 5 anos após a solicitação mais recente para o fornecimento de uma amostra do depósito ter sido recebida pela ATCC. Adicionalmente, os Requerentes satisfizeram todos os requisitos do 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, incluindo fornecimento de uma indicação da viabilidade da amostra.

A presente invenção proporciona plantas de girassol resistentes a herbicida da linhagem MUT9 que foram produzidas através de uma produção de mutação. Plantas de girassol do aqueles habilitados na técnica sofreram mutação expondo as plantas a um mutagene, particularmente, um mutagene químico, mais particularmente metano-sulfonato de etila (EMS). Contudo, a presente invenção não está limitada à plantas de girassol resistentes a herbicida que são produzidas através de um método de mutagênese envolvendo o mutagene químico EMS. Qualquer método de mutagênese conhecido na técnica pode ser usado para produzir as plantas de girassol resistentes a herbicida da presente invenção. Tais métodos de mutagênese podem envolver, por exemplo, o uso de qualquer um ou mais dos seguintes mutagenes: radiação, tal com raios X, raios Gama (por exemplo, cobalto 60 ou cézio 137), nêutrons (por exemplo, o produto de fissão nuclear através de urânio 235 em um reator atômico), radiação Beta (por exemplo, emitida a partir de radioisótopos tais como fósforo 32 ou carbono 14) e radiação ultravioleta (de preferência, de 2500 a 2900 nm) e mutagenes químicos, tais como análogos de base (por exemplo, 5-bromo-uracila), compostos relacionados (por exemplo, 8-etóxi, cafeína) antibióticos (por

exemplo, estreptignina), agentes de alquilação (por exemplo, mostardas de enxofre, mostardas de nitrogênio, epóxidos, etilenaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nitroso ou acridinas. Plantas resistentes a herbicida também podem ser produzidas usando métodos de cultura tecidual para selecionar células de planta compreendendo mutações de resistência à herbicida e, então, regeneração de plantas resistentes a herbicida a partir das mesmas. Veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.773.702 e 5.859.348, ambas as quais são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Detalhes adicionais de produção de mutação podem ser encontrados em "Principals of Cultivar Development", Fevereiro de 1993, Macmillan Publishing Company, a divulgação da qual é incorporada aqui por referência.

Análise do gene AHASL1 da planta de girassol da linhagem MUT9 revelou que a mutação que resulta na substituição de uma isoleucina pela treonina é encontrada na posição de aminoácido 188 na sequência de aminoácido de AHASL1 do tipo silvestre para SEQ ID NO:4. Assim, a presente invenção divulga que substituindo outro aminoácido pela treonina na posição 188 pode-se fazer com que uma planta de girassol tenha resistência aumentada a um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona e/ou sulfoniluréia. Conforme divulgado no Exemplo 5 abaixo, a treonina na posição de aminoácido 188 ocorre dentro de uma região conservada de proteínas de AHASL. Similarmente, substituições de aminoácido em outras regiões conservadas de proteínas de AHASL foram divulgadas, as quais são conhecidas por conferir resistência a herbicida a uma planta que compreende tal proteína de AHASL. Conseqüentemente, as plantas de girassol resistentes a herbicida da invenção incluem, mas não estão limitadas a, aquelas plantas de girassol as quais compreendem, em seus genomas, pelo menos uma cópia de um polinucleotídeo de AHASL que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida que compreendem uma isoleucina ou outro aminoácido

que não treonina na posição de aminoácido 188 ou posição equivalente e uma ou mais substituições de aminoácido adicionais na proteína de AHASL com relação à proteína de AHASL do aqueles habilitados na técnica, em que tal planta de girassol tem resistência aumentada a pelo menos um herbicida quando comparado com uma planta de girassol do aqueles habilitados na técnica. Tais plantas de girassol compreendem proteínas de AHASL que compreendem pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de: uma treonina na posição de aminoácido 107 ou posição equivalente; uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina ou serina na posição de aminoácido 182 ou posição equivalente; um aspartato ou valina na posição de aminoácido 190 ou posição equivalente; uma leucina na posição de aminoácido 559 ou posição equivalente; e uma asparagina, treonina ou fenilalanina na posição de aminoácido 638 ou posição equivalente.

A presente invenção proporciona proteínas de AHASL com substituições de aminoácido em posições de aminoácido particulares dentro de regiões conservadas das proteínas de AHASL de girassol divulgadas aqui. Além disso, aqueles habilitados na técnica reconhecerão que tais posições de aminoácido podem variar, dependendo se os aminoácido são adicionados ou removidos, por exemplo, da extremidade N-terminal de uma sequência de aminoácido. Assim, a invenção abrange as substituições de aminoácido na posição mencionada ou posição equivalente (por exemplo, "posição de aminoácido 188 ou posição equivalente"). Por "posição equivalente" entenda-se uma posição que está dentro da mesma região conservada que a posição de aminoácido exemplificada. Tais regiões conservadas são conhecidas na técnica (veja Tabela 6 abaixo) ou podem ser determinadas através de múltiplos alinhamentos de sequência conforme divulgado aqui ou através de métodos conhecidos na técnica.

Além disso, a presente invenção proporciona polipeptídeos de

AHASL compreendendo substituições de aminoácido que são conhecidas por conferir resistência a uma planta a pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona e um herbicida de sulfoniluréia. Tais polipeptídeos de AHASL incluem, por exemplo, aqueles que compreendem

5 pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de: uma isoleucina ou outro aminoácido que não treonina na posição de aminoácido 188 ou posição equivalente; uma treonina na posição de aminoácido 107 ou posição equivalente; uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina ou serina na posição de aminoácido 182 ou posição equivalente;

10 um aspartato ou valina na posição de aminoácido ou posição equivalente; uma leucina na posição de aminoácido 559 ou posição equivalente; e uma asparagina, treonina ou fenilalanina na posição de aminoácido 638 ou posição equivalente. A invenção ainda proporciona polinucleotídeos isolados que codificam tais polipeptídeos de AHASL, bem como cassetes de expressão,

15 vetores de transformação, células hospedeiras transformadas, plantas transformadas e métodos compreendendo tais polinucleotídeos.

A presente invenção proporciona métodos para intensificação da tolerância ou resistência de uma planta, tecido de planta, célula de planta ou outra célula hospedeira a pelo menos um herbicida que interfere com a

20 atividade da enzima AHAS. De preferência, tal herbicida que inibe a AHAS é um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de benzoato de pirimidinilóxi, um herbicida de sulfonilamino- carboniltriasolinona ou mistura dos mesmo. Mais preferivelmente, tal herbicida é um herbicida de imidazolinona, um herbicida

25 de sulfoniluréia ou mistura dos mesmos. Para a presente invenção, os herbicidas de imidazolinona incluem, mas não estão limitados a, PURSUIT® (imazethapyr), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), um derivado de qualquer um dos herbicidas antes mencionados e uma mistura de

dois ou mais dos herbicidas antes mencionados, por exemplo, imazapyr/imazamox (ODYSSEY®). Mais especificamente, o herbicida de imidazolinona pode ser selecionado de, mas não está limitado a, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido [2-(4-isopropil-4-] [metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinacarboxílico], ácido [5-etil-2-(4-isopropil-] 4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metóximetil)-nicotínico, ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-] imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico e uma mistura de [6- (4-isopropil-4-] metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila e [2-(4-isopropil-4-metil-5-]oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila. O uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo- 2-imidazolin-2-il)-nicotínico e ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-] il)-5-(metóximetil)-nicotínico é preferido. O uso de ácido [2-(4-isopropil-4-] metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metóximetil)-nicotínico é particularmente preferido.

Para a presente invenção os herbicidas de sulfoniluréia incluem, mas não estão limitados a, chlorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, chlorimuron etila, thifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, ethametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusal, triflusaluron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, cyclosulfuron, ethoxysulfuron, flazasulfuron, flupyrasulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxysulfuron, tritosulfuron, um derivado de qualquer um dos herbicidas antes mencionados e uma mistura de dois ou mais dos herbicidas antes mencionados. Os herbicidas de triazolopirimidina da invenção incluem, mas não estão limitados a, cloransulam, diclosulam, fioresulam, flumetsulam, metosulam e penoxsulam. Os herbicidas de benzoato de pirimidinilóxi da invenção incluem, mas não

estão limitados a, bispyribac, pyriothiobac, pyriminobac, pyribenzoxim e pyriftalid. Os herbicidas de sulfonilamino-carboniltriazolinona incluem, mas não estão limitados a, flucarbazona e propóxicarbazona.

É reconhecido que herbicidas de benzoato de pirimidinilóxi
5 são intimamente relacionados aos herbicidas pirimidiniltiobenzoato e são generalizados sob o cabeçalho do último nome pela Weed Science Society of America. Portanto, a menos que de outro modo indicado aqui ou evidente a partir do contexto, herbicidas de pirimidiniltiobenzoato da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, herbicidas de benzoato de pirimidinilóxi,
10 herbicidas de pirimidiniltiobenzoato e misturas dos mesmo. Da mesma forma, a menos que de outro modo indicado aqui ou evidente a partir do contexto, os herbicidas de benzoato de pirimidinilóxi da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, herbicidas de benzoato de pirimidinilóxi, herbicidas de pirimidiniltiobenzoato e misturas dos mesmos.

15 A presente invenção proporciona métodos para intensificação de atividade de AHAS em uma planta compreendendo transformação de uma planta com uma estrutura de polinucleotídeo compreendendo uma promotor operavelmente ligado a uma sequência de nucleotídeo de AHASL1 da invenção. Os métodos envolvem introdução de uma estrutura de
20 polinucleotídeo da invenção em pelo menos uma célula de planta e regeneração de uma planta transformada a partir da mesma. Os métodos envolvem o uso de um promotor que é capaz de acionar a expressão de gene em uma célula de planta. De preferência, tal promotor é um promotor constitutivo ou um promotor tecido-específico. Os métodos encontram uso na
25 intensificação ou aumento da resistência de uma planta a pelo menos um herbicida que interfere com a atividade catalítica da enzima AHAS, particularmente um herbicida de imidazolinona.

A presente invenção proporciona cassetes de expressão para expressão dos polinucleotídeos da invenção em plantas, tecidos de planta,

células de planta e outras células hospedeiras. Os cassetes de expressão compreendem um promotor expressível na planta, tecido de planta, célula de planta ou outras células hospedeiras de interesse operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que compreende uma seqüência de nucleotídeo
5 que codifica uma proteína de AHASL1 de comprimento total (isto é, incluindo o peptídeo de trânsito em cloroplasta) ou madura (isto é, sem o peptídeo de trânsito em cloroplasta). Se expressão é desejada nos plastídeos ou cloroplastas de plantas ou células de planta, o cassete de expressão pode também compreender uma seqüência de objetivação de cloroplasta
10 operavelmente ligada que codifica um peptídeo de trânsito em cloroplasta.

Os cassetes de expressão da invenção encontram uso em um método para intensificação de tolerância a herbicida de uma planta ou célula hospedeira. O método envolve transformação da planta ou célula hospedeira com um cassete de expressão da invenção, em que o cassete de expressão
15 compreende um promotor que é expressível na planta ou célula hospedeira de interesse e o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL1 resistente à imidazolinona da invenção.

O uso do termo "estruturas de polinucleotídeo" aqui não se
20 destina a limitar a presente invenção à estruturas de polinucleotídeo compreendendo DNA. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que estruturas de polinucleotídeo, particularmente polinucleotídeos e oligonucleotídeos, compreendidas de ribonucleotídeos e combinações de ribonucleotídeos e deóxiribonucleotídeos podem também ser empregadas nos
25 métodos divulgados aqui. Assim, as estruturas de polinucleotídeo da presente invenção abrangem todas as estruturas de polinucleotídeo que podem ser empregadas nos métodos da presente invenção para transformação de plantas incluindo, mas não limitado a, aquelas compreendidas de deóxiribonucleotídeos, ribonucleotídeos e combinações dos mesmos. Tais

deóxiribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem moléculas que ocorrem naturalmente e análogos sintéticos. As estruturas de polinucleotídeo da invenção também abrangem todas as formas de estruturas de polinucleotídeo incluindo, mas não limitado a, formas fita simples, formas fita dupla, hairpins, estruturas com tronco e loop e semelhantes. Além disso, será compreendido por aqueles habilitados na técnica que cada uma das seqüências de nucleotídeo divulgadas aqui também abrange o complemento dessa seqüência de nucleotídeo exemplificada.

Além disso, é reconhecido que os métodos na invenção podem empregar uma estrutura de polinucleotídeo que é capaz de direcionar, em uma planta transformada a expressão de pelo menos uma proteína ou pelo menos um RNA tal como, por exemplo, um RNA anti-senso que é complementar a pelo menos uma porção de uma mRNA. Tipicamente, tal estrutura de polinucleotídeo é compreendida de uma seqüência de codificação para uma proteína ou um RNA operavelmente ligado à regiões regulatórias de transcrição 5' e 3'. Alternativamente, também é reconhecido que os métodos da invenção podem empregar uma estrutura de polinucleotídeo que não é capaz de direcionar, em uma planta transformada, a expressão de uma proteína ou um RNA.

Ainda, é reconhecido que, para expressão de um polinucleotídeo da invenção em uma célula hospedeira de interesse, o polinucleotídeo é, tipicamente, operavelmente ligado a um promotor que é capaz de acionar expressão de gene na célula hospedeira de interesse. Os métodos da invenção para expressão dos polinucleotídeos em células hospedeiras não dependem do promotor em particular. Os métodos abrangem o uso de qualquer promotor que é conhecido na técnica e que é capaz de acionar expressão de gene na célula hospedeira de interesse.

A presente invenção abrange moléculas de polinucleotídeo de AHASL e fragmentos e variantes das mesmas. Moléculas de polinucleotídeo

que são fragmentos dessas seqüências de nucleotídeo são também abrangidas pela presente invenção. Por "fragmento" entenda-se uma porção da seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL da invenção. Um fragmento de uma seqüência de nucleotídeo de AHASL da invenção pode codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína de AHASL ou pode ser um fragmento que pode ser usado como uma sonda de hibridização ou iniciador de PCR usando os métodos divulgados abaixo. Uma porção biologicamente ativa de uma proteína de AHASL pode ser preparada através de isolamento de uma porção de uma das seqüências de nucleotídeo de AHASL da invenção, expressão da porção codificada da proteína de AHASL (por exemplo, através de expressão recombinante *in vitro*) e avaliação da atividade da porção codificada da proteína de AHASL1. moléculas de polinucleotídeo que são fragmentos de uma seqüência de nucleotídeo de AHASL compreendem pelo menos cerca de 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650 ou 1700 nucleotídeos ou até o número de nucleotídeos presentes em uma seqüência de nucleotídeo de comprimento total divulgada aqui (por exemplo, 1684 e 1706 nucleotídeos para SEQ ID NOs: 1 e 3, respectivamente) dependendo do uso pretendido.

Um fragmento de uma seqüência de nucleotídeo de AHASL que codifica uma porção biologicamente ativa de uma proteína de AHASL da invenção codificará pelo menos cerca de 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ou 550 aminoácidos contínuos ou até o número total de aminoácidos presentes em uma proteína de AHASL1 de comprimento total da invenção (por exemplo, 561 e 568 aminoácidos para SEQ ID NOs: 2 e 4, respectivamente). fragmentos de uma seqüência de nucleotídeo de AHASL1 que são úteis como sondas de hibridização para iniciadores de PCR geralmente não precisam codificar uma porção

biologicamente ativa de uma proteína de AHASL1.

Moléculas de polinucleotídeo que são variantes das seqüências de nucleotídeo divulgadas aqui também são abrangidas pela presente invenção. "Variantes" das seqüências de nucleotídeo de AHASL da invenção incluem aquelas seqüências que codificam as proteínas de AHASL divulgadas aqui, mas que diferem conservativamente em virtude da degenerância do código genético. Essas variantes alélicas que ocorrem naturalmente podem ser identificadas com o uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas tais como técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) e hibridização conforme esboçado abaixo. seqüências de nucleotídeo variantes também incluem seqüências de nucleotídeo sinteticamente derivadas que tenham sido geradas, por exemplo, usando mutagênese sítio-direcionada, mas as quais ainda codificam a proteína de AHASL1 divulgada na presente invenção, conforme discutido abaixo. Geralmente, variantes de seqüência de nucleotídeo da invenção terão pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade a uma seqüência de nucleotídeo em particular divulgada aqui. Uma seqüência de nucleotídeo de AHASL variante codificará uma proteína de AHASL, respectivamente, que tem uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade à seqüência de aminoácido de uma proteína de AHASL divulgada aqui.

Além disso, o técnico habilitado ainda apreciará que alterações podem ser introduzidas através de mutação nas seqüências de nucleotídeo da invenção, desse modo, levando à alterações na seqüência de aminoácido das proteínas de AHASL codificadas sem alterar a atividade biológica das proteínas de AHASL. Assim, uma molécula de polinucleotídeo isolada que codifica uma proteína de AHASL tendo uma seqüência que difere daquela de SEQ ID NOs: 1 ou 3, respectivamente, pode ser criada através de introdução

de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeo na sequência de nucleotídeo correspondente divulgada aqui, de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácido sejam introduzidas na proteína codificada. Mutações podem ser introduzidas através de técnicas
5 padrões, tais como mutagênese sítio-direcionada e mutagênese PCR-mediada. Tais sequências de nucleotídeo variantes são também abrangidas pela presente invenção.

Por exemplo, de preferência, substituições de aminoácido conservativas podem ser feitas em um ou mais resíduos de aminoácido
10 previstos, de preferência, não essenciais. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado na sequência do tipo silvestre de uma proteína de AHASL (por exemplo, a sequência de SEQ ID NOs: 2 e 3, respectivamente) sem alterar a atividade biológica, enquanto que um resíduo de aminoácido "essencial" é requerido para atividade biológica. Uma
15 "substituição de aminoácido conservativa" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias
20 laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico) cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, valina, alanina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e
25 cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Tais substituições não deverão ser feitas para resíduos de aminoácido conservados ou para resíduos de aminoácido que residem dentro de um motivo conservado.

As proteínas da invenção podem ser alteradas de várias

formas, incluindo, substituições, deleções, truncamentos e inserções de aminoácido. Métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos na técnica. Por exemplo, variantes de sequência de aminoácido das proteínas de AHASL podem ser preparadas através de mutações no DNA. Métodos para mutagênese e alterações de sequência de nucleotídeo são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e colaboradores (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; Patente U.S. 4.873.192; Walker and Gaastra, edições (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova Iorque) e as referências citadas nos mesmos. Orientação sobre substituições de aminoácido apropriadas que não afetam a atividade biológica da proteína de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff e colaboradores (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C), aqui incorporado por referência. Substituições conservativas, tal como troca de um aminoácido por outro tendo propriedades similares podem ser preferíveis.

Alternativamente, seqüências de nucleotídeo de AHASL variantes podem ser feitas através de introdução de mutações aleatoriamente ao longo toda ou parte de uma seqüência de codificação de AHASL, tal como através de mutagênese por saturação e os mutantes resultantes podem ser selecionados com relação à atividade de AHAS, incluindo atividade de AHAS com resistência a herbicida. Após mutagênese, a proteína codificada pode ser expressa recombinantemente e a atividade da proteína pode ser determinada usando técnicas de ensaio padrões.

Assim, as seqüências de nucleotídeo da invenção incluem as seqüência divulgadas aqui, bem como fragmentos e variantes das mesmas. As seqüências de nucleotídeo de AHASL da invenção e fragmentos e variantes das mesmas podem ser usados como sondas e/ou iniciadores para identificar e/ou clonar homólogos de AHASL em outras plantas. Tais sondas podem ser

usadas para detectar transcritos ou seqüências genômicas que codificam as mesmas ou proteínas idênticas.

Dessa maneira, métodos tais como PCR, hibridização e semelhantes podem ser usados para identificar tais seqüências tendo
5 identidade substancial à seqüências da invenção. Veja, por exemplo, Sambrook e colaboradores (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) e Innis e colaboradores (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY). Seqüências de nucleotídeo de *AHASL* isoladas
10 baseado em sua identidade de seqüência às seqüências de nucleotídeo de *AHASL1* apresentadas aqui ou a fragmentos e variantes das mesmas são abrangidas pela presente invenção.

Em um método de hibridização, toda ou parte de uma seqüência de nucleotídeo de *AHASL* conhecida pode ser usada para selecionar
15 bibliotecas de cDNA ou genômicas. Métodos para a construção de tais bibliotecas de cDNA e genômicas são geralmente conhecidos na técnica e são divulgados em Sambrook e colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). As assim denominadas sondas de hibridização podem ser fragmentos de
20 DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA ou outros oligonucleotídeos e podem ser rotuladas com um grupo detectável, tal como ³²P, ou qualquer outro marcador detectável, tais como outros radioisótopos, um composto florescente, uma enzima ou um co-fator enzimático. Sondas para hibridização podem ser feitas através de rotulação de oligonucleotídeo
25 sintéticos baseados na seqüência de nucleotídeo de *AHASL* divulgada aqui. Iniciadores degenerados projetados com base em nucleotídeos conservados ou resíduos de aminoácido em uma seqüência de nucleotídeo de *AHASL* conhecida ou seqüência de aminoácido codificada podem adicionalmente ser usados. A sonda compreende, tipicamente, uma região de seqüência de

nucleotídeo que se hibridiza sob condições estringentes a pelo menos cerca de 12, de preferência cerca de 25, mais preferivelmente cerca de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 ou 1700 nucleotídeos consecutivos de uma
5 sequência de nucleotídeo de *AHASL* da invenção ou um fragmento ou variante da mesma. O preparo de sondas para hibridização é geralmente conhecido na técnica e é divulgado em Sambrook e colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque), aqui incorporado por referência.

10 Por exemplo, toda a sequência de *AHASL* divulgada aqui ou uma ou mais porções da mesma pode ser usada como uma sonda capaz de hibridização específica à sequências de *AHASL* correspondentes e RNAs mensageiros. Técnicas de hibridização incluem seleção por hibridização de bibliotecas de DNA em lâminas (quer placas ou colônias; veja, por exemplo,
15 Sambrook e colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque).

Hibridização de tais sequências pode ser realizada sob condições estringentes. Por "condições estringentes" ou "condições de hibridização estringente" entenda-se condições sob as quais uma sonda se
20 hibridizará à sua sequência alvo em um grau detectavelmente maior do que à outras sequências (por exemplo, uma base de pelo menos duas vezes). Condições estringentes são sequência- dependentes e serão diferentes em diferentes circunstâncias.

Tipicamente, condições estringentes serão aquelas nas quais a
25 concentração de sal é íons de Na a pelo menos cerca de 1,5 M, tipicamente uma concentração de íons de Na de cerca de 0,01 a cerca de 1,0 M (ou outros sais) em um pH de 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30 °C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 °C para sondas longas (por exemplo, maior do que 50 nucleotídeos).

Condições estringentes podem também ser obtidas com a adição de agentes de estabilização, tal como formamida. Condições de baixa estringência exemplificativa incluem hibridização com uma solução tampão de formamida a 35%, NaCl a 1-M, SDS a 1% (dodecil sulfato de sódio) a 37 °C e uma lavagem em 1X ou 2X SSC (20X SSC = NaCl a 3,0 M/ citrato trissódico a 0,3 M) a 50 a 55 °C. Condições de estringência moderada exemplificativas incluem hibridização em formamida a 40 a 45%, NaCl a 1,0 M, SDS a 1% a 37 °C e uma lavagem em 0,5X a 1X SSC a 55 a 60 °C. Condições de alta estringência exemplificativas incluem hibridização em formamida a 50%, NaCl a 1 M, SDS a 1% a 37 °C e uma lavagem em 0,1X SSC a 60 a 65 °C. Opcionalmente, tampões de lavagem podem compreender SDS a cerca de 0,1% a cerca de 1%. A duração de hibridização é geralmente menos do que cerca de 24 horas, usualmente, cerca de 4 horas a cerca de 12 horas.

A especificidade é, tipicamente, a função de lavagens pós-hibridização, os fatores críticos sendo a resistência iônica e temperatura da solução de lavagem final. Para híbridos de DNA-DNA, a T_m pode ser aproximada a partir da equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; onde M é a molaridade cátions monovalentes, % GC é o percentual de nucleotídeos de guanosina e citosina no DNA, % form é o percentual de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento dos híbridos em pares de base. A T_m é a temperatura (sob resistência iônica e pH definidos) na qual 50% de uma sequência alvo complementar se hibridizam a uma sonda perfeitamente equivalente. A T_m é reduzida em cerca de 1 °C para cada 1% de combinação errônea; assim, a T_m , condições de hibridização e/ou lavagem podem ser ajustadas para se hibridizar à seqüências da identidade desejada. Por exemplo, se seqüências com $\geq 90\%$ de identidade são consideradas, a T_m pode ser diminuída 10 °C. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para ser cerca de 5% menores do que o ponto de fusão térmico

(T_m) para a sequência específica e é complementar a uma resistência iônica e pH definidos. Contudo, condições rigorosamente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3 ou 4 °C menor do que o ponto de fusão térmica (T_m); condições moderadamente estridentes podem utilizar
5 uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10 °C menor do que o ponto de fusão térmica (T_m) condições de baixa estringência podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20 °C menor do que o ponto de fusão térmica (T_m). Usando a equação, as composições de hibridização e lavagem a T_m desejada, aqueles habilitados na técnica compreenderam que
10 variações na estringência de hibridização e/ou soluções de lavagem são inerentemente descritas. Se o grau de combinação errônea resulta em uma T_m de menos de 45 °C (solução aquosa) ou 32 °C (solução de formamida), é preferido aumentar a concentração de SSC de modo que uma maior temperatura possa ser usada. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos
15 nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology — Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nova Iorque); e Ausubel e colaboradores, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova Iorque). Veja Sambrook e
20 colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque).

É reconhecido que as moléculas de polinucleotídeo e proteínas da invenção abrangem moléculas de polinucleotídeo e proteínas compreendendo uma sequência de nucleotídeo ou aminoácido que é
25 suficientemente idêntica à sequência de nucleotídeo de SEQ ID NOs: 1 e/ou 3 ou à sequência de aminoácido de SEQ ID NOs: 2 e/ou 4. O termo "suficientemente idêntica" é usado aqui para se referir a uma primeira sequência de aminoácido ou nucleotídeo que contém um número mínimo ou suficiente de resíduos de aminoácido ou nucleotídeo idênticos ou equivalentes

(com uma cadeia lateral similar) a uma segunda seqüência de aminoácido ou nucleotídeo, de modo que as primeira e segunda seqüências de aminoácido ou nucleotídeo têm um domínio estrutural em comum e/ou atividade funcional em comum. Por exemplo, seqüências de aminoácido ou nucleotídeo que
5 contém um domínio estrutural em comum tendo pelo menos cerca de 45%, 55% ou 65% de identidade, de preferência 75% de atividade, mais preferivelmente 85%, 95% ou 98% de identidade são definidas aqui como suficientemente idênticas.

Para determinar a identidade percentual de duas seqüências de
10 aminoácido ou de 2 ácidos nucleicos, as seqüências são alinhadas para fins de comparação ótima. A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, identidade percentual = número de posições idênticas/ número total de posições (por exemplo, posições sobrepostas) x 100). Em uma modalidade, as
15 duas seqüências são do mesmo comprimento. A identidade percentual entre duas seqüências pode ser determinada usando técnicas similares àquelas descritas abaixo, com ou sem a permissão de intervalos. No cálculo da identidade percentual, tipicamente, combinações exatas são contadas.

A determinação da identidade percentual entre duas seqüências
20 pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitativo preferido de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas seqüências é o algoritmo Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 2264, modificado conforme em Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 5873-5877. Tal algoritmo é incorporado nos
25 programas NBLAST e XBLAST de Altschul e colaboradores (1990) *J Mol. Biol.* 215: 403. As buscas por nucleotídeo no BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, $\text{escore} = 100$, extensão de palavra = 12, para obter seqüências de nucleotídeo homólogas às moléculas de polinucleotídeo da invenção. Buscas por proteína no BLAST podem ser realizadas com o

programa XBLAST, $\text{escore} = 50$, extensão de palavra = 3, para obter seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com intervalos para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado conforme descrito em Altschul e colaboradores (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389. Alternativamente, o PSI-Blast pode ser usado para realizar uma busca iterativa que detecta relações distantes entre moléculas. Veja Altschul e colaboradores (1997) supra. Quando utilizando os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Veja <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Outro exemplo não limitativo preferido de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de seqüências é o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17. Tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), o qual é parte do pacote de software de alinhamento de seqüência GCG. Quando utilizando o programa ALIGN para comparação de seqüências de aminoácido, uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade por extensão de GAP de 12 e uma penalidade por GAP de 4 podem ser usados. O alinhamento também pode ser realizado manualmente através de inspeção.

A menos que de outro estabelecido, valores de identidade/similaridade proporcionados aqui se referem ao valor obtido as seqüências de comprimento total da invenção e usando múltiplos alinhamentos por meio do algoritmo Clustal W (Nucleic Acid Research, 22(22): 4673-4680, 1994) usando o programa AlignX incluído no pacote de software Vector NTI Suite Versão 7 (InforMax, Inc., Bethesda, MD, EUA) usando os parâmetros padrão; ou qualquer programa equivalente ao mesmo. Por "programa equivalente" entenda-se qualquer programa de comparação de seqüência que, para quaisquer duas seqüências em questão, gera um alinhamento tendo combinações de resíduo de aminoácido ou nucleotídeo idênticas e uma identidade de seqüência percentual idêntica quando comparado com o

alinhamento correspondente gerado pelo AlignX no pacote de software Vector NTI Suite Versão 7.

As seqüências de nucleotídeo de *AHASL* da invenção incluem as seqüências que ocorrem naturalmente, bem como formas mutantes, particularmente formas mutantes que codificam proteínas de *AHASL* compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida. Da mesma forma, as proteínas da invenção abrangem proteínas que ocorrem naturalmente bem como variações e formas modificadas das mesmas. Tais variantes continuarão a possuir a atividade de AHASL desejada. Obviamente, as mutações que serão feitas no DNA que codifica a variante não colocam a seqüência fora da estrutura de leitura e, de preferência, não criarão regiões complementares que possam produzir estrutura de mRNA secundário. Veja, Publicação de Pedido de Patente EP no. 75.444.

Não se espera que as deleções, inserções e substituições das seqüências de proteína abrangidas aqui produzam alterações radicais nas características da proteína. Contudo, quando é difícil prever o efeito exato da substituição, deleção ou inserção antecipadamente ao fazer isso, aqueles habilitados na técnica apreciarão que o efeito será avaliado através de ensaios de seleção de rotina. Isto é, a atividade pode ser avaliada através de ensaios de atividade de AHAS. Veja, por exemplo, Singh e colaboradores (1988) Anal. Biochem. 171: 173-179, aqui incorporados por referência.

Seqüências de nucleotídeo e proteínas variantes também abrangem seqüências e proteínas derivadas de um procedimento mutagênico e recombinogênico, tal como embaralhamento de DNA. Com tal procedimento, uma ou mais diferentes seqüências de codificação de *AHASL* podem ser manipuladas para criar uma nova proteína de AHASL possuindo as propriedades desejadas. Dessa maneira, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeo de seqüência relacionada compreendendo regiões de seqüência que têm

identidade de seqüência substancial e podem ser homologamente recombinados *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, usando essa abordagem, motivos de seqüência que codificam um domínio de interesse podem ser embaralhados entre o gene *AHASL* da invenção e outros genes *AHASL* conhecidos para obter um novo gene que codifica uma proteína com uma propriedade de interesse aperfeiçoada, tal como uma K_m aumentada, no caso de uma enzima. Estratégias para tal embaralhamento de DNA são conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Cramer e colaboradores (1997) *Nature Biotech.* 15: 436-438; Moore e colaboradores (1997) *J Mol. Biol.* 272: 336-347; Zhang e colaboradores (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504-4509; Cramer e colaboradores (1998) *Nature* 391: 288-291; e Patentes U.S. 5.605.793 e 5.837.458.

As seqüências de nucleotídeo da invenção podem ser usadas para isolar seqüências correspondentes de outros organismos, particularmente outras plantas, mais particularmente outras dicots. Dessa maneira, métodos tais como PCR, hibridização e semelhantes podem ser usados para identificar tais seqüências baseado em sua homologia de seqüência às seqüências apresentadas aqui. Seqüências isoladas baseadas em sua identidade de seqüência às seqüências de polinucleotídeo de *AHASL* inteiras apresentadas aqui ou fragmentos das mesmas são abrangidos pela presente invenção. Assim, seqüências de polinucleotídeo isoladas que codificam uma proteína de *AHASL* e as quais se hibridizam, sob condições estringentes, à seqüência divulgada aqui ou a fragmentos da mesma, são abrangidas pela presente invenção.

Em uma abordagem de PCR, iniciadores de oligonucleotídeo podem ser projetados para uso em reações de PCR para amplificar seqüências de DNA correspondentes a partir de cDNA ou DNA genômico extraído de qualquer planta de interesse. Métodos para projetar iniciadores de PCR e

clonagem por PCR são geralmente conhecidos na técnica e são divulgados em Sambrook e colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque). Veja, também, Innis e colaboradores, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nova Iorque); Innis e Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nova Iorque); e Innis e Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nova Iorque). Métodos conhecidos de PCR incluem, mas não estão limitados a, métodos usando iniciadores emparelhados, iniciadores agrupados, iniciadores unicamente específicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene-específicos, iniciadores vetor-específicos, iniciadores parcialmente combinados erroneamente e semelhantes.

As seqüências de polinucleotídeo de AHASL da invenção são proporcionadas em cassetes de expressão para a expressão na planta de interesse. O cassete incluirá seqüências regulatórias 5' e 3' operavelmente ligadas a uma seqüência de polinucleotídeo de AHASL da invenção. Por "operavelmente ligada" entenda-se uma ligação funcional entre um promotor e uma segunda seqüência, em que a seqüência promotora inicia e media a transcrição da seqüência de DNA correspondendo à segunda seqüência. Geralmente, operavelmente ligado significa que as seqüências de ácido nucleico que estão sendo ligadas são contínuas e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteína, contínuas e na mesma rede de leitura. O cassete pode, adicionalmente, conter pelo menos um gene adicional a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(is) pode(m) ser proporcionado(s) sobre múltiplos cassetes de expressão.

Tal cassete de expressão é proporcionado com um pluralidade de sítios de restrição para inserção da seqüência de polinucleotídeo de AHASL a estar sob a regulação transcricional das regiões regulatórias. O cassete de expressão pode, adicionalmente, conter genes marcadores

selecionáveis.

O cassete de expressão incluirá, na direção 5'-3' de transcrição, uma região de início de transcrição e tradução (isto é, um promotor), uma sequência de polinucleotídeo de AHASL da invenção e uma região de término de transcrição e tradução (isto é, região terminadora) funcional em plantas. O promotor pode ser nativo ou análogo ou estranho ou heterólogo ao hospedeiro vegetal e/ou à sequência de polinucleotídeo de AHASL da invenção. adicionalmente, o promotor pode ser a sequência natural ou, alternativamente, uma sequência sintética. Onde o promotor é "estranho" ou "heterólogo" ao hospedeiro vegetal, pretende-se que o promotor não seja encontrado na planta nativa na qual o promotor é introduzido. Onde o promotor é "estranho" ou "heterólogo" à sequência de polinucleotídeo da invenção, pretende-se que o promotor não seja nativo ou um promotor que ocorre naturalmente para a sequência de polinucleotídeo de AHASL operavelmente ligada da invenção.

Conforme usado aqui, um gene quimérico compreende uma sequência de codificação operavelmente ligada a uma região de início de transcrição que é heteróloga à sequência de codificação.

Embora possa ser preferível expressar os polinucleotídeos de AHASL da invenção usando promotores heterólogos, as sequências promotoras nativas podem ser usadas. Tais estruturas alterariam os níveis de expressão da proteína de AHASL na planta ou célula de planta. Assim, o fenotipo da planta ou célula de planta é alterado.

A região terminadora pode ser nativa com a região de início de transcrição, pode ser nativa com a sequência de AHASL operavelmente ligada de interesse, pode ser nativa com o hospedeiro vegetal ou pode ser derivada de outra fonte (isto é, estranha ou heteróloga ao promotor, a sequência de polinucleotídeo de AHASL de interesse, o hospedeiro vegetal ou qualquer combinação dos mesmos). Regiões terminadoras convenientes estão

disponíveis do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, tais como as regiões terminadoras de sintase de nopalina e sintase de octopina. Veja também Guerineau e colaboradores (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671-674; Sanfacon e colaboradores (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen e colaboradores (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe e colaboradores (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas e colaboradores (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; e Joshi e colaboradores (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639.

Onde apropriado, o(s) gene(s) pode(m) ser otimizado para expressão aumentada na planta transformada. Isto é, os genes podem ser sintetizados usando códons planta-preferidos para expressão aperfeiçoada. Veja, por exemplo, Campbell e Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 para uma discussão de uso de códon hospedeiro-preferido. Métodos estão disponíveis na técnica para a síntese de genes planta-preferidos. Veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.380.831 e 5.436.391 e Murray e colaboradores (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, aqui incorporada por referência.

Modificações de seqüência adicionais são conhecidas por intensificar a expressão de gene em um hospedeiro celular. Essas incluem eliminação de seqüências que codificam sinais de poliadenilação falsas, sinais de sítio de união de éxon-íntron, repetições semelhantes a transposon e outras de tais seqüências bem caracterizadas que podem ser prejudiciais à expressão de gene. O teor de G-C da seqüência pode ser ajustado para níveis médios para um determinado hospedeiro celular, conforme calculado através de referência a genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas de mRNA secundárias de hairpin previstas.

Seqüências de nucleotídeo para intensificação de expressão de gene também podem ser usadas nos vetores de expressão de planta. Essas incluem os íntrons de AdhI de milho, gene íntron1 (Callis e colaboradores.

Genes and Development 1: 1183-1200, 1987) e seqüências líderes (W-seqüência) do vírus Mosaico de Tabaco (TMV), Vírus da Mancha Clorótica de Milho e vírus Mosaica da Alfafa (Gallie e colaboradores. Nucleic Acid Res. 15: 8693-8711, 1987 e Skuzeski e colaboradores, Plant Mol. Biol. 15: 65-79, 1990). Foi mostrado que o primeiro íntrons do *locus* shrunken-1 de milho aumenta a expressão de genes em estruturas genéticas quiméricas. As Patentes U.S. 5.424.412 e 5.593.874 divulgam o uso de íntrons específicos nas estruturas de expressão de gene e Gallie e colaboradores (Plant Physiol. 106: 929-939, 1994) também mostraram que íntrons são úteis para a regulação de expressão de gene em uma base tecido-específica. Para intensificar ou otimizar adicionalmente expressão do gene da grande subunidade de AHAS, os vetores de expressão de planta da invenção também podem conter seqüências de DNA contendo regiões de fixação de matriz (MARs). Células de planta transformadas com tais sistemas de expressão modificados, então, podem exibir superexpressão ou expressão constitutiva de uma seqüência de nucleotídeo da invenção.

Os cassetes de expressão podem, adicionalmente, conter seqüências líderes 5' na estrutura de cassete de expressão. Tais seqüências líderes podem atuar para intensificar a tradução. Líderes de tradução são conhecidos na técnica e incluem: líderes de picornavírus, por exemplo, o líder de EMCV (região de não codificação 5' de *Encephalomyo carditis*) (Elroy-Stein e colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130); líderes de potyvírus, por exemplo, o líder de TEV (Vírus Etch de Tabaco) (Gallie e colaboradores (1995) *Gene* 165(2): 233-238), o líder de MDMV (Vírus Mosaico Anão de Milho) (*Virology* 154: 9-20) e proteína de ligação à cadeia pesada de imunoglobulina humana (BiP) (Macejak e colaboradores (1991) *Nature* 353: 90-94); líder não traduzido do mRNA de proteína do envelope do vírus mosaico de alfafa (RNA 4 de AMV) (Jobling e colaboradores (1987) *Nature* 325: 622-625); líder do vírus mosaico de tabaco

(TMV) (Gallie e colaboradores (1989) em *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, Nova Iorque), páginas 237-256); e o líder do vírus da mancha clorótica de milho (MCMV) (Lommel e colaboradores (1991) *Virology* 81: 382-385). Veja também Della-Cioppa e colaboradores (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968. Outros métodos conhecidos por intensificar a tradução também podem ser utilizados, por exemplo, íntrons e semelhantes.

No preparo do cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de modo a proporcionar as seqüências de DNA na orientação apropriada e, conforme adequado, na rede de leitura apropriada.

Para essa finalidade, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para unir os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem estar envolvidas para proporcionar sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição ou semelhante. Para essa finalidade, mutagênese *in vitro*, reparo de iniciador, restrição, anelamento, re-substituições, por exemplo, transições e transversões, podem estar envolvidos.

Uma série de promotores podem ser usados na prática da invenção. Os promotores podem ser selecionados baseado no resultado desejado. Os ácidos nucleicos podem ser combinados com promotores constitutivos, tecido-preferidos ou outros para expressão em plantas.

Tais promotores constitutivos incluem, por exemplo, o promotor central do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos divulgados no WO 99/43838 e Patente U.S. 6.072.050; o promotor central de CaMV 35S (Odell e colaboradores (1985) *Nature* 313: 810-812); actina de arroz (McElroy e colaboradores (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christensen e colaboradores (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 e Christensen e colaboradores (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last e colaboradores (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten e colaboradores (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); promotor ALS (Patente U.S. 5.659.026) e semelhantes. Outros promotores constitutivos incluem, por

exemplo, Patentes U.S. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; e 6.177.611.

Promotores tecido-específicos podem ser utilizados para objetivar expressão de AHASL1 intensificada dentro de um tecido de planta em particular. Tais promotores tecido-preferidos incluem, mas não estão limitados a, promotores folha-preferidos, promotores raiz-preferidos, promotores semente-preferidos e promotores caule-preferidos. Promotores tecido-preferidos incluem Yamamoto e colaboradores (1997) *Plant J.* 12(2): 255-265; Kawamata e colaboradores (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7): 792-803; Hansen e colaboradores (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3): 337-343; Russell e colaboradores (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart e colaboradores (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp e colaboradores (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535; Canevascini e colaboradores (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 513-524; Yamamoto e colaboradores (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco e colaboradores (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka e colaboradores (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20): 9586-9590; e Guevara-Garcia e colaboradores (1993) *Plant J* 4(3): 495-505. Tais promotores podem ser modificados, se necessário, para expressão fraca.

Em uma modalidade, os ácidos nucleicos de interesse são objetivados ao cloroplasta para expressão. Dessa maneira, onde o ácido nucleico de interesse não é diretamente inserido no cloroplasta, o cassete de expressão conterá, adicionalmente, uma seqüência de objetivação de cloroplasta compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo de trânsito em cloroplasta para direcionar o produto genético de interesse aos cloroplastas. Tais peptídeos de trânsito são conhecidos na técnica. Com relação às seqüências de objetivação de cloroplasta, "operavelmente ligado" significa que a seqüência de ácido nucleico que

codifica um peptídeo de trânsito (isto é, a seqüência de objetivação de cloroplasta) está ligada ao polinucleotídeo de *AHASL* da invenção, de modo que as duas seqüências são contínuas e estejam na mesma rede de leitura. Veja, por exemplo, Von Heijne e colaboradores (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark e colaboradores (1989) *J Biol. Chem.* 264: 17544-17550; Della-Cioppa e colaboradores (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968; Romer e colaboradores (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; e Shah e colaboradores (1986) *Science* 233: 478-481. Embora as proteínas de *AHASL* da invenção incluam um peptídeo de trânsito em cloroplasta nativo, qualquer peptídeo de trânsito em cloroplasta conhecido na técnica pode ser fundido à seqüência de aminoácido de uma proteína de *AHASL* madura da invenção através de ligação operável de uma seqüência de objetivação de cloroplasta à extremidade 5' da seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de *AHASL* madura da invenção.

Seqüências de objetivação de cloroplasta são conhecidas na técnica e incluem a pequena subunidade de cloroplasta de carboxilase de ribulose-1,5-bisfosfato) (de Castro Silva Filho e colaboradores (1996) *Plant Mol. Biol.* 30: 769-780; Schnell e colaboradores (1991) *J Biol. Chem.* 266(5): 3335-3342); sintase de 5-(enolpiruvil)shikimato-3-fosfato (EPSPS) (Archer e colaboradores (1990) *J Bioenerg. Biomemb.* 22(6): 789-810); sintase de triptofano (Zhao e colaboradores (1995) *J Biol. Chem.* 270(11): 6081-6087); plastocianina (Lawrence e colaboradores (1997) *J Biol. Chem.* 272(33): 20357-20363); sintase de corismato (Schmidt e colaboradores (1993) *J Biol. Chem.* 268(36): 27447-27457); e a proteína de ligação à clorofila a/b de coleta de luz (LHBP) (Lamppa e colaboradores (1988) *J Biol. Chem.* 263: 14996-14999). Veja também Von Heijne e colaboradores (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark e colaboradores (1989) *J Biol. Chem.* 264: 17544-17550; Della-Cioppa e colaboradores (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968; Romer e colaboradores (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:

1414-1421; e Shah e colaboradores (1986) *Science* 233: 478-481.

Métodos para transformação de cloroplastas são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Svab e colaboradores (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8526-8530; Svab e Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917; Svab e Maliga (1993) *EMBO J.* 12: 601-606. O método conta com a distribuição, por pistola de partículas, de DNA contendo um marcador selecionável e objetivação do DNA ao genoma do plastídeo através de recombinação homóloga. Adicionalmente, transformação de plastídeo pode ser obtida através de transativação de um transgene abrigado em plastídeo silencioso através de expressão tecido-preferida de uma RNA polimerase plastídeo-direcionada e nuclear-codificada. Tal sistema foi reportado em McBride e colaboradores (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7301-7305.

Os ácidos nucleicos de interesse a serem objetivados ao cloroplasta podem ser otimizados para expressão no cloroplasta para levar em conta diferenças no uso de códon entre o núcleo da planta e esse organela. Dessa maneira, os ácidos nucleicos de interesse podem ser sintetizados usando códons cloroplasta-preferidos. Veja, por exemplo, Patente U.S. 5.380.831, aqui incorporada por referência.

Conforme divulgado aqui, as seqüências de nucleotídeo de AHASL da invenção encontram uso na intensificação da tolerância a herbicida de plantas que compreendem, em seus genomas, um gene que codifica uma proteína de AHASL tolerante a herbicida. Tal gene pode ser um gene endógeno ou um transgene. Adicionalmente, em determinadas modalidades, as seqüências de ácido nucleico da presente invenção podem ser empilhadas com qualquer combinação de seqüências de polinucleotídeo de interesse de forma a criar plantas com um fenotipo desejado. Por exemplo, os polinucleotídeos da presente invenção podem ser empilhados com quaisquer outros polinucleotídeos que codificam polipeptídeos tendo atividade pesticida e/ou inseticida tais como, por exemplo, as proteínas da toxina de *Bacillus*

thuringiensis (descritas nas Patentes U.S. 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser e colaboradores (1986) *Gene* 48: 109). As combinações geradas também podem incluir múltiplas cópias de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse.

5 É reconhecido que, com essas seqüências de nucleotídeo, estruturas anti-senso, complementares a pelo menos uma porção do RNA mensageiro (mRNA) para as seqüências de polinucleotídeo de AHASL podem ser construídas. Nucleotídeos anti-senso são construídos para se hibridizar com o mRNA correspondente. Modificações das seqüências anti-
10 senso podem ser feitas na medida em que as seqüências se hibridizem a e interfiram com a expressão do mRNA correspondente. Dessa maneira, estruturas anti-senso tendo 70%, de preferência 80%, mais preferivelmente 85% de identidade de seqüência às seqüências anti-senso correspondentes podem ser usadas. Além disso, porções dos nucleotídeos anti-senso podem ser
15 usadas para romper a expressão do gene alvo. Geralmente, seqüências de pelo menos 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos ou mais podem ser usadas.

 As seqüências de nucleotídeo da presente invenção podem também ser usadas na orientação senso para suprimir a expressão de genes
20 endógenos em plantas. Métodos para supressão de expressão de gene em plantas usando seqüências de nucleotídeo na orientação senso são conhecidos na técnica. Os métodos geralmente envolvem transformação de plantas com uma estrutura de DNA compreendendo um promotor que aciona expressão em uma planta operavelmente ligado a pelo menos uma porção de uma
25 seqüência de nucleotídeo que corresponde ao transcrito do gene endógeno. Tipicamente, tal seqüência de nucleotídeo tem identidade de seqüência substancial à seqüência do transcrito do gene endógeno, de preferência mais do que cerca de 65% de identidade de seqüência, mais preferivelmente mais de cerca de 85% de identidade de seqüência, ainda mais preferivelmente mais

de cerca de 95% de identidade de sequência. Veja Patentes U.S. 5.283.184 e 5.034.323; aqui incorporadas por referência.

Embora os polinucleotídeos de AHASL1 resistentes a herbicida da invenção encontrem uso como genes marcadores selecionáveis para transformação de planta, os cassetes de expressão da invenção podem incluir outro gene marcador selecionável para a seleção de células transformadas. Genes marcadores selecionáveis, incluindo aqueles da presente invenção, são utilizados para a seleção de células ou tecidos transformados. Genes marcadores incluem, mas não estão limitados a, genes que codificam resistência a antibiótico, tais como aqueles que codificam fosfotransferase II de neomicina (NEO) e fosfotransferase de higromicina (HPT), bem como genes que conferem resistência a compostos herbicidas, tais como glifosinato de amônio, bromoxinila, imidazolinonas e 2,4-diclorofenóxiacetato (2,4-D). Veja, de modo geral, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3: 506-511; Christopherson e colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6314-6318; Yao e colaboradores (1992) *Cell* 11: 63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2419-2422; Barkley e colaboradores (1980) em *The Operon*, páginas 177-220; Hu e colaboradores (1987) *Cell* 48: 555-566; Brown e colaboradores (1987) *Cell* 49: 603-612; Figge e colaboradores (1988) *Cell* 52: 713-722; Deuschle e colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400-5404; Fuerst e colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2549-2553; Deuschle e colaboradores (1990) *Science* 248: 480-483; Gossen (1993) Tese de Ph.D., University of Heidelberg; Reines e colaboradores (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow e colaboradores (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3343-3356; Zambretti e colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3952-3956; Bairn e colaboradores (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072-5076; Wyborski e colaboradores (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10: 143-162; Degenkolb

e colaboradores (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt e colaboradores (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) Tese de Ph.D., University of Heidelberg; Gossen e colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551; Oliva e colaboradores (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 913-919; Hlavka e colaboradores (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill e colaboradores (1988) *Nature* 334: 721-724. Tais divulgações são aqui incorporadas por referência.

A lista acima de genes marcadores selecionáveis não se destina a ser limitativa. Qualquer gene marcador selecionável pode ser usado na presente invenção.

As moléculas de polinucleotídeo isoladas compreendendo seqüências de nucleotídeo que codificam as proteínas de AHASL da invenção podem ser usadas em vetores para transformar plantas, de modo que as plantas criadas tenham resistência intensificada a herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona. As moléculas de polinucleotídeo de AHASL isoladas da invenção podem ser usadas em vetores sozinhas ou em combinação com uma seqüência de nucleotídeo que codifica a pequena subunidade da enzima AHAS (AHASS) ao conferir resistência a herbicida em plantas. Veja Patente U.S. 6.348.643; a qual é aqui incorporada por referência.

A invenção também se refere a um vetor de expressão de planta compreendendo um promotor que aciona expressão em uma planta operavelmente ligada a uma molécula de polinucleotídeo da invenção. A molécula de polinucleotídeo isolada compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL, particularmente uma proteína de AHASL compreendendo uma seqüência de aminoácido que é apresentada em SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8 ou um fragmento funcional e variante da mesma. O vetor de expressão de planta da invenção não depende

de um promotor em particular, apenas que tal promotor seja capaz de acionar a expressão de gene em uma célula de planta. Promotores preferidos incluem promotores constitutivos e promotores tecido-preferidos.

Os vetores de transformação da invenção podem ser usados para produzir plantas transformadas com um gene de interesse. O vetor de transformação compreenderá um gene marcador selecionável da invenção e um gene de interesse a ser introduzido e, tipicamente, expresso na planta transformada. Tal gene marcador selecionável compreende um polinucleotídeo de AHASL resistente a herbicida da invenção operavelmente ligado a um promotor que aciona expressão em uma célula hospedeira. Para uso em plantas e células de planta, o vetor de transformação compreende um gene marcador selecionável compreendendo um polinucleotídeo de AHASL resistente a herbicida da invenção operavelmente ligado a um promotor que aciona expressão em uma célula de planta.

O gene de interesse da invenção varia, dependendo do resultado desejado. Por exemplo, várias alterações no fenotipo podem ser de interesse, incluindo modificação da composição de ácido graxo em uma planta, alteração do teor de aminoácido de uma planta, alteração dos mecanismos de defesa da planta contra insetos e/ou patógenos e semelhantes. Esses resultados podem ser obtidos proporcionando expressão de produtos heterólogos ou expressão aumentada de produtos endógenos em plantas. Alternativamente, os resultados podem ser obtidos proporcionando uma redução de expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas ou co-fatores na planta. Essas alterações resultam em uma alteração no fenotipo da planta transformada.

Em uma modalidade da invenção, os genes de interesse incluem genes de resistência a inseto tais como, por exemplo, genes da proteína de toxina de *Bacillus thuringiensis* (Patentes U.S. 5.366.892; 5.747.450; 5.736.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser e colaboradores (1986)

Gene 48: 109).

As proteínas ou polipeptídeos de AHASL da invenção podem ser purificados, por exemplo, de plantas de girassol e podem ser usados em composições. Também, uma molécula de polinucleotídeo isolada que codifica
5 uma proteína de AHASL da invenção pode ser usada para expressar uma proteína de AHASL da invenção em um micróbio, tal como *E. coli* ou um levedo. A proteína de AHASL expressa pode ser purificada de extratos de *E. coli* ou levedo através de qualquer método conhecido por aqueles habilitados na técnica.

10 A invenção também se refere a um método para a criação de uma planta transgênica que é resistente a herbicidas compreendendo transformação de uma planta com um vetor de expressão de planta compreendendo um promotor que aciona expressão em uma planta operavelmente ligada a uma molécula de polinucleotídeo isolada da invenção.
15 A molécula de polinucleotídeo isolada compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL da invenção, particularmente uma proteína de AHASL compreendendo: uma seqüência de aminoácido que é apresentada em SEQ ID NO:2, uma seqüência de aminoácido codificada por SEQ ID NO:1 ou um fragmento e variante
20 funcional das referidas seqüências de aminoácido.

A invenção também se refere à plantas de girassol não-transgênicas, plantas transgênicas produzidas através dos métodos da invenção e prole e outros descendentes de tais plantas não-transgênicas e transgênicas, plantas as quais exibem resistência intensificada ou aumentada a
25 herbicidas que interferem com a enzima AHAS, particularmente herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

Os polinucleotídeos de AHASL da invenção, particularmente aqueles que codificam proteínas de AHASL resistentes a herbicida, encontram uso em métodos para intensificação da resistência de plantas

tolerantes a herbicida. Em uma modalidade da invenção, as plantas tolerantes a herbicida compreendem uma proteína de AHASL tolerante a herbicida ou resistente a herbicida. As plantas tolerantes a herbicida incluem plantas transformadas com uma seqüência de nucleotídeo de AHASL tolerante a herbicida e plantas que compreendem, em seus genomas, um gene endógeno que codifica uma proteína de AHASL tolerante a herbicida. Seqüências de nucleotídeo que codificam proteínas de AHASL tolerantes a herbicida e plantas tolerantes a herbicida compreendendo um gene endógeno que codifica uma proteína de AHASL tolerante a herbicida incluem os polinucleotídeos e plantas da presente invenção e aqueles que são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.013.659. 5.731.180. 5.767.361. 5.545.822. 5.736.629. 5.773.703. 5.773.704. 5.952.553 e 6.274.796; todas as quais são aqui incorporadas por referência. Tais métodos para intensificação da resistência de plantas tolerantes a herbicida compreendem transformação de uma planta tolerante a herbicida com pelo menos uma estrutura de polinucleotídeo compreendendo um promotor que aciona expressão em uma célula de planta que é operavelmente ligado a um polinucleotídeo de AHASL resistente a herbicida da invenção, particularmente o polinucleotídeo que codifica uma proteína de AHASL resistente a herbicida apresentada em SEQ ID NO:1, polinucleotídeos que codificam a seqüência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO:2 e fragmentos e variantes dos referidos polinucleotídeos que codificam polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida.

Numerosos vetores e métodos de transformação de planta para a transformação de planta estão disponíveis. Veja, por exemplo, An, G. e colaboradores (1986) *Plant Physiol*, 81: 301-305; Fry, J. e colaboradores (1987) *Plant Cell Rep.* 6: 321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76: 767-774; Hinchey e colaboradores (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203212.203-212; Cousins e colaboradores (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 481-494;

- Chee, P. P. e Slightom, J. L. (1992) *Gene*. 118: 255-260; Christou e colaboradores (1992) *Trends. Biotechnol.* 10: 239-246; DHalluin e colaboradores (1992) *Bio/Technol.* 10: 309-314; Dhir e colaboradores (1992) *Plant Physiol.* 99: 81-88; Casas e colaboradores (1993) *Proc. Nat. Acad Sci. USA* 90: 11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*; 29P: 119-124; Davies e colaboradores (1993) *Plant Cell Rep.* 12: 180-183; Dong, J. A. e Mchughen, A. (1993) *Plant Sci.* 91: 139-148; Franklin, C. I. e Trieu, T. N. (1993) *Plant. Physiol.* 102: 167; Golovkin e colaboradores (1993) *Plant Sci.* 90: 41-52; Guo, Chin *Sci. Bull.* 38: 2072-2078; Asano e colaboradores (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. e Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13: 219-239; Barcelo e colaboradores (1994) *Plant. J.* 5: 583-592; Becker e colaboradores (1994) *Plant. J.* 5: 299-307; Borkowska e colaboradores (1994) *Acta. Physiol Plant.* 16: 225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5: 17-27; Eapen e colaboradores (1994) *Plant Cell Rep.* 13: 582-586; Hartman e colaboradores (1994) *Bio-Technology* 12: 919-923; Ritala e colaboradores (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24: 317-325; e Wan, Y. C. e Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104: 3748.

Os métodos da invenção envolvem introdução de uma estrutura de polinucleotídeo em uma planta. Por "introdução" entenda-se apresentação, à planta, da estrutura de polinucleotídeo de uma maneira que a estrutura obtém acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos da invenção não dependem de um método em particular para introdução de uma estrutura de polinucleotídeo em uma planta, apenas que a estrutura de polinucleotídeo obtenha acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Métodos para introdução de estruturas de polinucleotídeo em plantas são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória e métodos vírus-mediados.

Por "transformação estável" entenda-se que a estrutura de

polinucleotídeo introduzida em uma planta se integra ao genoma da planta e é capaz de ser herdada pela prole da mesma. Por "transformação transitória" entenda-se que uma estrutura de polinucleotídeo introduzida em uma planta não se integra no genoma da planta.

5 Para a transformação de plantas e células de planta, as seqüências de nucleotídeo da invenção são inseridas usando técnicas padrões em qualquer vetor conhecido na técnica que é adequado para expressão das seqüências de nucleotídeo em uma planta ou célula de planta. A seleção do
10 vetor depende da técnica de transformação preferida e da espécie de planta alvo a ser transformada. Em uma modalidade da invenção, a seqüência de nucleotídeo de AHASL1 é operavelmente ligada a um promotor de planta que é conhecido por expressão em alto nível em uma célula de planta e essa estrutura é, então, introduzida em uma planta que é suscetível a um herbicida de imidazolinona e uma planta transformada é regenerada. A planta
15 transformada é tolerante à exposição a um alto nível de um herbicida de imidazolinona que mataria ou prejudicaria significativamente uma planta não transformada. Esse método pode ser aplicado a qualquer espécie de planta; contudo, ele é mais benéfico quando aplicado à plantas de safra.

 Metodologias para a construção de cassetes de expressão de
20 planta e introdução de ácidos nucleicos estranhos em plantas são geralmente conhecidos na técnica e foram anteriormente descritos. Por exemplo, DNA estranho pode ser introduzido em plantas usando vetores de plasmídeo de indução de tumor (Ti). Outros métodos utilizados para a distribuição de DNA estranho envolvem o uso de transformação de protoplasta PEG-mediada,
25 eletroporação, iscas de microinjeção e biolística ou bombardeamento de micro projétil para captação direta de DNA. Tais métodos são conhecidos na técnica (Patente U.S. 5.405.765 para Vasil e colaboradores; Bilang e colaboradores (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid e colaboradores, (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 228: 104-112; Guerche e colaboradores (1987) *Plant Science* 52: 111-116;

Neuhaus e colaboradores, (1987) *Theor. Appl Genet.* 75: 30-36; Klein e colaboradores, (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell e colaboradores (1980) *Science* 208: 1265; Horsch e colaboradores (1985) *Science* 227: 1229-1231; DeBlock e colaboradores (1989) *Plant Physiology* 91: 694-701; *Methods for*
 5 *Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988) e *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press, Inc. (1989). O método de transformação depende da célula de planta a ser transformada, estabilidade dos vetores usados, nível de expressão dos produtos genéticos e outros parâmetros.

10 Outros métodos adequados de introdução de seqüências de nucleotídeo em células de planta e subsequente inserção no genoma da planta incluem microinjeção, conforme em Crossway e colaboradores (1986) *Biotechniques* 4: 320-334, eletroporação, conforme descrito por Riggs e colaboradores (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606,
 15 transformação *Agrobacterium*-mediada, conforme descrito por Townsend e colaboradores, Patente U.S. 5.563.055, Zhao e colaboradores, Patente U.S. 5.981.840, transferência direta de gene, conforme descrito por Paszkowski e colaboradores (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722 e aceleração de partícula balística, conforme descrito, por exemplo, em Sanford e colaboradores,
 20 Patente U.S. 4.945.050; Tomes e colaboradores, Patente U.S. 5.879.918; Tomes e colaboradores, Patente U.S. 5.886.244; Bidney e colaboradores, Patente U.S. 5.932.782; Tomes e colaboradores (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment" em *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips
 25 (Springer-Verlag, Berlin); McCabe e colaboradores (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); e transformação com *Lec1* (WO 00/28058). Veja também Weissinger e colaboradores (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford e colaboradores (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (cebola); Christou e colaboradores (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (soja); McCabe e

colaboradores (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (soja); Finer e McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (soja); Singh e colaboradores (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (soja); Datta e colaboradores (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (arroz); Klein e colaboradores (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (milho); Klein e colaboradores (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (milho); Tomes, Patente U.S. 5.240.855; Buising e colaboradores, Patentes U.S. 5.322.783 e 5.324.646; Tomes e colaboradores (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer- Verlag, Berlin) (milho); Klein e colaboradores (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (milho); Fromm e colaboradores (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren e colaboradores (1984) *Nature* (Londres) 311: 763-764; Bowen e colaboradores, Patente U.S. 5.736.369 (cereais); Bytebier e colaboradores (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet e colaboradores (1985) em *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman e colaboradores (Longman, Nova Iorque), páginas 197-209 (pólen); Kaeppler e colaboradores (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 e Kaeppler e colaboradores (1992) *Theor. Apph Genet.* 84: 560-566 (transformação isca-mediada); D'Halluin e colaboradores (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (eletroporação); Li e colaboradores (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250- 255 e Christou e Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (arroz); Osjoda e colaboradores (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (milho via *Agrobacterium tumefaciens*); todos os quais são aqui incorporados por referência.

Os polinucleotídeos da invenção podem ser introduzidos em plantas através de contato das plantas com um vírus ou ácidos nucleicos virais. Geralmente, tais métodos envolvem incorporação de uma estrutura de polinucleotídeo da invenção dentro de uma molécula de DNA ou RNA viral.

É reconhecido que a proteína de AHASL da invenção pode ser inicialmente sintetizada como parte de uma poliproteína viral, a qual depois pode ser processada através de proteólise *in vitro* ou *in vivo* para produzir a proteína recombinante desejada. Ainda, É reconhecido que os promotores da invenção também abrangem promotores utilizados para transcrição através de RNA polimerases virais. Métodos para introdução de estruturas de polinucleotídeo em plantas e expressão de uma proteína codificada nas mesmas envolvendo moléculas de DNA ou RNA virais são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931; aqui incorporadas por referência.

As células que foram transformadas podem ser crescidas em plantas de acordo com formas convencionais. Veja, por exemplo, McCormick e colaboradores (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Essas plantas podem, então, ser crescidas e polinizadas com a mesma cepa ou diferentes cepas transformadas e o híbrido resultante tendo expressão constitutiva do fenotipo desejado característico identificado. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para assegurar que expressão da característica fenotípica desejada é estavelmente mantida e herdada e, então, sementes colhidas para assegurar expressão da característica fenotípica desejada são obtidas. Dessa maneira, a presente invenção proporciona semente transformada (também referida como "semente transgênica") tendo uma estrutura de polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, estavelmente incorporado em seu genoma.

A presente invenção pode ser usada para a transformação de quaisquer espécies de planta, incluindo, mas não limitado a, monocots e dicots. Exemplos de espécies de planta de interesse incluem, mas não estão limitados a, milho (*Zea mays*), Brassica sp. (por exemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquelas espécies de Brassica úteis como fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio

(*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), painço (por exemplo, painço perolado (*Pennisetum glaucum*), painço proso (*Panicum miliaceum*), painço caule de raposa (*Setaria italica*), painço finger (*Eleusine coracana*)), girassol (*Helianthus annuus*), açafrão (*Carthamus tinctorius*),
 5 trigo (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum ssp. durum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoins (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.),
 10 coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), guava (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), papaia (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterrabas sacarínicas (*Beta vulgaris*),
 15 cana de açúcar (*Saccharum* spp.), aveias, cevada, vegetais, ornamentais e coníferas. De preferência, as plantas da presente invenção são plantas de safra (por exemplo, girassol, *Brassica* sp., algodão, cana de açúcar, beterraba, soja, amendoim, alfafa, açafrão, tabaco, milho, arroz, trigo, centeio, cevada, mandioca, sorgo, painço, etc.).

20 As plantas resistentes a herbicida da invenção encontram uso em métodos para o controle de ervas daninhas. Assim, a presente invenção ainda proporciona um método para o controle de ervas daninhas na proximidade de uma planta resistente a herbicida da invenção. O método compreende aplicação de uma quantidade eficaz de um herbicida às ervas
 25 daninhas e à planta resistente a herbicida, em que a planta tem resistência aumentada a pelo menos um herbicida, particularmente, um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia, quando comparado com uma planta do tipo silvestre. Em tal método para o controle de ervas daninhas, as plantas resistentes a herbicida da invenção são, de preferência, plantas de safra

incluindo, mas não limitado a, girassol, alfafa, *Brassica* sp., soja, algodão, açafrão, amendoim, tabaco, tomate, batata, trigo, arroz, milho, sorgo, cevada, centeio, painço e sorgo.

5 Fornecendo plantas tendo resistência aumentada a herbicida, particularmente herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia, uma ampla variedade de formulações podem ser empregadas para a proteção de plantas contra ervas daninhas, de modo a intensificar o crescimento da planta e reduzir a competição por nutrientes. Um herbicida pode ser usado em si para o controle pré-emergência, pós-emergência, pré-plantio e no plantio de ervas daninhas em áreas que circundam as plantas descritas aqui ou uma 10 formulação de herbicida de imidazolinona pode ser usada, a qual contém outros aditivos. O herbicida pode também ser usado como um tratamento para semente. Isto é, uma concentração eficaz ou uma quantidade eficaz do herbicida ou uma composição compreendendo uma concentração eficaz ou quantidade eficaz do herbicida pode ser aplicada diretamente às sementes 15 antes de ou durante o plantio das sementes. Aditivos encontrados em uma formulação ou composição de imidazolinona ou imidazolinona incluem outros herbicidas, detergentes, adjuvantes, agentes de dispersão, agentes de aderência, agentes de estabilização ou semelhante. A formulação de herbicida 20 pode ser um preparado úmido ou seco e pode incluir, mas não está limitado a, pós-fluidos, concentrados emulsificados e concentrados líquidos. O herbicida e formulações de herbicida podem ser aplicados de acordo com métodos convencionais, por exemplo, através de pulverização, irrigação, polvilhamento, revestimento e semelhantes.

25 A presente invenção proporciona sementes não-transgênicas e transgênicas com resistência aumentada a pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida que inibe a AHASL. Tais sementes incluem, por exemplo, sementes de girassol não-transgênicas compreendendo as características de resistência a herbicida da planta com Número de Depósito

de Patente na ATCC PTA-6325 e sementes transgênicas compreendendo uma molécula de polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína de AHASL1 resistente a herbicida.

5 A presente invenção proporciona métodos para a produção de uma planta resistência a herbicida, particularmente uma planta de girassol resistente a herbicida, através de reprodução de planta convencional envolvendo reprodução sexual. Os métodos compreendem cruzamento de uma primeira planta que é resistente a um herbicida com uma segunda planta que não é resistente ao herbicida. A primeira planta pode ser qualquer uma
10 das plantas resistentes a herbicida da presente invenção incluindo, por exemplo, plantas transgênicas compreendendo pelo menos um dos polinucleotídeo da presente invenção que codifica uma AHASL resistente a herbicida e plantas de girassol não transgênicas que compreendem as características de resistência a herbicida da planta de girassol com Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325. A segunda planta pode ser qualquer
15 planta que é capaz de produzir plantas de prole viáveis (isto é, sementes) quando cruzada com a primeira planta. Tipicamente, mas não necessariamente, as primeira e segunda plantas são da mesma espécie. Os métodos da invenção podem ainda envolver uma ou mais gerações de re-
20 cruzamento das plantas de prole do primeiro cruzamento com uma planta da mesma linhagem ou genotipo que as primeira ou segunda plantas. Alternativamente, a prole do primeiro cruzamento ou qualquer cruzamento subsequente pode ser cruzada com uma terceira planta que é de uma linhagem ou genotipo diferente das primeira ou segunda plantas. Os métodos da
25 invenção podem, adicionalmente, envolver seleção de plantas que compreendem as características de resistência da primeira planta.

A presente invenção ainda proporciona métodos para aumento da resistência a herbicida de uma planta, particularmente uma planta de girassol resistente a herbicida, através de produção convencional de planta

envolvendo reprodução sexual. Os métodos compreendem cruzamento envolvendo reprodução sexual. Os métodos compreendem cruzamento de uma primeira planta que é resistente a um herbicida com uma segunda planta que pode ou não ser resistente ao herbicida ou pode ser resistente a um herbicida ou herbicidas diferentes da primeira planta. A primeira planta pode ser qualquer uma das plantas resistentes a herbicida da presente invenção incluindo, por exemplo, plantas transgênicas compreendendo pelo menos um dos polinucleotídeos da presente invenção que codifica uma AHASL resistente a herbicida e plantas de girassol não transgênicas que compreendem as características de resistência a herbicida da planta de girassol com Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325. A segunda planta pode ser qualquer planta que é capaz de produzir plantas de prole viáveis (isto é, sementes) quando cruzada com a primeira planta. Tipicamente, mas não necessariamente, as primeira e segunda plantas são da mesma espécie. As plantas de prole produzidas através desse método da presente invenção têm resistência aumentada a um herbicida quando comparado com as primeira ou segunda plantas ou ambas. Quando as primeira e segunda plantas são resistentes a herbicidas diferentes, as plantas de prole terão as características de resistência a herbicida das primeira e segunda plantas. Os métodos da invenção podem ainda envolver uma ou mais gerações de re-cruzamento das plantas de prole do primeiro cruzado com uma planta da mesma linhagem ou genotipo que as primeira ou segunda plantas. Alternativamente, a prole do primeiro cruzamento ou qualquer cruzamento subsequente pode ser cruzada com uma terceira planta que é de uma linhagem ou genotipo diferente das primeira ou segunda plantas. Os métodos da invenção podem, adicionalmente, envolver seleção de plantas que compreendem as características de resistência da primeira planta, da segunda planta ou das primeira e segunda plantas.

As plantas da presente invenção podem ser transgênicas ou não transgênicas. Um exemplo de uma planta de girassol não transgênicas

tendo resistência aumentada a herbicidas de imidazolinona e/ou sulfoniluréia inclui a planta de girassol (MUT9) tendo Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325; ou derivado mutante, recombinante ou geneticamente manipulado da planta tendo Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325 para; ou de qualquer prole da planta tendo Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325; ou uma planta que é uma prole de qualquer uma dessas plantas; ou uma planta que compreende as características de resistência a herbicida da planta tendo Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325.

10 A presente invenção também proporciona plantas, órgãos de planta, tecidos de planta, células de planta, sementes e células hospedeiras não-humanas que são transformadas com pelo menos uma molécula de polinucleotídeo, cassete de expressão ou vetor de transformação da invenção. Tais plantas, órgãos de planta, tecidos de planta, células de planta, sementes e
15 células hospedeiras não-humanas transformadas têm tolerância ou resistência intensificada a pelo menos um herbicida, em níveis do herbicida que matam ou inibem o crescimento de uma planta, tecido de planta, célula de planta ou célula hospedeira não humana não transformada, respectivamente. De preferência, as plantas, tecidos de planta, células de planta e sementes
20 transformadas da invenção são *Arabidopsis thaliana* e plantas de safra.

A presente invenção proporciona métodos que envolvem o uso de um herbicida que inibe a AHASL. Nesses métodos, o herbicida que inibe a AHASL pode ser aplicado através de qualquer método conhecido na técnica incluindo, mas não limitado a, tratamento de semente, tratamento do solo e
25 tratamento foliar.

Antes de aplicação, o herbicida que inibe a AHASL pode ser convertido nas formulações comuns, por exemplo, soluções, emulsões, suspensões, pós, polvilhados, pastas e grânulos. A forma de uso depende da finalidade pretendida em particular; em cada caso, ela deverá assegurar uma

distribuição fina e uniforme do composto de acordo com a invenção.

As formulações são preparadas de uma maneira conhecida (veja, por exemplo, para uma revisão US 3.060.084, EP-A 707 445 (para concentrados líquidos), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, 4 de Dezembro de 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4ª Edição, McGraw-Hill, Nova Iorque, 1963, páginas 8-57 em diante. WO 91/13546, US 4.172.714, US 4.144.050, US 3.920.442, US 5.180.587, US 5232.701, US 5.208.030, GB 2.095.558, US 3.299.566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., Nova Iorque, 1961, Hance e colaboradores, Weed Control Handbook, 8ª Edição, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 e Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemanha), 2001, 2. D. A. Knowles, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8), por exemplo, estendendo o composto ativo com auxiliares adequados para a formulação de agroquímicos, tais como solventes e/ou veículos, se desejado emulsificantes, tensoativos e dispersantes, conservantes, agentes anti-espumação, agentes anti-congelamento, para a formulação para tratamento de semente também opcionalmente colorantes e/ou aglutinantes e/ou agentes de geleificação.

Exemplos de solventes adequados são água, solventes aromáticos (por exemplo, os produtos Solvesso, xileno) parafinas (por exemplo, frações de óleo mineral, álcoois, (por exemplo, metanol, butanol, pentanol, álcool benzílico) cetonas (por exemplo, ciclohexanona, gama-butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP) acetatos (diacetato de glicol), glicóis, dimetil amidas de ácidos graxos, ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos. Em princípio, misturas de solventes também podem ser usadas.

Exemplos de veículos adequados são minerais naturais triturados (por exemplo, caulins, argilas, talco, giz) e minerais sintéticos

triturados (por exemplo, sílica altamente dispersa, silicatos).

Emulsificantes adequados são emulsificantes não-iônicos e aniônicos (por exemplo, éteres de álcool graxo de polioxietileno, alquil sulfonatos e aril sulfonatos).

5 Exemplos de dispersantes são licores residuais de lignin-sulfito e metilcelulose.

Tensoativos adequados usados são sais de metal alcalino, metal alcalino terroso e amônio de ácido ligno-sulfônico, ácido naftaleno-sulfônico, ácido fenol-sulfônico, ácido dibutil naftaleno-sulfônico, alquil aril
 10 sulfonatos, alquil sulfatos, alquil sulfonatos, sulfatos de álcool graxo, ácidos graxos e glicol éteres de álcool graxo sulfatados, além disso, condensados de derivados de naftaleno e naftaleno sulfonado com formaldeído, octil fenol éter de polioxietileno, isooctil fenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, poliglicol éteres de alquil fenol, poliglicol éter de tributilfenila, poliglicol éter de
 15 triestearil fenila, álcoois de polialquil aril poliéter, condensados de álcool e óxido de etileno de álcool graxo, óleo de mamona etoxilado, alquil éteres de polioxietileno, polioxipropileno etoxilado, acetal de poliglicol éter de álcool laurílico, ésteres de sorbitol, licores residuais de ligno-sulfito e metilcelulose.

As substâncias as quais são adequadas para o preparo de
 20 soluções diretamente pulverizáveis, emulsões, pastas ou dispersões oleosas são frações de óleo mineral com um ponto de ebulição médio a alto, tais como querosene ou óleo diesel, além disso, óleos de alcatrão e óleos de origem vegetal ou animal, hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos, por exemplo, tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados
 25 ou seus derivados, metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, solventes altamente polares, por exemplo, sulfóxido de dimetila, N-metil pirrolidona ou água.

Também, agentes anti-congelamento, tais como glicerina, etileno glicol, propileno glicol e bactericidas, podem ser adicionados à

formulação.

Agentes anti-espumação adequados são, por exemplo, agentes anti-espumação baseados em silício ou estearato de magnésio.

5 Conservantes adequados são, por exemplo, Dichlorophen e hemiformal de álcool benzílico.

Formulações para tratamento de semente podem, adicionalmente, compreender aglutinantes e opcionalmente colorantes.

10 Aglutinantes podem ser adicionados para melhorar a adesão dos materiais ativos sobre as sementes após o tratamento. Aglutinantes adequados são tensoativos de copolímeros em blocos de EO/PO, mas também álcoois polivinílicos, polivinilpirrolidonas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenoaminas, polietilenamidas, polietilenimidas, (Lupasol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, acetato de polivinila, tilosi e copolímeros derivados desses
15 polímeros.

Opcionalmente, também colorantes podem ser incluídos na formulação. Colorantes ou corantes adequados para formulações para o tratamento de semente são Rodamina B, C.I. Pigment Red 112, C.I. Solvent Red 1, pigmento azul 15:4, pigmento azul 15:3, pigmento azul 15:2, pigmento
20 azul 15:1, pigmento azul 80, pigmento amarelo 1, pigmento amarelo 13, pigmento vermelho 112, pigmento vermelho 48:2, pigmento vermelho 48:1, pigmento vermelho 57:1, pigmento vermelho 53:1, pigmento laranja 43, pigmento laranja 34, pigmento laranja 5, pigmento verde 36, pigmento verde 7, pigmento branco 6, pigmento marrom 25, violeta simples 10, violeta básico
25 49, vermelho ácido 51, vermelho ácido 52, vermelho ácido 14, azul ácido 9, amarelo ácido 23, vermelho básico 10, vermelho básico 108.

Um exemplo de um agente de geleificação adequado é carragena (Satiagel®)

Pós, materiais para dispersão e produtos para polvilhamento

podem ser preparados através de mistura ou, concomitantemente, trituração das substâncias ativas com um veículo sólido.

Grânulos, por exemplo, grânulos revestidos, grânulos impregnados e grânulos homogêneos podem ser preparados através de ligação dos compostos ativos a veículos sólidos. Exemplos de veículos sólidos são terras minerais, tais como géis de sílica, silicatos, talco, caulim, atargila, pedra pome, cal, giz, raiz de árvore, loess, argila, dolomita, terra diatomácea, sulfato de cálcio, sulfato de magnésio, óxido de magnésio, materiais sintéticos triturados, fertilizantes, tais como, por exemplo, sulfato de amônio, fosfato de amônio, nitrato de amônio, uréias e produtos de origem vegetal, tais como farinha de cereal, farinha de casca de árvore, farinha de madeira e farinha de casca de nozes, pós de celulose e outros veículos sólidos.

Em geral, as formulações compreendem de 0,01 a 95% em peso, de preferência, de 0,1 a 90% em peso do herbicida que inibe a AHASL. Nesse caso, os herbicidas que inibem a AHASL são empregados em uma pureza de 90% a 100% em peso, de preferência, 95% a 100% (de acordo com o espectro de NMR). Para fins de tratamento de semente, as respectivas formulações podem ser diluídas 2-10 vezes, levando à concentrações nos preparados pronto para uso de 0,01 a 60% em peso de composto ativo, de preferência 0,1 a 40% em peso.

O herbicida que inibe a AHAS pode ser usado como tal, na forma de suas formulações ou formas de uso preparadas a partir das mesmas, por exemplo, na forma de soluções diretamente pulverizáveis, pós, suspensões ou dispersões, emulsões, dispersões oleosas, pastas, produtos pulverizáveis, materiais para dispersão ou grânulos, por meio de pulverização, atomização, polvilhamento, dispersão ou entornando. As formas de uso dependem totalmente das finalidades pretendidas; elas se destinam a assegurar, em cada caso, a distribuição mais fina possível do herbicida que inibe a AHAS de acordo com a invenção.

Formas de uso aquosas podem ser preparadas a partir de concentrados em emulsão, pastas ou pós umedecíveis (pós pulverizáveis, dispersões oleosas) através de adição de água. Para preparar emulsões, pastas ou dispersões oleosas, as substâncias, como tal ou dissolvidas em um óleo ou solvente podem ser homogeneizadas em água por meio de um agente umidificante, agente de aderência, dispersante ou emulsificante. Contudo, também é possível preparar concentrados compostos de substância ativa, agente umidificante, agente de aderência, dispersante ou emulsificante e, se apropriado, solvente ou óleo e tais concentrados são adequados para diluição com água.

As concentrações de composto ativo nos preparados prontos para uso podem ser variadas dentro de faixas relativamente amplas. Em geral, elas são de 0,0001 a 10%, de preferência de 0,01 a 1% em peso.

O herbicida que inibe a AHAS pode também ser usado com sucesso no processo com volume ultra-baixo (ULV), sendo possível aplicar formulações compreendendo mais de 95% em peso de composto ativo ou mesmo aplicar o composto ativo sem aditivos.

Os seguintes são exemplos de formulações:

1. Produtos para diluição para aplicações foliares. Para fins de tratamento de semente, tais produtos podem ser aplicados à semente diluídos ou não diluídos.

A) Concentrados solúveis em água (SL, LS)

Dez partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são dissolvidas em 90 partes em peso de água ou um solvente solúvel em água. Como uma alternativa, umidificantes ou outros auxiliares são adicionados. O herbicida que inibe a AHAS dissolve quando de diluição com água, pelo que uma formulação com 10% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida.

B) Concentrados dispersáveis (DC).

Vinte partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são dissolvidas em 70 partes em peso de ciclohexanona com a adição de 10 partes em peso de um dispersante, por exemplo, polivinilpirrolidona. Diluição com água proporciona uma dispersão, pelo que uma formulação com 20% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida.

C) Concentrados emulsificáveis (EC).

Quinze partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são dissolvidas em sete partes em peso de chileno com a adição de dodecilbenzeno sulfonato de cálcio ou etoxilato de óleo de mamona (em cada caso, 5 partes em peso). Diluição com água proporciona uma emulsão, pelo que uma formulação com 15% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida.

D) Emulsões (EW, EO, ES).

Vinte e cinco partes do herbicida que inibe a AHAS são dissolvidas em 35 partes em peso de xileno com a adição de dodecilbenzeno sulfonato de cálcio ou etoxilato de óleo de mamona (em cada caso, 5 partes em peso). Essa mistura é introduzida em 30 partes em peso de água por meio de uma máquina de emulsificação (por exemplo, com Ultraturrax) e transformada em uma emulsão homogenia. Diluição com água proporciona uma emulsão, pelo que uma formulação com 25% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida.

E) Suspensões (SC, OD, FS)

Em um moinho de esferas agitado, 20 partes em peso de um herbicida que inibe a AHAS são trituradas com 10 partes em peso de dispersantes, agentes de umedecimento e 70 partes em peso de água ou de um solvente orgânico para proporcionar uma suspensão fina de herbicida que inibe a AHAS. Diluição com água proporciona uma suspensão estável do herbicida que inibe a AHAS, pelo que uma formulação com 20% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida.

F) Grânulos dispersáveis em água e grânulos solúveis em água (WG, SG)

Cinquenta partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são finamente trituradas com a adição de 50 partes em peso de dispersantes e umidificantes e transformadas como grânulos dispersáveis em água ou solúveis em água por meio de ferramentas técnicas (por exemplo, extrusão, torre de pulverização, leito fluidizado). Diluição com água proporciona uma dispersão ou solução estável do herbicida que inibe a AHAS, pelo que uma formulação com 50% (peso/peso) do herbicida que inibe a AHAS é obtida.

10 G) Pós dispersáveis em água e pós solúveis em água (WP, SP, SS, WS)

Setenta partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são trituradas em um moinho como rotor-estator com a adição de 25 partes em peso de dispersantes, umidificantes e gel de sílica. Diluição com água proporciona uma dispersão ou solução estável do herbicida que inibe a AHAS, pelo que uma formulação com 75% (peso/peso) do herbicida que inibe a AHAS é obtida.

I) Formulação de gel (GF)

Em um moinho de esferas agitado, 20 partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são triturados com a adição de 10 partes em peso de dispersantes, uma parte em peso de uma gente de geleificação, emulsificantes e 70 partes em peso de água ou de um solvente orgânico para proporcionar uma suspensão de herbicida que inibe a AHAS fina. Diluição com água proporciona uma suspensão estável do herbicida que inibe a AHAS, pelo que uma formulação com 20% (peso/peso) do herbicida que inibe a AHAS é obtida. Essa formulação de gel é adequada para uso como um tratamento para semente.

2. Produtos a serem aplicados não diluídos para aplicações foliares. Para fins de tratamento de sementes, tais produtos podem ser

aplicados à semente diluídos.

A) Pós pulverizáveis (DP, DS)

5 Cinco partes em peso do herbicida que inibe a AHAS são finamente trituráveis e misturadas intimamente com 95 partes em peso de caulim finamente dividido. Isso proporciona um produto para polvilhar tendo 5% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS.

B) Grânulos (GR, FG, GG, MG)

10 Meia parte em peso do herbicida que inibe a AHAS é finamente triturada e associada com 95,5 partes em peso de veículos, pelo que uma formulação com 0,5% (peso/peso) de herbicida que inibe a AHAS é obtida. Métodos atuais são extrusão, liofilização ou o leito fluidizado. Isso proporciona grânulos a serem aplicados não diluídos para uso foliar.

15 Formulações convencionais para o tratamento de semente incluem, por exemplo, concentrados fluidos FS, soluções LS, pós para tratamento seco DS, pós dispersáveis em água para tratamento por pasta WS, pós solúveis em água SS e emulsão ES e EC e formulação de gel GF. Essas formulações podem ser aplicadas à semente diluídas ou não diluídas. Aplicação às sementes é realizada antes de plantio, quer diretamente ou sobre as sementes.

20 Em uma modalidade preferida, uma formulação FS é usada para o tratamento de semente. Tipicamente, uma formulação FS pode compreender 1-800 g/l de ingrediente ativo 1-200 g/l de tensoativo, 0 a 200 g/l de agente anti-congelamento, 0 a 400 g/l de aglutinante, 0 a 200 g/l de um pigmento e até 1 litro de um solvente, de preferência água.

25 As sementes transgênicas e não-transgênicas da presente invenção das plantas resistentes a herbicida da presente invenção. Tais sementes incluem, por exemplo, sementes de girassol não-transgênicas compreendendo as características de resistência a herbicida da planta com Número de Depósito de Patente na ATCC PTA-6325 e sementes transgênicas

compreendendo uma molécula de polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína de AHASL1 resistente a herbicida.

Para o tratamento de semente, sementes das plantas resistentes a herbicida de acordo com a presente invenção são tratadas com herbicidas, de preferência herbicidas selecionados do grupo consistindo de herbicidas que inibem a AHAS, tais como amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, chlorimuron, chlorsulfuron, cinosulfuron, cyclosulfamuron, ethametsulfuron, ethoxysulfuron, flzasulfuron, flupyrsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pyrazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxysulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazamethabenz, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispyribac, pyriminobac, propóxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, pyriftalid e pyriithiobac e misturas dos mesmos ou com uma formulação compreendendo um herbicida que inibe a AHAS.

O termo tratamento de semente compreende todas as técnicas de tratamento de semente adequadas conhecidas na técnica, tais como curativo de semente, revestimento de semente, polvilhamento de semente, embebibimento de semente e empelotamento de semente.

De acordo com uma variante da presente invenção, um outro assunto da invenção é um método de tratamento do solo através da aplicação, em particular no sulco da semente: quer de uma formulação granular contendo o herbicida que inibe a AHAS como uma composição/formulação (por exemplo, uma formulação granular, com opcionalmente 1 ou mais veículos sólidos ou líquidos agricolamente aceitáveis e/ou opcionalmente com um ou mais tensoativos agricolamente aceitáveis). Esse método é vantajosamente empregado, por exemplo, em sementes de cereais, milho,

algodão e girassol.

A presente invenção também compreende sementes revestidas com ou contendo uma formulação para o tratamento de semente compreendendo pelo menos um inibidor de ALS selecionado do grupo consistindo de amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, chlorimuron, chlorsulfuron, cinosulfuron, cyclosulfamuron, ethametsulfuron, ethoxysulfuron, flazasulfuron, flupyrsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pyrazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxysulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazamethabenz, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispyribac, pyriminobac, propóxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, pyriftalid e pyriithiobac.

O termo semente abrange sementes e propágulos de planta de todos os tipos incluindo, mas não limitado a, sementes verdadeiras, pedaços de semente, brotos, caules verticais, bulbos, frutos, tubérculos, grãos, cortes, brotos de corte e semelhantes e significa, em uma modalidade preferida, sementes verdadeiras.

O termo "revestido com e/ou contendo" geralmente significa que o ingrediente ativo está, em sua maioria sobre a superfície do produto de propagação no momento de aplicação, embora uma parte maior ou menor do ingrediente possa penetrar no produto de propagação, dependendo o método de aplicação. Quando o referido produto de propagação é (re)plantado, ele pode absorver o ingrediente ativo.

A aplicação para tratamento de semente com o herbicida que inibe a AHAS ou com uma formulação compreendendo o herbicida que inibe a AHAS é realizada através de pulverização ou polvilhamento das sementes antes de plantio das plantas e antes de emergência das plantas.

No tratamento de sementes, as formulações correspondentes são aplicadas através de tratamento das sementes com uma quantidade eficaz do herbicida que inibe a AHAS ou uma formulações compreendendo o herbicida que inibe a AHAS. Aqui, as taxas de aplicação são geralmente de 0,1 g a 10 kg do a.i. (ou da mistura do a.i. ou da formulação) por 100 kg de semente, de preferência de 1 g a 5 kg por 100 kg de semente, em particular de 1 g a 2,5 kg por 100 g de semente. Para safras específicas, tal como alface, a taxa pode ser maior.

A presente invenção proporciona um método para combate de vegetação indesejada ou controle de ervas daninhas compreendendo contato das sementes das plantas resistentes de acordo com a presente invenção antes de plantio e/ou após pré-germinação com um herbicida que inibe a AHAS. O método pode ainda compreender plantio das sementes, por exemplo, no solo em um campo ou em um meio de plantio em uma estufa. O método encontra uso particular no combate de vegetação indesejada ou controle de ervas daninhas na proximidade imediata da semente.

O controle de vegetação indesejada é entendido como significando a morte de ervas daninhas e/ou de outro modo retardo ou inibição do crescimento normal das ervas daninhas. Ervas daninhas em seu sentido mais amplo, são compreendidas como significando todas aquelas plantas as quais crescem em locais elas são indesejadas.

As ervas daninhas da presente invenção incluem, por exemplo, ervas daninhas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Ervas daninhas dicotiledôneas incluem, mas não estão limitadas a, ervas daninhas dos gêneros: Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus e

Taraxacum. Ervas daninhas monocotiledôneas incluem, mas não estão limitadas a, ervas daninhas dos gêneros: Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus e Apera.

Além disso, as ervas daninhas da presente invenção podem incluir, por exemplo, plantas de safra que estão crescendo em um local indesejado. Por exemplo, uma planta de milho voluntária que está em um campo que compreende predominantemente plantas de soja pode ser considerada uma erva daninha, se a planta de milho é indesejada no campo das plantas de soja.

Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referir a um ou mais de um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. À guisa de exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos.

Conforme usado aqui, a palavra "compreendendo" ou variações, tais como "compreende", "compreendem" deverão ser entendidas como implicando na inclusão do elemento inteiro ou etapa estabelecida ou grupo de elementos, inteiros ou etapas, mas não na exclusão de qualquer outro elemento, inteiro ou etapa ou grupo de elementos, inteiros ou etapas.

Os exemplos a seguir são oferecidos à guisa de ilustração e não como forma de limitação.

EXEMPLO 1:

Mutagênese da Linhagem de *Helianthus annuus* RHA266 e Seleção de Plantas Resistentes à Imidazolinona

Na primavera da estação de crescimento 1, plantas de girassol (*Helianthus annuus*) da linhagem RHA266 foram tratadas com metano-sulfonato de etila (EMS, também referido como etil éster de ácido metano-

sulfônico). O EMS é um mutagene conhecido que, tipicamente induz à transições G C-para-A T em DNA (Jander e colaboradores (2003) *Plant Physiol.* 131:139-146). Dois experimentos distintos foram conduzidos, os quais diferiam pela data de plantio e concentrações de EMS usadas. No primeiro experimento, duas concentrações de EMS foram usadas. As plantas foram tratadas com uma solução compreendendo 0,5% ou 5% (peso/v) de EMS. Para cada tratamento com EMS, 21 fileiras de semente foram plantadas externamente na Advanta Semillas Biotech Research Station em Balcarce, BsAs, Argentina.

No segundo experimento, 42 fileiras de sementes de girassol da linhagem RHA266 foram plantadas externamente na Advanta Semillas Biotech Research Station, BsAs, Argentina uma semana após as sementes que foram plantadas no primeiro experimento. Dessas 42 fileiras, 21 fileiras foram tratadas com EMS a 10% e 21 fileiras foram tratadas com EMS a 15%, conforme descrito acima.

Para cada um dos experimentos, todas as plantas M_0 foram debulhadas antes de floração de forma a assegurar que as sementes M_1 resultantes fossem o produto de auto-polinização as cabeças de semente de cada tratamento de EMS foram coletadas e o grão separado das cascas a granel. Na estação de crescimento seguinte, as sementes M_1 com mutação de plantas que foram tratadas com EMS a 0,5%, 5,0%, 10,0% ou 15,0% foram plantadas externamente com cada tratamento em um vaso separado. 29 dias depois, quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento de 2-4 pares de folhas, todas as plantas tratadas com EMS foram pulverizadas com 2X de Sweeper 70DG (100 g de a.i./ha). O ingrediente ativo no Sweeper é imazamox. Após a pulverização do herbicida, um total de 14 plantas sobreviveram e foram selecionadas como resistentes putativas. A distribuição de plantas resistentes por tratamento com EMS é indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Número de plantas de girassol resistentes à imidazolinona M_1 recuperadas de cada tratamento com EMS

Concentração de EMS (%)	Numero de plantas resistentes recuperadas
0,5	4
5,0	6
10	4
15	0

Amostras de tecido foram tomadas de cada planta M_1 individual que sobreviveu e DNA de cada amostra foi extraído para amplificação por PCR e estudos de seqüenciamento descritos abaixo no Exemplo 2.

As 14 plantas resistentes putativas (Tabela 1) foram transplantadas para vasos, colocadas na estufa e deixadas crescer até a maturidade. Essas plantas produziram sementes (M_2) e a semente foi colhida. Logo após, sementes de duas dessas famílias $M_{1,2}$ foram plantadas em vasos separados na estufa.

EXEMPLO 2: Amplificação por PCR e Seqüenciamento de Polinucleotídeos de Girassol que Codificam Proteínas de AHASL1 Resistentes à Imidazolinona e do Tipo Silvestre

Para determinar a origem da tolerância à imidazolinona em plantas de girassol do Exemplo, amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) de DNA genômico e seqüenciamento de DNA foram empregados para determinar a origem da tolerância à imidazolinona descrita acima no Exemplo 1.

A partir de uma planta M_1 designada como MUT9, DNA genômico foi isolado. DNA genômico também foi isolado de tecido de uma planta RHA266 do tipo silvestre. As amostras de DNA isoladas de MUT9 e RHA266 foram, cada uma, diluídas para uma concentração de estoque de 100ng/ μ L para uso como um DNA *template* para amplificações por PCR. Toda a região de codificação do gene *AHASL1* de girassol foi amplificada a partir das amostras de DNA de MUT9 e RHA266. Os iniciadores específicos

usados para obter cada amplicon são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores de PCR para amplificação da região de codificação do gene *AHASL1* de girassol.

Região de <i>AHASL1</i>	Nome de Iniciador	Seqüência de Iniciador
1 ^o amplicon (1036 bp)	C2359-F1	AGATCAACCGAGAAAAGGCG (SEQ ID NO:11)
	ALSR1	CGAAAAATCAAGATTAGTCACC (SEQ ID NO:12)
2 ^o amplicon (709 bp)	SUNALS1-F1	GAGGAAAAGAATTCGGTGACT (SEQ ID NO:13)
	ALS-8R	CGGTGATCACATCCGAGAAA (SEQ ID NO:14)

A partir de comparações das seqüências de nucleotídeo de genes *AHASL1*, *AHASL2* e *AHASL3*, iniciadores de PCR foram projetados para amplificar especificamente o gene *AHASL1* de girassol. As seguintes condições de PCR foram usadas em um volume total de reação de 50 µl: IX tampão (Gibco-BRL), dNTPs a 0,2 mM (Gibco-BRL), MgCl₂ a 2,5 mM (Gibco-BRL), 0,2 µM de cada iniciador, 0,5 µL de Platinum Taq (5U/µL) (Gibco- BRL) e 100 ng de DNA genômico. As reações de PCR foram realizadas em um GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer, Inc., Boston, MA, EUA). As condições de ciclo foram: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, seguido por um programa de 40 ciclos consistindo de 10 ciclos de PCR de touch-down (94°C durante 30 segundos, 67°C a 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos), seguido por 30 ciclos do mesmo regime de ciclo com uma temperatura de anelamento fixa de anelamento de 58 °C e uma etapa final de alongamento de 72 °C durante 10 minutos. Dez microlitros de cada produto de PCR resultante foram, então, analisados através de eletroforese em gel de agarose e os 40 µL restantes do produto de PCR foram purificados usando o Concert™ Rapid PCR Purification System (Gibco-BRL) antes de seqüenciamento. Os produtos de PCR purificados foram, então, ciclo-seqüenciados usando um BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) seguindo as instruções do fabricante. Além dos iniciadores usados para as amplificações por PCR

(Tabela 2), iniciadores adicionais apresentados na Tabela 3 foram usados para completar o seqüenciamento da região de codificação inteira do gene AHASL1 de girassol.

Tabela 3. Iniciadores adicionais para seqüenciamento da região de codificação do gene AHASL1 de girassol.

Região de <i>AHASL</i>	Nome de Iniciador	Seqüência de Iniciador
1° amplicon (1036 bp)	ALS-2R	CATCGGTTCCGATCATTCCTC (SEQ ID NO:15)
	ALS-2F	GTGTCACCGACGTCTTCGC (SEQ ID NO:16)
	ALS-3R	CTAGACAAATAACCCGGTAACC (SEQ ID NO:17)
	ALS-3F	GCGCTGTTAGACAGTGTCC (SEQ ID NO:18)
	ALSRI	CGAAAAATCAAGATTAGTCACC (SEQ ID NO:12)
	ALS4F	ACAGCAACAGTTAGTGGTG (SEQ ID NO:19)
2° amplicon (709 bp)	ALS-6R	CGGCAGATTTTCAACACGGA (SEQ ID NO:20)
	ALS-7F	AGACAATGGCTGACGTCGG (SEQ ID NO:21)
	ALS-8F	TATGGTGGTTCAGTGGGAGG (SEQ ID NO:22)

Produtos rotulados por fluorescências das reações de seqüenciamento foram decompostos sobre um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer). Os campos de seqüenciamento de AHASL1 de girassol obtidos de cada amplicon foram montados usando o software Vector NTI Suite-Contig Express, versão 7.0 (InforMax, Frederick, MD, EUA). As seqüências de DNA resultantes foram alinhadas com seqüências de polinucleotídeo de AHASL1 da linhagem de girassol RHA266 e *Xanthium* sp. (Figura 1). A seqüência de aminoácido prevista do novo gene AHASL1 de girassol mutante foi alinhada com as seqüências de aminoácido de AHASL1 de RHA266 e *Xanthium* sp. (Figura 2) usando software Vector NTI Suite-AlignX, versão 7.0 (InforMax) foi usado com os parâmetros padrão. Polimorfismos de um único nucleotídeo e alterações de aminoácido foram, então, identificados na seqüência de nucleotídeo e aminoácido da planta

MUT9. Com relação às posições equivalentes nas seqüências de nucleotídeo (SEQ ID NO:2) e aminoácido (SEQ ID NO:4) do tipo silvestre de RHA266, a seqüência de aminoácido de MUT (SEQ ID NO:1) tem uma transição C para T na posição de nucleotídeo 305 e sua seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:2) tem uma substituição de treonina para isoleucina na posição de aminoácido 102. O sítio da transição C-para-T na seqüência de nucleotídeo de MUT9 corresponde ao nucleotídeo 563 na seqüência de codificação de AHASL de girassol de comprimento total tendo No. de Acesso ao GenBank AY541451(SEQ ID NO:23). O sítio de substituição de treonina para isoleucina na seqüência de aminoácido de MUT9 corresponde ao aminoácido 188 na seqüência de aminoácido de comprimento total da proteína de AHASL1 de girassol codificada pela seqüência de nucleotídeo tendo No. de Acesso ao GenBank AY541451 (SEQ ID NO:24).

EXEMPLO 3: Plantas de Girassol resistentes a herbicida férteis

Vinte sementes M_2 foram obtidas da planta M_1 conhecida como MUT9. Essas sementes M_2 foram plantadas na estufa. Das seis mudas que resultaram dessas sementes, duas cresceram em plantas férteis. Uma das plantas férteis proporcionou 13 sementes e foi determinada através de seqüenciamento de DNA como sendo heterozigótica para o alelo mutante de *AHASL1* descrito no Exemplo 2. A outra planta fértil proporcionou 12 sementes, mas era homozigótica para o alelo do tipo silvestre do gene *AHASL1*.

EXEMPLO 4: A resistência a herbicida de plantas de girassol MUT9

Para avaliar a resistência de plantas de girassol MUT9 a herbicidas de imidazolinona, plantas de girassol RHA266 (tipo silvestre) e MUT9 M_5 homozigóticas foram plantadas externamente em Balcarce, Argentina durante a estação de crescimento em um experimento no campo com design de bloco completo aleatório (RCBD) com duas replicações para avaliar a tolerância de plantas MUT9 a três taxas de Sweeper 70DG: 1X, 2X e

3X no estágio de seis folhas (isto é, 3 pares de folhas). O ingrediente ativo no Sweeper é imazamox e a dose de 1X é de 50 g de a.i./ha. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Tolerância à imidazolinona de plantas de girassol MUT9 (% lesão¹)

LINHAGEM	TAXA			
	0X	1X	2X	3X
RHA266	0	75	75	75
MUT9	0	15	31	39

¹Escala de lesão: 0%, nenhuma lesão; 5-10%, clorose, ligeiramente amarela; 10-20%, redução na taxa de crescimento, encurtamento de internódulos; 20-30%, deformações na folha; 30-45%, necrose; e >50%, plantas mortas.

5 Comparado com as plantas de girassol RHA266 do tipo silvestre, as plantas de girassol MUT9 tinham significativamente menos lesão a 1X, 2X e 3X do que o Sweeper. Os resultados desse experimento demonstram que as plantas MUT9 têm resistência ou tolerância aumentada a herbicidas de imidazolinona.

10 Em outro experimento similar, plantas RHA266 e plantas de girassol MUT9 que eram heterozigóticas e homozigóticas para o alelo de *AHASL1* resistente a herbicida foram tratadas em taxas de 0X, 1X e 2X de Sweeper. As plantas MUT9 homozigóticas mostraram um nível maior de tolerância do que as plantas heterozigóticas. Conforme esperado, as
15 plantas RHA266 (tipo silvestre) eram suscetíveis às taxas de 1X e 2X de Sweeper.

Para avaliar a resistência de plantas de girassol MUT9 a herbicidas de sulfoniluréia, plantas de girassol RHA266 (tipo silvestre) e MUT9 foram plantadas externamente em Balcarce, Argentina durante a
20 estação de crescimento em um experimento no campo RCBD com duas réplicas para avaliar a tolerância de plantas MUT9 M₅ homozigóticas aos herbicidas de sulfoniluréia tribenuron metila (TBM) e thifensulfuron (TFS) em taxas de 1X e 2X aplicadas no estágio de seis folhas. Em virtude da falta de sementes MUT9, um herbicida foi pulverizado em cada réplica. As taxas
25 de 1X para TBM e TFS são de 13,15 g de a.i./ha e 4,4 g de a.i./ha,

respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Tolerância de plantas de girassol MUT9 aos herbicidas de sulfoniluréia Tribenuron Metila (TBM) e Thifensulfuron (TFS) (% de lesão¹)

	TAXA								
	0X			1X			2X		
LINHAGEM	<u>TB</u> <u>M</u>	<u>TFS</u>	<u>média</u> ²	<u>TBM</u>	<u>TFS</u>	<u>média</u>	<u>TBM</u>	<u>TFS</u>	<u>média</u>
RHA266	0	0	0		75	75	45	75	60
MUT9	0	0	0	75	75	75	75	75	75

¹Escala de lesão a mesma conforme na Tabela 4. Média dos valores de lesão por TBM e TFS.

EXEMPLO 5: proteínas de AHASL de girassol resistentes a herbicida

5 A presente invenção divulga seqüências de nucleotídeo e aminoácido para polipeptídeos de AHASL de girassol resistentes a herbicida. Plantas compreendendo polipeptídeos de AHASL resistentes a herbicida foram previamente identificadas e uma série de regiões conservadas de polipeptídeos de AHASL que são os sítios de substituições de aminoácido que

10 conferem resistência a herbicida foram descritas. Veja Devine e Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". Em: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe e colaboradores (eds.), páginas 159-185, IOS Press, Amsterdã; e Devine e Shukla, (2000) *Crop Protection*

15 19: 881-889.

Usando as seqüências de AHASL da invenção e métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, pode-se produzir polinucleotídeos adicionais que codificam polipeptídeos de AHASL resistentes a herbicida tendo uma, duas, três ou mais substituições em sítios

20 identificados nessas regiões conservadas. A Tabela 6 proporciona as regiões conservadas de proteínas de AHASL, as substituições de aminoácido conhecidas por conferir resistência a herbicida dentro dessas regiões conservadas e os aminoácidos correspondentes na proteína de AHASL de girassol apresentados em SEQ ID NO:4.

Tabela 6. Mutações em regiões conservadas de polipeptídeos de AHASL conhecidos por conferir resistência a herbicida e sua posição equivalente em

AHASL1 de girassol

Região ¹ Conservada	Mutacao ²	Referência	Posição em girassol
VFAYPPGGASMEIHQALTRS ³	Ala ₁₂₂ a Thr	Bernasconi e colaboradores ⁶	Ala ₁₀₇
		Wright & Penner ¹⁵	
AITGQVPRRMIGT ⁴	Pro ₁₉₇ a Ala	Boutsalis e colaboradores ⁷	Pro ₁₈₂
	Pro ₁₉₇ a Thr	Guttieri e colaboradores ⁸	
	Pro ₁₉₇ a His	Guttieri e colaboradores ⁹	
	Pro ₁₉₇ a Leu	Guttieri e colaboradores ⁸	
		Kolkman e colaboradores ¹⁶	
	Pro ₁₉₇ a Arg	Guttieri e colaboradores ⁸	
	Pro ₁₉₇ a He	Boutsalis e colaboradores ⁷	
	Pro ₁₉₇ a Gin	Guttieri e colaboradores ⁸	
	Pro ₁₉₇ a Ser	Guttieri e colaboradores ⁸	
	Thr ₂₀₃ a He	Disclosed herein ¹⁴	Thr 188
AFQETP ³	Ala ₂₀₅ a Asp	Hartnett e colaboradores ¹⁰	Ala ₁₉₀
	Ala ₂₀₅ a Val	Simpson ¹¹	
		Kolkman e colaboradores ¹⁶	
		White e colaboradores ¹⁷	
QWED ³	Trp ₅₇₄ a Leu	Bruniard ¹²	Trp ₅₅₉
		Boutsalis e colaboradores ⁷	
IPSGG ⁵	Ser ₆₅₃ a Asn	Devine & Eberlei ¹³	Ala ₆₃₈
		Lee e colaboradores ¹⁸	
	Ser ₆₅₃ a Thr	Chang & Duggleby ¹⁹	
	Ser ₆₅₃ a Phe		

¹Regiões conservadas de Devine e Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". Em: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe e colaboradores (eds.), páginas 159-185, IOS Press, Amsterdã e Devine e Shukla, (2000) Crop Protection 19: 881-

889.

²Numeração de aminoácido corresponde à sequência do polipeptídeo de AHASL1 de *Arabidopsis thaliana*.

³AHASL1 de girassol (SEQ ID NO:4) tem a mesma região conservada.

⁴A região da sequência de aminoácido de AHASL de girassol apresentada em SEQ ID NO:2 que corresponde a essa região conservada inclui o sítio da substituição T188-para-I e, assim, tem a sequência AITGQ VPRRMIGI. A mesma região da sequência de aminoácido de AHASL do tipo silvestre que é apresentada em SEQ ID NO:4 é idêntica à região conservada indicada na Tabela 6.

⁵A região do AHASL1 de girassol (SEQ ID NO:4) correspondendo a essa região conservada tem a sequência IPAGG.

⁶Bernasconi e colaboradores (1995) *J Biol. Chem.* 270(29): 17381-17385.

⁷Boutsalis e colaboradores (1999) *Pestic. Sci.* 55: 507-516.

⁸Guttieri e colaboradores (1995) *Weed Sci.* 43: 143-178.

⁹Guttieri e colaboradores (1992) *Weed Sci.* 40: 670-678.

¹⁰Hartnett e colaboradores (1990) "Herbicide-resistant plants carrying mutated acetolactate synthase genes" Em: *Managing Resistance to Agrochemicals: Fundamental Research to Practical Strategies*, Green e colaboradores (eds.), American Chemical Soc. Symp., Série No. 421, Washington, DC, EUA

¹¹Simpson (1998) *Down to Earth* 53(1): 26-35.

¹²Bruniard (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Tese de Ph.D., North Dakota State University, Fargo, ND, EUA, páginas 1-78.

¹³Devine e Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". Em: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe e colaboradores (eds.), páginas 159-185, IOS Press, Amsterdã.

¹⁴A presente invenção divulga a sequência de aminoácido de um AHASL1 resistente a herbicida com a substituição Thr para Ile (SEQ ID NO:2) e uma sequência de polinucleotídeo que codifica esse AHASL1 resistente a herbicida (SEQ ID NO:1).

¹⁵Wright e Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 612-620.

¹⁶Kolkman e colaboradores (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159.

¹⁷White e colaboradores (2003) *Weed Sci.* 51: 845-853.

¹⁸Lee e colaboradores (1999) *FEBS Lett.* 452: 341-345.

¹⁹Chang e Duggleby (1998) *Biochem J.* 333: 765-777.

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados na especificação são indicativos do nível daqueles habilitados na técnica à qual a presente invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patente são aqui incorporados por referência até o mesmo ponto como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse específica e individualmente indicada como sendo incorporada por referência.

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em algum detalhe à guisa de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, será óbvio que determinadas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO
DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA OS FINS DE PROCEDIMENTO DE
PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO NO CASO DE UM DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO DE ACORDO COM A
REGRA 7.3 E DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE EXPEDIDO DE ACORDO COM
REGRA 10.2

Para: (Nome e endereço do Depositante ou Advogado)

BASF Corporation
Atenção de: Karen M. Dellerman
206 Davis Drive
P.O. Box 13528
Research Triangle Park, NC 27709-3528

Depositado em Benefício de: BASF Corporation/Advanta Semillas S.A.L.C.

Referência de Identificação pelo Depositante:	Designação de Depósito de Patente
---	-----------------------------------

Helianthus annuus: RHA266 MUT-9-1-1-2	PTA-6325
---------------------------------------	----------

As sementes estavam acompanhadas por: uma descrição científica, uma descrição taxonômica proposta indicada acima. As sementes foram recebidas em 22 de novembro de 2004 por esta Autoridade Depositária Internacional e foram aceitas.

EM SUA SOLICITAÇÃO: X Nós os informaremos sobre as solicitações para as sementes durante 30 anos

As sementes tornar-se-ão disponíveis se um signatário do escritório de patente para o Tratado de Budapeste certifica dos direitos a receber, ou se uma patente U.S. é expedida citando as sementes e ATCC é instruído pelo United States Patent & Trademark Office ou pelo depositante para liberar referidas sementes.

Se as sementes devem morrer ou serem destruídas durante o termo efetivo do depósito, será de sua responsabilidade substituir as mesmas com sementes viáveis das mesmas.

As sementes serão mantidas durante um período de pelo menos 30 anos a partir da data do depósito, ou cinco anos após a solicitação mais recente de uma amostra, o que for mais longo. Os Estados Unidos e muitos outros países são signatários do Tratado de Budapeste.

A disponibilidade das sementes citadas acima foi testada em 1 de dezembro de 2004. Nessa data, as sementes eram viáveis.

Autoridade Depositária Internacional: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Assinatura da pessoa tendo autoridade para representar ATCC:

Marie Harris, Especialista em Patentes, Depositária do Pedido ATCC

Data: 10 de janeiro de 2005

cc. Robert M. Schulman
Documento ou Caso nº: 58836..000005

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Leon, Alberto Javier
 Morata, Monica Mariel
 Olungu, Christine

<120> PLANTAS DE GIRASSOL RESISTENTES A HERBICIDA, POLINUCLEOTÍDEOS
 CODIFICANDO PROTEÍNAS DE SUBUNIDADE ÁCIDO ACETO-HIDRÓXI SINTASE
 RESISTENTES A HERBICIDA, E MÉTODOS DE USO

<130> 038867-318321

<150> US 60/735,045
 <151> 2005-11-09

<160> 26

<170> FastSEQ for Windows Versão 4.0

<210> 1
 <211> 1684
 <212> DNA
 <213> Helianthus annuus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1684)

<221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> MUT9

<400> 1
 gtg ttg gtg gaa gct ctg gaa cgg gaa ggt gtc acc gac gtc ttc gcc 48
 Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala
 1 5 10 15
 tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac caa gct ctc acg cgc tca 96
 Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser
 20 25 30
 aac act atc cgc aat gtc ctc cca cgt cac gaa cag ggc ggc gtg ttc 144
 Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe
 35 40 45
 gcc gcc gaa ggc tac gcg cgc gcc tcc ggt ctt ccc ggc gtg tgt atc 192
 Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile
 50 55 60
 gcc act tcc ggt ccc gga gct acg aac cta gtt agt ggt ctt gct gac 240
 Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 gcg ctg tta gac agt gtc ccc atg gtg gca atc acc ggt caa gtt ccc 288
 Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro
 85 90 95
 cgg aga atg atc gga atc gat gcg ttt caa gaa acc cca att gtt gag 336
 Arg Arg Met Ile Gly Ile Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu
 100 105 110
 gta aca cgt tcg atc act aaa cat aat tat ctt gtg ttg gat gtt gag 384
 Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu
 115 120 125
 gat att ccc aga att gtt cgt gag gct ttt tat ctt gcg agt tcg ggt 432
 Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly
 130 135 140
 cga ccc ggc ccg gtt ttg ata gat gta ccg aaa gat ata cag caa cag 480

Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln		
145			150			155			160								
tta	gtg	gtg	ccg	aaa	tgg	gat	gaa	ccg	atg	agg	tta	ccg	ggt	tat	ttg	528	
Leu	Val	Val	Pro	Lys	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr	Leu		
		165			170				175								
tct	aga	atg	ccg	aag	cct	caa	tat	gat	ggg	cat	ttg	gaa	cag	att	gtt	576	
Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Asp	Gly	His	Leu	Glu	Gln	Ile	Val		
		180			185				190								
agg	ttg	gtg	ggg	gaa	gcg	aag	agg	ccg	gtt	ttg	tat	gtg	ggt	ggt	ggg	624	
Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly		
		195			200				205								
tgt	ttg	aat	tcg	gat	gat	gag	ttg	agg	cgg	ttt	gtg	gag	ctt	acg	ggg	672	
Cys	Leu	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly		
		210			215				220								
att	ccg	gtt	gcg	agt	act	ttg	atg	ggg	ctc	gga	gcg	tac	ccg	gct	tcg	720	
Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser		
		225			230				235								
agt	gat	ttg	tcg	ctt	cat	atg	ctt	ggg	atg	cat	ggt	acg	gtt	tat	gcg	768	
Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala		
		245			250				255								
aat	tat	gcg	gtt	gat	aag	agt	gat	ttg	ttg	ctt	gcg	ttt	ggg	gtg	cgg	816	
Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg		
		260			265				270								
ttt	gat	gac	cgt	gtg	acg	ggg	aag	ctt	gag	gcg	ttt	gct	agt	agg	gcg	864	
Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala		
		275			280				285								
aag	att	gtt	cat	att	gat	att	gat	ccg	gct	gaa	att	ggg	aag	aat	aaa	912	
Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys		
		290			295				300								
cag	cct	cat	gtg	tcg	att	tgt	ggc	gat	att	aag	gtc	gcg	tta	cag	ggt	960	
Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Gly		
		305			310				315								
ttg	aac	aag	att	ttg	gag	gaa	aag	aat	tcg	gtg	act	aat	ctt	gat	ttt	1008	
Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe		
		325			330				335								
tcg	aac	tgg	aga	aag	gaa	ttg	gat	gaa	caa	aaa	gtg	aag	ttc	ccg	ttg	1056	
Ser	Asn	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Lys	Val	Lys	Phe	Pro	Leu		
		340			345				350								
agc	ttt	aaa	acg	ttt	ggc	gaa	gcg	att	cct	cca	cag	tat	gct	att	caa	1104	
Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln		
		355			360				365								
gtt	ctt	gat	gag	tta	acg	ggc	ggg	aat	gca	att	att	agc	acc	ggt	gtc	1152	
Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val		
		370			375				380								
ggg	caa	cat	cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	tac	aaa	tac	aac	aaa	cct	1200	
Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Pro		
		385			390				395								
aga	caa	tgg	ctg	acg	tcg	ggc	ggg	cta	ggg	gca	atg	ggt	ttt	ggg	ctg	1248	
Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu		
		405			410				415								
ccc	gct	gct	atc	ggg	gcg	gcc	gtt	gca	aga	cct	gat	gcg	gta	gta	gtt	1296	
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val		
		420			425				430								
gac	atc	gac	ggt	gac	gga	agc	ttt	atg	atg	aat	gtt	caa	gag	tta	gcc	1344	
Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Met	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala		
		435			440				445								
aca	atc	cgt	gtt	gaa	aat	ctg	ccg	gtt	aag	att	tta	tta	ctc	aac	aat	1392	
Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn		
		450			455				460								
cag	cat	ttg	ggt	atg	gtg	gtt	cag	tgg	gag	gat	cgg	ttt	tac	aag	gcg	1440	
Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala		
		465			470				475								
aat	cgg	gct	cat	acc	tac	tta	gga	aac	ccg	tca	aaa	gag	tcg	gaa	ata	1488	

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser Glu Ile
 485 490 495
 ttc cct aac atg ttg aag ttt gcc gaa gcc tgt gat atc ccg gct gct 1536
 Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ala Ala
 500 505 510
 cga gtg acc caa aag gcg gat cta cga gca gct att cag aag atg ttg 1584
 Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu
 515 520 525
 gat aca ccc ggg cct tac ttg ttg gat gtg att gtg ccg cat caa gaa 1632
 Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
 530 535 540
 cac gtg ttg ccc atg atc ccg gct ggc gga ggt ttc tcg gat gtg atc 1680
 His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Ser Asp Val Ile
 545 550 555 560
 acc g 1684
 Thr

<210> 2
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Helianthus annuus

<400> 2
 Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe
 35 40 45
 Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile
 50 55 60
 Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro
 85 90 95
 Arg Arg Met Ile Gly Ile Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu
 100 105 110
 Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu
 115 120 125
 Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly
 130 135 140
 Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln
 145 150 155 160
 Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg Leu Pro Gly Tyr Leu
 165 170 175
 Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His Leu Glu Gln Ile Val
 180 185 190
 Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 195 200 205
 Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 210 215 220
 Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser
 225 230 235 240
 Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 245 250 255
 Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 260 265 270
 Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 275 280 285
 Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 290 295 300
 Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly
 305 310 315 320

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

<210> 3
 <211> 1965
 <212> DNA
 <213> Helianthus annuus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1965)
 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> RHA266

<400> 3
 atg gcg gct cct ccc aac cct tcc atc tcc ttc aaa cca ccg tca ccc 48
 Met Ala Ala Pro Pro Asn Pro Ser Ile Ser Phe Lys Pro Pro Ser Pro
 1 5 10 15
 gcc gcc gca ctg cca cca cgc tcc gcc ttc ctc ccc cgt ttc gca tta 96
 Ala Ala Ala Leu Pro Pro Arg Ser Ala Phe Leu Pro Arg Phe Ala Leu
 20 25 30
 ccc atc act tcc act acc caa aaa cga cac cgt ctt cac atc tcc aat 144
 Pro Ile Thr Ser Thr Thr Gln Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn
 35 40 45
 gtt ctc tcc gac tcc aaa tcc acc acc acc acc acc acc act caa cca 192
 Val Leu Ser Asp Ser Lys Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gln Pro
 50 55 60
 ccg tta cag gcg cag cct ttt gtc tcc cgg tac gcg cca gat caa ccg 240
 Pro Leu Gln Ala Gln Pro Phe Val Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro
 65 70 75 80
 aga aaa ggc gca gac gtg ttg gtg gaa gct ctg gaa cgg gaa ggt gtc 288
 Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val
 85 90 95

acc gac gtc ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac caa 336
 Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 100 105 110
 gct ctc acg cgc tca aac act atc cgc aat gtc ctc cca cgt cac gaa 384
 Ala Leu Thr Arg Ser Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
 115 120 125
 cag ggc ggc gtg ttc gcc gcc gaa ggc tac gcg cgc gcc tcc ggt ctt 432
 Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu
 130 135 140
 ccc ggc gtg tgt atc gcc act tcc ggt ccc gga gct acg aac cta gtt 480
 Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 145 150 155 160
 agt ggt ctt gct gac gcg ctg tta gac agt gtc ccc atg gtg gca atc 528
 Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
 165 170 175
 acc ggt caa gtt ccc cgg aga atg atc gga acc gat gcg ttt caa gaa 576
 Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 180 185 190
 acc cca att gtt gag gta aca cgt tcg atc act aaa cat aat tat ctt 624
 Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
 195 200 205
 gtg ttg gat gtt gag gat att ccc aga att gtt cgt gag gct ttt tat 672
 Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr
 210 215 220
 ctt gcg agt tcg ggt cga ccc ggc ccg gtt ttg ata gat gta ccg aaa 720
 Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys
 225 230 235 240
 gat ata cag caa cag tta gtg gtg ccg aaa tgg gat gaa ccg atg agg 768
 Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg
 245 250 255
 tta ccg ggt tat ttg tct aga atg ccg aag cct caa tat gat ggg cat 816
 Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His
 260 265 270
 ttg gaa cag att gtt agg ttg gtg ggg gaa gcg aag agg ccg gtt ttg 864
 Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu
 275 280 285
 tat gtg ggt ggt ggg tgt ttg aat tcg gat gat gag ttg agg cgg ttt 912
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe
 290 295 300
 gtg gag ctt acg ggg att ccg gtt gcg agt act ttg atg ggg ctc gga 960
 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
 305 310 315 320
 gcg tac ccg gct tcg agt gat ttg tcg ctt cat atg ctt ggg atg cat 1008
 Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
 325 330 335
 ggt acg gtt tat gcg aat tat gcg gtt gat aag agt gat ttg ttg ctt 1056
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu
 340 345 350
 gcg ttt ggg gtg cgg ttt gat gac cgt gtg acg ggg aag ctt gag gcg 1104
 Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
 355 360 365
 ttt gct agt agg gcg aag att gtt cat att gat att gat ccg gct gaa 1152
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 370 375 380
 att ggg aag aat aaa cag cct cat gtg tcg att tgt ggc gat att aag 1200
 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys
 385 390 395 400
 gtc gcg tta cag ggt ttg aac aag att ttg gag gaa aag aat tcg gtg 1248
 Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val
 405 410 415
 act aat ctt gat ttt tcg aac tgg aga aag gaa ttg gat gaa caa aaa 1296
 Thr Asn Leu Asp Phe Ser Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys
 420 425 430

gtg aag ttc ccg ttg agc ttt aaa acg ttt ggc gaa gcg att cct cca 1344
 Val Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
 435 440 445
 cag tat gct att caa gtt ctt gat gag tta acg ggc ggg aat gca att 1392
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile
 450 455 460
 att agc acc ggt gtc ggg caa cat cag atg tgg gct gct cag ttt tac 1440
 Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
 465 470 475 480
 aaa tac aac aaa cct aga caa tgg ctg acg tcg ggc ggg cta ggg gca 1488
 Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala
 485 490 495
 atg ggt ttt ggg ctg ccc gct gct atc ggg gcg gcc gtt gca aga cct 1536
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro
 500 505 510
 gat gcg gta gta gtt gac atc gac ggt gac gga agc ttt atg atg aat 1584
 Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met Asn
 515 520 525
 gtt caa gag tta gcc aca atc cgt gtt gaa aat ctg ccg gtt aag att 1632
 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile
 530 535 540
 tta tta ctc aac aat cag cat ttg ggt atg gtg gtt cag tgg gag gat 1680
 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 545 550 555 560
 cgg ttt tac aag gcg aat cgg gct cat acc tac tta gga aac ccg tca 1728
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser
 565 570 575
 aaa gag tcg gaa ata ttc cct aac atg ttg aag ttt gcc gaa gcc tgt 1776
 Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys
 580 585 590
 gat atc ccg gct gct cga gtg acc caa aag gcg gat cta cga gca gct 1824
 Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala
 595 600 605
 att cag aag atg ttg gat aca ccc ggg cct tac ttg ttg gat gtg att 1872
 Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
 610 615 620
 gtg ccg cat caa gaa cac gtg ttg ccc atg atc ccg gct ggc gga ggt 1920
 Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 ttc tcg gat gtg atc acc gag ggt gat ggc aga acg aaa tat tga 1965
 Phe Ser Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr *
 645 650

<210> 4
 <211> 654
 <212> PRT
 <213> Helianthus annuus

<400> 4
 Met Ala Ala Pro Pro Asn Pro Ser Ile Ser Phe Lys Pro Pro Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Leu Pro Pro Arg Ser Ala Phe Leu Pro Arg Phe Ala Leu
 20 25 30
 Pro Ile Thr Ser Thr Thr Gln Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn
 35 40 45
 Val Leu Ser Asp Ser Lys Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gln Pro
 50 55 60
 Pro Leu Gln Ala Gln Pro Phe Val Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro
 65 70 75 80
 Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val
 85 90 95
 Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 100 105 110

Ala Leu Thr Arg Ser Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
 115 120 125
 Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu
 130 135 140
 Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
 165 170 175
 Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 180 185 190
 Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
 195 200 205
 Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr
 210 215 220
 Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg
 245 250 255
 Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His
 260 265 270
 Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu
 275 280 285
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe
 290 295 300
 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
 305 310 315 320
 Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
 325 330 335
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu
 340 345 350
 Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
 355 360 365
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 370 375 380
 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys
 385 390 395 400
 Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val
 405 410 415
 Thr Asn Leu Asp Phe Ser Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys
 420 425 430
 Val Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
 435 440 445
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile
 450 455 460
 Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
 465 470 475 480
 Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala
 485 490 495
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro
 500 505 510
 Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met Asn
 515 520 525
 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile
 530 535 540
 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 545 550 555 560
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser
 565 570 575
 Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys
 580 585 590
 Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala
 595 600 605
 Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile

```

      610          615          620
Val Pro His Glu Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly
625          630          635          640
Phe Ser Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
      645          650

```

<210>	5
<211>	2156
<212>	DNA
<213>	Xanthium sp.

```
<220>
<221> CDS
<222> (111)...(2057)
```

```
<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> Acesso GenBank No. U16279
```

<400>	5															60
gaacaacagc	cacatgtttc	tggaccatcg	tcgttcacac	ctatttttaat	cagataaaca										116	
aagtacaaac	ataacataac	ataaccctag	tacataaacac	acattcaaca	atg gcg										116	
Met Ala																
1																
gcc atc cct cat aca aac cct tcc atc acc acc aaa cca ccc tca tct											164					
Ala Ile Pro His Thr Asn Pro Ser Ile Thr Thr Lys Pro Pro Ser Ser																
5	10 15															
cca cca cgt ccc acc ttc ctc gcc cgt ttc aca ttc cca ata acc tcc											212					
Pro Pro Arg Pro Thr Phe Leu Ala Arg Phe Thr Phe Pro Ile Thr Ser																
20	25 30															
act tcc cat aaa cga cac cgt ctc cac atc tcc aac gtc ctc tcc gac											260					
Thr Ser His Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn Val Leu Ser Asp																
35	40 45 50															
tcc aaa ccc acc atc acc cat tca cca tta cca acc gaa tca ttt atc											308					
Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Glu Ser Phe Ile																
	55 60 65															
tcc cgt tac gct cca gac caa cca aga aaa ggc gct gat gtt ctc gtc											356					
Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val																
70	75 80															
gaa gct ctg gaa cgt gaa ggc gtt aca gac gtc ttc gct tac cca ggt											404					
Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly																
85	90 95															
ggt gcc tcc atg gag atc cac caa gct ctc acg cgc tca acc acc atc											452					
Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr Thr Ile																
100	105 110															
cgc aac gtt ctc cca cgt cac gaa cag ggc ggc gtc ttt gct gcc gaa											500					
Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu																
115	120 125 130															
ggc tac gca cgt gcc tcc ggt ctt ccc ggc gtc tgt att gca acc tct											548					
Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser																
	135 140 145															
ggt cct gga gct acg aac cta gta agt ggt ctt gct gat gct tta tta											596					
Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu																
150	155 160															
gac agt gtt cca atg gtt gct att act ggt caa gtt ccc agg aga atg											644					
Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met																
165	170 175															
att gga aca gat gcg ttt caa gaa acc cct att gtt gag gta aca cgt											692					
Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg																
180	185 190															
tcc att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gtc gag gat att ccc											740					
Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro																
195	200 205 210															

```

agg att gtt agg gaa gct ttt tat ctt gcg tct tct ggt cga ccc gga 788
Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly
      215      220      225
ccg gtt tta att gat gta cct aag gat ata cag cag cag ttg gta gtg 836
Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val
      230      235      240
cct aaa tgg gat gag cct att agg tta cct ggg tat ttg tct agg ttg 884
Pro Lys Trp Asp Glu Pro Ile Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Leu
      245      250      255
cct aaa acg gag aat aat ggg cag ttg gaa cac att gtt agg ttg gtg 932
Pro Lys Thr Glu Asn Asn Gly Gln Leu Glu His Ile Val Arg Leu Val
      260      265      270
agt gag gcc aag agg ccg gtt ttg tat gtg ggg ggt ggg tgt ttg aat 980
Ser Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn
      275      280      285      290
tcg gga gat gag ttg agg cgg ttt gtg gag ctt acg ggg ata ccg gtt 1028
Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val
      295      300      305
gcg agt acg ttg atg ggg ctt gga gcg tac cct gct tct agt gat ttg 1076
Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu
      310      315      320
tcg ctg cat atg ctt ggg atg cat ggg acg gtt tat gcg aat tat gcg 1124
Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala
      325      330      335
gtt gat aag agt gat ttg ttg ctt gcg ttt ggg gta agg ttt gat gac 1172
Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp
      340      345      350
cgt gtg acg ggg aag ctt gag gct ttt gct agc aga gct aag att gtt 1220
Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val
      355      360      365      370
cat att gat att gat tct gcg gaa att ggg aag aat aag cag cct cat 1268
His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His
      375      380      385
gtg tcg att tgt ggt gat atc aag gtc gcg tta cag ggt ctg aac aag 1316
Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys
      390      395      400
att ttg gag gta aag aat tcg gtg act aat ctt gat ttc tcg aac tgg 1364
Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser Asn Trp
      405      410      415
agg aag gaa ttg gat gag caa aag gtt aag tat ccg ttg agt ttt aaa 1412
Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser Phe Lys
      420      425      430
aca ttt ggc gaa gct att cct ccg cag tat gcc att caa gtg ctt gat 1460
Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp
      435      440      445      450
gag tta acg ggt ggg aat gcg att att agc act ggg gtc ggg cag cat 1508
Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His
      455      460      465
cag atg tgg gct gct cag ttt tac aaa tac aac aag cct aga caa tgg 1556
Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp
      470      475      480
ctg acg tca ggt gga cta ggc gcg atg ggt ttt ggg ttg ccc gct gct 1604
Leu Thr Ser Gly Glu Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala
      485      490      495
atc ggg gcg gct gtt gca aga cct gat gcg gta gta gtt gat atc gat 1652
Ile Gly Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp
      500      505      510
ggt gat gga agc ttt ata atg agc gtt caa gag tta gcc aca atc cgt 1700
Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Ser Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg
      515      520      525      530
gtt gaa aat ctt cct gtt aag att ttg tta ctt aac aat cag cat ttg 1748
Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu
      535      540      545

```

ggt atg gtg gtt cag ttg gag gat cgg ttt tac aag gcg aat cgg gct 1796
 Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala
 550 555 560
 cat acc tac tta gga aat ccg tca aaa gag tct gaa ata ttc cct aac 1844
 His Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn
 565 570 575
 atg ttg aag ttt gct gaa gcg tgt gat atc cca gct gcc cga gtg acc 1892
 Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr
 580 585 590
 cgg aag gca gat cta cga gca gct att cag aag atg ttg gat aca ccg 1940
 Arg Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro
 595 600 605 610
 ggg cct tac ttg ttg gat gtg atc gtg ccc cat caa gaa cat gtg ttg 1988
 Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu
 615 620 625
 ccc atg atc ccg gct ggt gga ggt ttc atg gat gtg atc acc gaa ggc 2036
 Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Met Asp Val Ile Thr Glu Gly
 630 635 640
 gac ggc aga atg aaa tat tga gcttcaatgt cacatatagt gtgttctgta 2087
 Asp Gly Arg Met Lys Tyr *
 645
 agcagtttgt cggttatgaa gttaaattgt ttgttgtgta atttcgttcc tgggttaaaaa 2147
 atcaagctt 2156

<210> 6
 <211> 648
 <212> PRT
 <213> Helianthus annuus

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

```

Leu Val Ser Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys
 275          280          285
Leu Asn Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile
 290          295          300
Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser
 305          310          315          320
Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn
 325          330          335
Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
 340          345          350
Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
 355          360          365
Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
 370          375          380
Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu
 385          390          395          400
Asn Lys Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser
 405          410          415
Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser
 420          425          430
Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
 435          440          445
Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
 450          455          460
Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg
 465          470          475          480
Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro
 485          490          495
Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val Asp
 500          505          510
Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Ser Val Gln Glu Leu Ala Thr
 515          520          525
Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln
 530          535          540
His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn
 545          550          555          560
Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe
 565          570          575
Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg
 580          585          590
Val Thr Arg Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp
 595          600          605
Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His
 610          615          620
Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Met Asp Val Ile Thr
 625          630          635          640
Glu Gly Asp Gly Arg Met Lys Tyr
 645

```

```

<210> 7
<211> 2156
<212> DNA
<213> Xanthium sp.

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (111)...(2057)

```

```

<221> misc_feature

```

<222> (0)...(0)

<223> Acesso GenBank No. U16280

<400> 7

gaacaacagc cacatgtttc tggaccatcg tcgttcacac ctattttaat cagataaaca 60
 aagtacaaac ataacataac ataaccctag tacataacac acattcaaca atg gcg 116

Met Ala

1

gcc atc cct cat aca aac cct tcc atc acc acc aaa cca ccc tca tct 164
 Ala Ile Pro His Thr Asn Pro Ser Ile Thr Thr Lys Pro Pro Ser Ser
 5 10 15
 cca cca cgt ccc acc ttc ctc gcc cgt ttc aca ttc cca ata acc tcc 212
 Pro Pro Arg Pro Thr Phe Leu Ala Arg Phe Thr Phe Pro Ile Thr Ser
 20 25 30
 act tcc cat aaa cga cac cgt ctc cac atc tcc aac gtc ctc tcc gac 260
 Thr Ser His Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn Val Leu Ser Asp
 35 40 45 50
 tcc aaa ccc acc atc acc cat tca cca tta cca acc aaa tca ttt atc 308
 Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Lys Ser Phe Ile
 55 60 65
 tcc cgt tac gct cca gac caa cca aga aaa ggc gct gat gtt ctc gtc 356
 Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val
 70 75 80
 gaa gct ctg gaa cgt gaa ggc gtt aca gac gtc ttc gct tac cca ggt 404
 Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly
 85 90 95
 ggt gcc tcc atg gag atc cac caa gct ctc acg cgc tca acc acc atc 452
 Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr Thr Ile
 100 105 110
 cgc aac gtt ctc cca cgt cac gaa cag ggc ggc gtc ttt gct gcc gaa 500
 Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu
 115 120 125 130
 ggc tac gca cgt gcc tcc ggt ctt ccc ggc gtc tgt att gca acc tct 548
 Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser
 135 140 145
 ggt cct gga gct acg aac cta gta agt ggt ctt gct gat gct tta tta 596
 Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu
 150 155 160
 gac agt gtt cca atg gtt gct att act ggt caa gtt ccc agg aga atg 644
 Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met
 165 170 175
 att gga aca gat gcg ttt caa gaa acc cct att gtt gag gta aca cgt 692
 Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg
 180 185 190
 tcc att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gtc gag gat att ccc 740
 Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro
 195 200 205 210
 agg att gtt agg gaa gct ttt tat ctt gcg tct tct ggt cga ccc gga 788
 Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly
 215 220 225
 ccg gtt tta att gat gta cct aag gat ata cag cag cag ttg gta gtg 836
 Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val
 230 235 240
 cct aaa tgg gat gag cct att agg tta cct ggg tat ttg tct agg ttc 884
 Pro Lys Trp Asp Glu Pro Ile Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Phe
 245 250 255
 cct aaa acg gag aat aat ggg cag ttg gaa cag att gtt agg ttg gtg 932
 Pro Lys Thr Glu Asn Asn Gly Gln Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val
 260 265 270

```

agt gag gcc aag agg ccg gtt ttg tat gtg ggg ggt ggg tgt ttg aat 980
Ser Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn
275      280      285      290
tcg gga gat gag ttg agg cgg ttt gtg gag ctt acg ggg ata ccg gtt 1028
Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val
295      300      305
gcg agt acg ttg atg ggg ctt gga gcg tac cct gct tct agt gat ttg 1076
Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu
310      315      320
tcg ctg cat atg ctt ggg atg cat ggg acc gtt tat gcg aat tat gcg 1124
Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala
325      330      335
gtt gat aag agt gat ttg ttg ctt gcg ttt ggg gta agg ttt gat gac 1172
Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp
340      345      350
cgt gtg acg ggg aag ctt gag gct ttt gct agc aga gct aag att gtt 1220
Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val
355      360      365      370
cat att gat att gat tct gcg gaa att ggg aag aat aag cag cct cat 1268
His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His
375      380      385
gtg tcg att tgt ggt gat att aag gtc gcg tta cag ggt ctg aac aag 1316
Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys
390      395      400
att ttg gag gta aag aat tcg gtg act aat ctt gat ttc tcg aac tgg 1364
Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser Asn Trp
405      410      415
agg aag gaa ttg gat gag caa aag gtt aag tat ccg ttg agt ttt aaa 1412
Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser Phe Lys
420      425      430
aca ttt ggc gaa gct att cct ccg cag tat gcc att caa gtg ctt gat 1460
Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp
435      440      445      450
gag tta acg ggt ggg aat gcg att att agc act ggg gtc ggg cag cat 1508
Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His
455      460      465
cag atg tgg gct gct cag ttt tac aaa tac aac aag cct aga caa tgg 1556
Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp
470      475      480
ctg acg tca ggt gga cta ggg gcg atg ggt ttt ggg ttg ccc gct gct 1604
Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala
485      490      495
atc ggg gcc gct gtt gca aga cct gat gcg gta gta gtt gat atc gat 1652
Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp
500      505      510
ggt gat gga agc ttt ata atg aac gtt caa gag tta gcc aca atc cgt 1700
Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg
515      520      525      530
gtt gaa aat ctt cct gtt aag att ttg tta ctt aac aat cag cat ttg 1748
Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu
535      540      545
ggt atg gtg gtt cag tgg gag gat cgg ttt tac aag gcg aat cgg gct 1796
Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala
550      555      560
cat acc tac tta gga aat ccg tca aaa gag tct gaa ata ttc cct aac 1844
His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn
565      570      575

```

atg ttg aag ttt gct gaa gcg tgt gat atc cca gct gcc cga gtg acc 1892
 Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr
 580 585 590
 cgg aag gca gat cta cga gca gct att cag aag atg ttg gat aca ccg 1940
 Arg Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro
 595 600 605 610
 ggg cct tac ttg ttg gat gtg atc gtg ccc cat caa gaa cat gtg ttg 1988
 Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu
 615 620 625
 ccc atg atc ccg gct ggt gga ggt ttc atg gat gtg atc acc gaa ggc 2036
 Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Met Asp Val Ile Thr Glu Gly
 630 635 640
 gac ggc aga atg aaa tat tga gcttcaatgt cacatatagt gtgttctgta 2087
 Asp Gly Arg Met Lys Tyr *
 645
 agcagtttgt cggttatgaa gttaaattgt ttgttgtgta atttcgttcc tgggttaaaaa 2147
 atcaagctt 2156

<210> 8
 <211> 648
 <212> PRT
 <213> Xanthium sp.

<400> 8
 Met Ala Ala Ile Pro His Thr Asn Pro Ser Ile Thr Thr Lys Pro Pro
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Pro Arg Pro Thr Phe Leu Ala Arg Phe Thr Phe Pro Ile
 20 25 30
 Thr Ser Thr Ser His Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn Val Leu
 35 40 45
 Ser Asp Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Lys Ser
 50 55 60
 Phe Ile Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr
 85 90 95
 Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr
 100 105 110
 Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala
 115 120 125
 Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala
 130 135 140
 Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala
 145 150 155 160
 Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg
 165 170 175
 Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val
 180 185 190
 Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp
 195 200 205
 Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg
 210 215 220
 Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu
 225 230 235 240
 Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Ile Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser
 245 250 255
 Arg Phe Pro Lys Thr Glu Asn Asn Gly Gln Leu Glu Gln Ile Val Arg
 260 265 270
 Leu Val Ser Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys
 275 280 285
 Leu Asn Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile
 290 295 300

Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
 340 345 350
 Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
 355 360 365
 Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
 370 375 380
 Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu
 385 390 395 400
 Asn Lys Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser
 405 410 415
 Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser
 420 425 430
 Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
 435 440 445
 Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
 450 455 460
 Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg
 465 470 475 480
 Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro
 485 490 495
 Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val Asp
 500 505 510
 Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr
 515 520 525
 Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln
 530 535 540
 His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn
 545 550 555 560
 Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe
 565 570 575
 Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg
 580 585 590
 Val Thr Arg Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp
 595 600 605
 Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His
 610 615 620
 Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Met Asp Val Ile Thr
 625 630 635 640
 Glu Gly Asp Gly Arg Met Lys Tyr
 645

<210> 9

<211> 2270

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (40)...(2052)

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> Acesso GenBank No. NM_114714

```

<400> 9
ctctgtttct ctatctcttg ctcacctttc tcctgaacc atg gcg gcg gca aca 54
Met Ala Ala Ala Thr
1 5
aca aca aca aca aca tct tct tcg atc tcc ttc tcc acc aaa cca tct 102
Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe Ser Thr Lys Pro Ser
10 15 20
cct tcc tcc tcc aaa tca cca tta cca atc tcc aga ttc tcc ctc cca 150
Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser Arg Phe Ser Leu Pro
25 30 35
ttc tcc cta aac ccc aac aaa tca tcc tcc tcc tcc cgc cgc cgc ggt 198
Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser Ser Arg Arg Arg Gly
40 45 50
atc aaa tcc agc tct ccc tcc tcc atc tcc gcc gtg ctc aac aca acc 246
Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala Val Leu Asn Thr Thr
55 60 65
acc aat gtc aca acc act ccc tct cca acc aaa cct acc aaa ccc gaa 294
Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys Pro Thr Lys Pro Glu
70 75 80 85
aca ttc atc tcc cga ttc gct cca gat caa ccc cgc aaa ggc gct gat 342
Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp
90 95 100
atc ctc gtc gaa gct tta gaa cgt caa ggc gta gaa acc gta ttc gct 390
Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val Glu Thr Val Phe Ala
105 110 115
tac cct gga ggt gca tca atg gag att cac caa gcc tta acc cgc tct 438
Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser
120 125 130
tcc tca atc cgt aac gtc ctt cct cgt cac gaa caa gga ggt gta ttc 486
Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe
135 140 145
gca gca gaa gga tac gct cga tcc tca ggt aaa cca ggt atc tgt ata 534
Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys Pro Gly Ile Cys Ile
150 155 160 165
gcc act tca ggt ccc gga gct aca aat ctc gtt agc gga tta gcc gat 582
Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp
170 175 180
gcg ttg tta gat agt gtt cct ctt gta gca atc aca gga caa gtc cct 630
Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro
185 190 195
cgt cgt atg att ggt aca gat gcg ttt caa gag act ccg att gtt gag 678
Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu
200 205 210
gta acg cgt tcg att acg aag cat aac tat ctt gtg atg gat gtt gaa 726
Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Asp Val Glu
215 220 225
gat atc cct agg att att gag gaa gct ttc ttt tta gct act tct ggt 774
Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe Leu Ala Thr Ser Gly
230 235 240 245
aga cct gga cct gtt ttg gtt gat gtt cct aaa gat att caa caa cag 822
Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln
250 255 260
ctt gcg att cct aat tgg gaa cag gct atg aga tta cct ggt tat atg 870
Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg Leu Pro Gly Tyr Met
265 270 275
tct agg atg cct aaa cct ccg gaa gat tct cat ttg gag cag att gtt 918
Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His Leu Glu Gln Ile Val
280 285 290
agg ttg att tct gag tct aag aag cct gtg ttg tat gtt ggt ggt ggt 966
Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
295 300 305
tgt ttg aat tct agc gat gaa ttg ggt agg ttt gtt gag ctt acg ggg 1014

```

Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly		
310			315			320			325								
atc	cct	gtt	gcg	agt	acg	ttg	atg	ggg	ctg	gga	tct	tat	cct	tgt	gat	1062	
Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asp		
		330			335			340									
gat	gag	ttg	tcg	tta	cat	atg	ctt	gga	atg	cat	ggg	act	gtg	tat	gca	1110	
Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala		
		345			350			355									
aat	tac	gct	gtg	gag	cat	agt	gat	ttg	ttg	ttg	gcg	ttt	ggg	gta	agg	1158	
Asn	Tyr	Ala	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg		
		360			365			370									
ttt	gat	gat	cgt	gtc	acg	ggt	aag	ctt	gag	gct	ttt	gct	agt	agg	gct	1206	
Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala		
		375			380			385									
aag	att	gtt	cat	att	gat	att	gac	tcg	gct	gag	att	ggg	aag	aat	aag	1254	
Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys		
		390			395			400									
act	cct	cat	gtg	tct	gtg	tgt	ggt	gat	gtt	aag	ctg	gct	ttg	caa	ggg	1302	
Thr	Pro	His	Val	Ser	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly		
		410			415			420									
atg	aat	aag	gtt	ctt	gag	aac	cga	gcg	gag	gag	ctt	aag	ctt	gat	ttt	1350	
Met	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Asp	Phe		
		425			430			435									
gga	gtt	tgg	agg	aat	gag	ttg	aac	gta	cag	aaa	cag	aag	ttt	ccg	ttg	1398	
Gly	Val	Trp	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Gln	Lys	Phe	Pro	Leu		
		440			445			450									
agc	ttt	aag	acg	ttt	ggg	gaa	gct	att	cct	cca	cag	tat	gcg	att	aag	1446	
Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Lys		
		455			460			465									
gtc	ctt	gat	gag	ttg	act	gat	gga	aaa	gcc	ata	ata	agt	act	ggt	gtc	1494	
Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val		
		470			475			480									
ggg	caa	cat	caa	atg	tgg	gcg	gcg	cag	ttc	tac	aat	tac	aag	aaa	cca	1542	
Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Lys	Pro		
		490			495			500									
agg	cag	tgg	cta	tca	tca	gga	ggc	ctt	gga	gct	atg	gga	ttt	gga	ctt	1590	
Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu		
		505			510			515									
cct	gct	gcg	att	gga	gcg	tct	gtt	gct	aac	cct	gat	gcg	ata	gtt	gtg	1638	
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	Asp	Ala	Ile	Val	Val		
		520			525			530									
gat	att	gac	gga	gat	gga	agc	ttt	ata	atg	aat	gtg	caa	gag	cta	gcc	1686	
Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala		
		535			540			545									
act	att	cgt	gta	gag	aat	ctt	cca	gtg	aag	gta	ctt	tta	tta	aac	aac	1734	
Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn		
		550			555			560									
cag	cat	ctt	ggc	atg	gtt	atg	caa	tgg	gaa	gat	cgg	ttc	tac	aaa	gct	1782	
Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Met	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala		
		570			575			580									
aac	cga	gct	cac	aca	ttt	ctc	ggg	gat	ccg	gct	cag	gag	gac	gag	ata	1830	
Asn	Arg	Ala	His	Thr	Phe	Leu	Gly	Asp	Pro	Ala	Gln	Glu	Asp	Glu	Ile		
		585			590			595									
ttc	ccg	aac	atg	ttg	ctg	ttt	gca	gca	gct	tgc	ggg	att	cca	gcg	gcg	1878	
Phe	Pro	Asn	Met	Leu	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Ile	Pro	Ala	Ala		
		600			605			610									
agg	gtg	aca	aag	aaa	gca	gat	ctc	cga	gaa	gct	att	cag	aca	atg	ctg	1926	
Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	Thr	Met	Leu		
		615			620			625									
gat	aca	cca	gga	cct	tac	ctg	ttg	gat	gtg	att	tgt	ccg	cac	caa	gaa	1974	
Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Cys	Pro	His	Gln	Glu		
		630			635			640									
cat	gtg	ttg	ccg	atg	atc	ccg	agt	ggt	ggc	act	ttc	aac	gat	gtc	ata	2022	

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asp Val Ile
 650 655 660
 acg gaa gga gat ggc cgg att aaa tac tga gagatgaaac cgggtgattat 2072
 Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr *
 665 670
 cagaaccttt tatggctcttt gtatgcatat ggtaaaaaaaaa cttagtttgc aatttcctgt 2132
 ttgttttggg aatttgagtt tcttttagtt gttgatctgc ctgctttttg gtttacgtca 2192
 gactactact gctgtgttg tttggtttcc tttctttcat ttataaata aataatccgg 2252
 ttcggtttac tccttgtg 2270

<210> 10
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 10
 Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
 20 25 30
 Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
 50 55 60
 Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
 65 70 75 80
 Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
 85 90 95
 Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
 100 105 110
 Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 115 120 125
 Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
 130 135 140
 Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
 145 150 155 160
 Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 165 170 175
 Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
 180 185 190
 Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 195 200 205
 Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
 210 215 220
 Val Met Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
 225 230 235 240
 Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys
 245 250 255
 Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg
 260 265 270
 Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
 275 280 285
 Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu
 290 295 300
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe
 305 310 315 320
 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
 325 330 335
 Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
 340 345 350
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu
 355 360 365
 Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
 370 375 380

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
 385 390 395 400
 Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys
 405 410 415
 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
 420 425 430
 Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys
 435 440 445
 Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
 450 455 460
 Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
 465 470 475 480
 Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
 485 490 495
 Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala
 500 505 510
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 515 520 525
 Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
 530 535 540
 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
 545 550 555 560
 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
 565 570 575
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
 580 585 590
 Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
 595 600 605
 Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
 610 615 620
 Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
 625 630 635 640
 Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr
 645 650 655
 Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
 660 665 670

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR C2359-FI

<400> 11
 agatcaaccg agaaaaggcg 20

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR ALSRI

<400> 12
 cgaaaaatca agattagtca cc 22

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR SUNALS1-F1

 <400> 13
 gaggaaaaga attcgggtgac t 21

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR ALS1-8R

 <400> 14
 cggtgatcac atccgagaaa 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-2R

 <400> 15
 catcggttcc gatcattctc 20

 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-2F

 <400> 16
 gtgtcaccga cgtcttcgc 19

 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-3R

 <400> 17
 ctagacaaat aacccggtaa cc 22

 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-3F

 <400> 18
 gcgctgttag acagtgtcc 19

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-4F

<400> 19
 acagcaacag ttagtggtg 19

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-6R

<400> 20
 cggcagattt tcaacacgga 20

<210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-7F

<400> 21
 agacaatggc tgacgtcgg 19
]

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR ALS-8F

<400> 22
 tatggtgggtt cagtgggagg 20

<210> 23
 <211> 1968
 <212> DNA
 <213> Helianthus annus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1965)

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> Acesso GenBank No. AY541451

<400> 23

```

atg gcg gct cct ccc aac cct tcc atc tcc ttc aaa cca ccg tca ccc 48
Met Ala Ala Pro Pro Asn Pro Ser Ile Ser Phe Lys Pro Pro Ser Pro
1      5      10      15
gcc gcc gca ctg cca cca cgc tcc gcc ttc ctc ccc cgt ttc gca tta 96
Ala Ala Ala Leu Pro Pro Arg Ser Ala Phe Leu Pro Arg Phe Ala Leu
      20      25      30
ccc atc act tcc act acc caa aaa cga cac cgt ctt cac atc tcc aat 144
Pro Ile Thr Ser Thr Thr Gln Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn
      35      40      45
gtt ctc tcc gac tcc aaa tcc acc acc acc acc acc acc acc act caa 192
Val Leu Ser Asp Ser Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gln
      50      55      60
cga ccg tta ccg gtg cag cct ttt gtc tcc cgt tac gcg cca gat caa 240
Arg Pro Leu Pro Val Gln Pro Phe Val Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln
      65      70      75      80
ccg aga aaa ggc gca gac gtg ttg gtg gaa gct ctg gaa ccg gaa ggt 288
Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly
      85      90      95
gtc acc gac gtc ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac 336
Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His
      100      105      110
caa gct ctc acg cgc tca agc act atc cgc aat gtg ctc ccc cgt cac 384
Gln Ala Leu Thr Arg Ser Ser Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His
      115      120      125
gaa cag ggc ggc gtg ttc gcc gcc gaa ggc tac gcg cgc gcc tcc ggt 432
Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly
      130      135      140
ctt ccc ggc gtg tgt atc gcc act tcc ggt ccc gga gct acg aac cta 480
Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
      145      150      155      160
gtt agt ggt ctt gct gac gcg ctg tta gac agt gtc ccc atg gtg gca 528
Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
      165      170      175
atc acc ggt caa gtt ccc cgg aga atg atc gga acc gat gcg ttt caa 576
Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
      180      185      190
gaa acc cca att gtt gag gta aca cgt tcg atc act aaa cat aat tat 624
Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
      195      200      205
ctt gtg ttg gat gtt gag gat att ccc aga att gtt cgt gag gct ttt 672
Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe
      210      215      220
tat ctt gcg agt tcg ggt cga ccc ggc ccg gtt ttg ata gat gta ccg 720
Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro
      225      230      235      240
aaa gat ata cag caa cag tta gtg gtg ccg aaa tgg gat gaa ccg atg 768
Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met
      245      250      255
agg tta ccg ggt tat ttg tct aga atg ccg aag cct caa tat gat ggg 816
Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly
      260      265      270
cat ttg gaa cag att gtt agg ttg gtg ggg gaa gcg aag agg ccg gtt 864
His Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val
      275      280      285
ttg tat gtg ggt ggt ggg tgt ttg aat tcg gat gat gag ttg agg ccg 912
Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg
      290      295      300

```

```

ttt gtg gag ctt acg ggg att ccg gtt gcg agt act ttg atg ggg ctc 960
Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu
305          310          315          320
gga gcg tac cct gct tcg agt gat ttg tcg ctt cat atg ctt ggg atg 1008
Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met
          325          330          335
cat ggt acg gtt tat gcg aat tat gcg gtt gat aag agt gat ttg ttg 1056
His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu
          340          345          350
ctt gcg ttt ggg gtg cgg ttt gat gat cgt gtg acg ggg aag ctt gag 1104
Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu
          355          360          365
gcg ttt gct agt agg gcg aag att gtt cat att gat att gat cct gct 1152
Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala
          370          375          380
gaa att ggg aag aat aag cag cct cat gtg tcg att tgt ggt gat att 1200
Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile
          385          390          395          400
aag gtc gcg tta cag ggt ttg aac aag att ttg gag gaa aag aat tcg 1248
Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser
          405          410          415
gtg act aat ctt gat ttt tcg acc tgg aga aag gaa ttg gat gaa caa 1296
Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln
          420          425          430
aaa atg aag ttc ccg ttg agc ttt aaa acg ttt ggc gaa gcg att cct 1344
Lys Met Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro
          435          440          445
cca cag tat gct att caa gtt ctt gat gag tta acg ggc ggg aat gca 1392
Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala
          450          455          460
att att agc acc ggt gtc ggg caa cat cag atg tgg gct gct cag ttt 1440
Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe
          465          470          475          480
tac aaa tac aac aaa cct aga caa tgg ctg acg tcg ggc ggg cta ggg 1488
Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly
          485          490          495
gca atg ggt ttc ggc ctg ccc gct gct atc ggg gcg gcc gtt gca aga 1536
Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg
          500          505          510
cct gat gcg gta gta gtt gac atc gac ggt gac gga agc ttt atg atg 1584
Pro Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met
          515          520          525
aat gtt caa gag tta gcc aca atc cgt gtt gaa aat ctg ccg gtt aag 1632
Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys
          530          535          540
att tta tta ctt aac aac cag cat ttg ggt atg gtg gtt cag tgg gag 1680
Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu
          545          550          555          560
gat cgg ttt tac aag gcg aat cgg gct cat acc tac tta gga aac ccg 1728
Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro
          565          570          575
tca aaa gag tcg gaa ata ttc cct aac atg gtg aag ttt gct gaa gcc 1776
Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Val Lys Phe Ala Glu Ala
          580          585          590
tgt gat atc ccg gct gct cga gtg acc caa aag gcg gat cta cga gca 1824
Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala
          595          600          605
gct att cag aag atg ttg gat aca ccc ggg cct tac ttg ttg gat gtg 1872
Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val
          610          615          620
att gtg ccg cat caa gaa cac gtg ttg ccc atg atc ccg gct ggc gga 1920
Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly
          625          630          635          640

```

ggt ttc tcg gat gtg atc acc gag ggt gat ggc aga acg aaa tat 1965
 Gly Phe Ser Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
 645 650 655
 tga 1968
 <210> 24
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> Helianthus annuus
 <400> 24
 Met Ala Ala Pro Pro Asn Pro Ser Ile Ser Phe Lys Pro Pro Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Leu Pro Pro Arg Ser Ala Phe Leu Pro Arg Phe Ala Leu
 20 25 30
 Pro Ile Thr Ser Thr Thr Gln Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn
 35 40 45
 Val Leu Ser Asp Ser Lys Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gln
 50 55 60
 Arg Pro Leu Pro Val Gln Pro Phe Val Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln
 65 70 75 80
 Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly
 85 90 95
 Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His
 100 105 110
 Gln Ala Leu Thr Arg Ser Ser Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His
 115 120 125
 Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly
 130 135 140
 Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
 145 150 155 160
 Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
 165 170 175
 Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
 180 185 190
 Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe
 210 215 220
 Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met
 245 250 255
 Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly
 260 265 270
 His Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val
 275 280 285
 Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg
 290 295 300
 Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu
 305 310 315 320
 Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met
 325 330 335
 His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu
 340 345 350
 Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu
 355 360 365
 Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala
 370 375 380
 Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile
 385 390 395 400
 Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser
 405 410 415
 Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln
 420 425 430

Lys Met Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro
 435 440 445
 Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala
 450 455 460
 Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe
 465 470 475 480
 Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly
 485 490 495
 Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg
 500 505 510
 Pro Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met
 515 520 525
 Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys
 530 535 540
 Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu
 545 550 555 560
 Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro
 565 570 575
 Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Val Lys Phe Ala Glu Ala
 580 585 590
 Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala
 595 600 605
 Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val
 610 615 620
 Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Phe Ser Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
 645 650 655

<210> 25
 <211> 2664
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (666)...(2582)

<221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> Acesso GenBank número X63553

<400> 25
 gatccccgat gggatttattc tccgtgggga acgggggatgg agaagaaatg tctctcgcaa 60
 gagttcgtgg gaatccccgc gggaaatttt tttgtcgcg ggacagatac ggatacggcg 120
 agccaaagggt tgccatccct aacaccgaca ccgggcctga cgctgtcgcc gcagctgtctc 180
 atcttgtggt tgtgggctgt gcccggtttc cctgttgcg attgcgggtg gcagcctggc 240
 aggtgggtgc gaccogtttg gattcccttg tctgggcccc ttgtgtcagt accgtctgta 300
 ctccgatgac atgcaccgtc gtccacagtc aagtccaaaa tctccctct tttttaacgg 360
 aacagttcaa aacctccttg acgcacgctg tctgttacca gactcgggtg gacaccacgt 420
 ttgtaatgca ggccgacacg tcggtccac gtcgacaggc cccaccgtcc ggtctgtagc 480
 gtgtacgtat tcgggcgacg gacgtgtcgt cgtcgtcttg cgagtcccat tcccatcacc 540
 atctgagcca cacatcctct gaacaaaagc agggaggcct ctacgcacat ccccttgct 600
 cccactccgt gtccgtggca cccaccccaa accctcgcg cgctccgag acagccgccc 660
 caacc atg gcc acc gcc gcc gcc gcg tct acc gcg ctc act ggc gcc act 710
 Met Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ser Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr
 1 5 10 15
 acc gct gcg ccc aag gcg agg cgc cgg gcg cac ctc ctg gcc acc cgc 758
 Thr Ala Ala Pro Lys Ala Arg Arg Arg Ala His Leu Leu Ala Thr Arg
 20 25 30
 cgc gcc ctc gcc gcg ccc atc agg tgc tca gcg gcg tca ccc gcc atg 806
 Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Ala Ser Pro Ala Met
 35 40 45

```

ccg atg gct ccc ccg gcc acc ccg ctc cgg ccg tgg ggc ccc acc gat 854
Pro Met Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Thr Asp
    50          55          60
ccc cgc aag ggc gcc gac atc ctc gtc gag tcc ctc gag cgc tgc ggc 902
Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ser Leu Glu Arg Cys Gly
    65          70          75
gtc cgc gac gtc ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tcc atg gag atc cac 950
Val Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His
    80          85          90          95
cag gca ctc acc cgc tcc ccc gtc atc gcc aac cac ctc ttc cgc cac 998
Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Ala Asn His Leu Phe Arg His
    100          105          110
gag caa ggg gag gcc ttt gcg gcc tcc ggc tac gcg cgc tcc tcg ggc 1046
Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly
    115          120          125
cgc gtc ggc gtc tgc atc gcc acc tcc ggc ccc ggc gcc acc aac ctt 1094
Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
    130          135          140
gtc tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gat tcc gtc ccc atg gtc gcc 1142
Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
    145          150          155
atc acg gga cag gtg ccg cga cgc atg att ggc acc gac gcc ttc cag 1190
Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
    160          165          170          175
gag acg ccc atc gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac aac tac 1238
Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
    180          185          190
ctg gtc ctc gac gtc gac gac atc ccc cgc gtc gtg cag gag gct ttc 1286
Leu Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe
    195          200          205
ttc ctc gcc tcc tct ggt cga ccg ggg ccg gtg ctt gtc gac atc ccc 1334
Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro
    210          215          220
aag gac atc cag cag cag atg gcg gtg cct gtc tgg gac aag ccc atg 1382
Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Lys Pro Met
    225          230          235
agt ctg cct ggg tac att gcg cgc ctt ccc aag ccc cct gcg act gag 1430
Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu
    240          245          250          255
ttg ctt gag cag gtg ctg cgt ctt gtt ggt gaa tcc ccg cgc cct gtt 1478
Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val
    260          265          270
ctt tat gtt ggc ggt ggc tgc gca gca tct ggt gag gag ttg cga cgc 1526
Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg
    275          280          285
ttt gtg gag ctg act gga atc ccg gtc aca act act ctt atg ggc ctc 1574
Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu
    290          295          300
ggc aac ttc ccc agc gac gac cca ctg tct ctg cgc atg cta ggt atg 1622
Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met
    305          310          315
cat ggc acg gtg tat gca aat tat gca gtg gat aag gcc gat ctg ttg 1670
His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu
    320          325          330          335
ctt gca ctt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aag att gag 1718
Leu Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu
    340          345          350
gct ttt gca agc agg gct aag att gtg cac gtt gat att gat ccg gct 1766
Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala
    355          360          365
gag att ggc aag aac aag cag cca cat gtg tcc atc tgt gca gat gtt 1814
Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val
    370          375          380

```

```

aag ctt gct ttg cag ggc atg aat gct ctt ctt gaa gga agc aca tca 1862
Lys Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser
385          390          395
aag aag agc ttt gac ttt ggc tca tgg aac gat gag ttg gat cag cag 1910
Lys Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln
400          405          410          415
aag agg gaa ttc ccc ctt ggg tat aaa aca tct aat gag gag atc cag 1958
Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln
420          425          430
cca caa tat gct att cag gtt ctt gat gag ctg acg aaa ggc gag gcc 2006
Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala
435          440          445
atc atc ggc aca ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca cag tac 2054
Ile Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr
450          455          460
tac act tac aag cgg cca agg cag tgg ttg tct tca gct ggt ctt ggg 2102
Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly
465          470          475
gct atg gga ttt ggt ttg ccg gct gct gct ggt gct tct gtg gcc aac 2150
Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn
480          485          490          495
cca ggt gtt act gtt gtt gac atc gat gga gat ggt agc ttt ctc atg 2198
Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met
500          505          510
aac gtt cag gag cta gct atg atc cga att gag aac ctc ccg gtg aag 2246
Asn Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys
515          520          525
gtc ttt gtg cta aac aac cag cac ctg ggg atg gtg gtg cag tgg gag 2294
Val Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu
530          535          540
gac agg ttc tat aag gcc aac aga gcg cac aca tac ttg gga aac cca 2342
Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro
545          550          555
gag aat gaa agt gag ata tat cca gat ttc gtg acg atc gcc aaa ggg 2390
Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly
560          565          570          575
ttc aac att cca gcg gtc cgt gtg aca aag aag aac gaa gtc cgc gca 2438
Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala
580          585          590
gcg ata aag aag atg ctc gag act cca ggg ccg tac ctc ttg gat ata 2486
Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile
595          600          605
atc gtc cca cac cag gag cat gtg ttg cct atg atc cct agt ggt ggg 2534
Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly
610          615          620
gct ttc aag gat atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg tac tga 2582
Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr *
625          630          635
tctaaaatcc agcaagcaac tgatctaaaa tccagcaagc accgcctccc tgctagtaca 2642
aggtgatatg tttatctgtg tg 2664

```

<210> 26
 <211> 638
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 26
 Met Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ser Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Lys Ala Arg Arg Arg Ala His Leu Leu Ala Thr Arg Arg
 20 25 30
 Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Ala Ser Pro Ala Met Pro
 35 40 45

Met Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 50 55 60
 Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ser Leu Glu Arg Cys Gly Val
 65 70 75 80
 Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 85 90 95
 Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Ala Asn His Leu Phe Arg His Glu
 100 105 110
 Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Arg
 115 120 125
 Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 130 135 140
 Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 165 170 175
 Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
 180 185 190
 Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe Phe
 195 200 205
 Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys
 210 215 220
 Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Lys Pro Met Ser
 225 230 235 240
 Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu
 245 250 255
 Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val Leu
 260 265 270
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe
 275 280 285
 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly
 290 295 300
 Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His
 305 310 315 320
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu
 325 330 335
 Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala
 340 345 350
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 355 360 365
 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys
 370 375 380
 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys
 385 390 395 400
 Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys
 405 410 415
 Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro
 420 425 430
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile
 435 440 445
 Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr
 450 455 460
 Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala
 465 470 475 480
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 485 490 495
 Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn
 500 505 510
 Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
 515 520 525
 Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 530 535 540
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu

545			550			555			560						
Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val	Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Phe
		565			570			575							
Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Ala	Ala
		580			585			590							
Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile
		595			600			605							
Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala
		610			615			620							
Phe	Lys	Asp	Met	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Val	Tyr		
		625			630			635							

REIVINDICAÇÕES

1. Planta de girassol, caracterizada pelo fato de compreender em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo de subunidade grande de ácido aceto-hidróxi sintase (AHASL), em que referido polinucleotídeo AHASL codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente, e em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos uma herbicida quando comparado a uma planta de girassol de tipo selvagem.

2. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que referido herbicida é selecionado dentre o grupo consistindo de herbicida imidazolinonas, herbicida sulfoniluréias, herbicidas triazolopirimidina, herbicidas pirimidiniloxibenzoato, e herbicidas sulfonilamino-carboniltriasolinona.

3. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que referida proteína AHASL resistente a herbicida compreende uma isoleucina em posição de aminoácido 188 ou posição equivalente.

4. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que referido polinucleotídeo AHASL é selecionado dentre o grupo consistindo de um polinucleotídeo *AHASL1*, um polinucleotídeo *AHASL2*, e um polinucleotídeo *AHASL3*.

5. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referida proteína AHASL resistente a herbicida *AHASL1*.

6. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que referido *AHASL1* compreende a seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2.

7. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que referido polinucleotídeo AHASL resistente a herbicida compreende uma seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1.

8. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referida proteína AHASL resistente a herbicida ainda compreende pelo menos um membro selecionado dentre o grupo consistindo de:

(a) uma treonina em posição de aminoácido 107 ou posição equivalente;

(b) uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina em posição de aminoácido 182 ou posição equivalente;

(c) um aspartato ou valina em posição de aminoácido 190 ou posição equivalente;

(d) uma leucina em posição de aminoácido 559 ou posição equivalente; e

(e) uma asparagina, treonina, ou fenilalanina em posição de aminoácido 638 ou posição equivalente.

9. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que referida planta é transgênica.

10. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que referida planta não é transgênica.

11. Semente da planta de girassol como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que referida semente compreende em seu genoma pelo menos uma cópia de referido polinucleotídeo AHASL.

12. Planta de girassol, caracterizada pelo fato de compreender

as características de resistência ao herbicida da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325.

13. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que referida planta:

- 5 (a) tem Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;
(b) é uma descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;
(c) é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente
10 ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; ou
(d) é uma planta que é um descendente de pelo menos uma das plantas de (a)- (c).

14. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 12 ou 13,
15 caracterizada pelo fato de que referida planta tem melhorada resistência a pelo menos um herbicida selecionado dentre o grupo consistindo de herbicidas imidazolinona, herbicidas sulfoniluréia, herbicidas triazolopirimidina, herbicidas pirimidiniloxibenzoato, e herbicidas sulfonilamino-carboniltriazolinona.

20 15. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que referida planta é transgênica.

16. Planta de girassol de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que referida planta não é
25 transgênica.

17. Semente da planta de girassol como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 16, caracterizada pelo fato de que referida semente compreende as características de resistência a herbicida da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325.

18. Método para controlar ervas daninhas na proximidade de uma planta de girassol, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida imidazolinona, um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, um herbicida triazolopirimidina, um herbicida pirimidiniloxibenzoato, um herbicida sulfonilamino-carboniltriazzolinona, ou mistura dos mesmos às ervas daninhas e a uma planta de girassol, referida planta de girassol é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma planta de girassol de tipo selvagem,

(b) uma planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

(d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

(f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325.

5 19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-)] imidiazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)- 3-quinolinacarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-)] 5-oxo-2-
10 imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila, [2-(4-)] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin- 2-il)-p-toluato de metila, e mistura dos mesmos.

15 20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionado dentre o grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila,
20 triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

25 21. Molécula de polinucleotídeo isolado, caracterizada pelo fato de compreender a seqüência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1 ou

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2 ou 4;

5 (c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de ácido aceto-hidróxi sintase (AHAS) resistente a herbicida;

10 (d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

15 (e) uma sequência nucleotídica que é completamente complementar a pelo menos uma sequência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de sequências nucleotídicas especificadas em (a)-(d).

20 22. Molécula de polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que referida proteína codificada pela sequência nucleotídica de (c) ou (d), ainda compreende pelo menos um membro selecionado dentre o grupo consistindo de:

(a) uma treonina em posição de aminoácido 107 ou posição equivalente;

25 (b) uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina em posição de aminoácido 182 ou posição equivalente;

(c) um aspartato ou valina em posição de aminoácido 190 ou posição equivalente;

(d) uma leucina em posição de aminoácido 559 ou posição equivalente; e

(e) uma asparagina, treonina, ou fenilalanina em posição de aminoácido 638 ou posição equivalente.

23. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um promotor ligado operativamente à molécula de polinucleotídeo como definido na reivindicação 21 ou 22.

24. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que referido promotor é capaz de direcionar expressão de genes em uma bactéria, célula fúngica, célula de animal ou célula de planta.

25. Célula hospedeira não humana, caracterizada pelo fato de ser transformada com o cassete de expressão como definido na reivindicação 23 ou 24.

26. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que referida célula hospedeira é selecionada dentre o grupo consistindo de uma bactéria, célula fúngica, célula de animal ou célula de planta.

27. Vetor de transformação, caracterizado pelo fato de compreender um gene de interesse e um gene marcador selecionável, referido gene marcador selecionável compreendendo um promotor ligado operativamente a uma sequência nucleotídica, em que referido promotor direciona expressão em uma célula hospedeira e referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou

posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

28. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que referido promotor é expressável em uma célula de planta.

29. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que referido promotor é um promotor constitutivo.

30. Vetor de transformação de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 29, caracterizado pelo fato de que referido gene marcador selecionável ainda compreende uma sequência de marcação de cloroplasto ligado operativamente.

31. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que referido promotor é expressável em uma bactéria ou uma levedura.

32. Célula hospedeira não humana, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de transformação como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 31.

33. Planta transformada, caracterizada pelo fato de compreender estavelmente incorporado em seu genoma uma construção de polinucleotídeo compreendendo a sequência nucleotídica ligado operativamente para um promotor que direciona expressão em uma célula de planta, em que referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1 ou 3;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2 ou 4;

5 (c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de
10 AHAS resistente a herbicida;

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição
15 equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(e) uma sequência nucleotídica que é completamente complementar a pelo menos uma sequência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de sequências nucleotídicas especificadas em (a)-(d).

20 34. Planta transformada de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que referido promotor é selecionado dentre o grupo consistindo de promotores constitutivos e promotores preferidos de tecido.

35. Planta transformada de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que referida construção de polinucleotídeo ainda compreende uma sequência de marcação de cloroplasto ligado
25 operativamente.

36. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizada pelo fato de que a atividade AHAS de referida planta transformada é aumentada com relação a uma planta não transformada.

37. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, caracterizada pelo fato de que a resistência de referida planta transformada a pelo menos um herbicida é aumentada quando comparada a uma planta não transformada.

5 38. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizada pelo fato de que referido herbicida é um herbicida imidazolinona.

39. Planta transformada de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado
 10 dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinecarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila e [2-(4-] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila.

40. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizada pelo fato de que referido herbicida é um
 20 herbicida sulfoniluréia.

41. Planta transformada de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionado dentre o grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron,

sulfosulfuron, trifloxysulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

42. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 41, caracterizada pelo fato de que referida planta transformada é uma dicotiledônea ou monocotiledônea.

5 43. Planta transformada de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que referida dicotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica* spp., *Arabidopsis thaliana*, tabaco, batata, beterraba, alfafa, cártamo, e amendoim.

10 44. Planta transformada de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que referida monocotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de trigo, arroz, milho, cevada, centeio, aveia, triticale, mileto, e sorgo.

15 45. Semente transformada da planta transformada como definida em qualquer uma das reivindicações 33 a 44, caracterizada pelo fato de que referida semente compreende referida construção de polinucleotídeo.

20 46. Célula de planta transformada, caracterizada pelo fato de compreender estavelmente incorporada em seu genoma uma construção de polinucleotídeo compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta, em que referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1 ou 3;

25 (b) a sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2 ou 4;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou

posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida;

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(e) uma sequência nucleotídica que é completamente complementar a pelo menos uma sequência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de sequências nucleotídicas especificadas em (a)-(d).

47. Método para aumentar a atividade de AHAS em uma planta, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula de planta com uma construção de polinucleotídeo compreendendo uma sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula de planta transformada, em que referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1 ou 3;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2 ou 4;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de

aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

5 em que a atividade de AHAS é aumentada em referida planta ou pelo menos uma parte da mesma, quando comparada a uma planta não transformada.

48. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula de planta com uma construção de polinucleotídeo compreendendo a seqüência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta e regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada, em que referida seqüência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

- 15 (a) a seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1;
- (b) uma seqüência nucleotídica codificando a seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2;
- (c) uma seqüência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida seqüência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e
- 20 (d) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;
- 25

em que referida planta transformada tem aumentada resistência a pelo menos uma herbicida com relação à resistência de uma planta não

transformada para referido herbicida.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que referido promotor é selecionado dentre o grupo consistindo de promotores constitutivos e promotores preferidos de tecido.

5 50. Método de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que referida construção de polinucleotídeo ainda compreende uma seqüência de marcação de cloroplasto ligado operativamente.

10 51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 50, caracterizado pelo fato de que a atividade de AHAS de referida planta transformada é aumentada com relação a uma planta não transformada.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 51, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida imidazolinona.

15 53. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-)] imidiazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)- 3-quinolinecarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-] 5-oxo-2-
20 imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila e [2-(4-)] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila.

25 54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 51, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida sulfoniluréia.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionado dentre o grupo

consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 55, caracterizado pelo fato de que referida planta transformada é uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que referida dicotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, *Arabidopsis thaliana*, tabaco, batata, beterraba, alfafa, cártamo, e amendoim.

58. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que referida monocotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de trigo, arroz, milho, cevada, centeio, aveia, tritcale, mileto, e sorgo.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 58, caracterizado pelo fato de que referida célula de planta compreende resistência a pelo menos uma herbicida, antes da referida etapa de transformação.

60. Método para melhorar a tolerância a herbicida em uma planta tolerante a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de

transformar uma planta tolerante a herbicida com uma construção de polinucleotídeo compreendendo a seqüência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de

planta, e

regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada, em que referida seqüência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

- 5 (a) a seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1;
- (b) uma seqüência nucleotídica codificando a seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2;

- (c) uma seqüência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida seqüência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

- (d) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

- em que a tolerância a herbicida da referida planta tolerante a herbicida é aumentada na referida planta quando comparada a uma planta não transformada tolerante a herbicida.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida compreende uma proteína AHASL tolerante a herbicida, antes da referida etapa de transformação.

62. Método de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida não foi geneticamente engenheirado para expressar referida proteína AHASL tolerante a herbicida.

63. Método de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida foi geneticamente engenheirado para expressar referida proteína AHASL tolerante a herbicida.

5 64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 61, caracterizado pelo fato de que referida planta tolerante a herbicida é uma planta tolerante a imidazolinona, antes de referida etapa de transformação.

10 65. Método para selecionar uma célula de planta transformada, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

transformar uma célula de planta com o vetor de transformação de planta,

expor referida célula de planta transformada a pelo menos um herbicida em uma concentração que inibe o crescimento de uma célula de
15 planta não transformada, e

identificar referida célula de planta transformada por sua camada de crescer na presença de referido herbicida;

em que referido vetor de transformação de planta compreende um gene marcador selecionável compreendendo um promotor e uma
20 sequência nucleotídica ligada operativamente, referido promotor direciona expressão em uma célula de planta, e referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de
25 aminoácido especificada em SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou

posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, ou mistura dos mesmos.

67. Método de acordo com a reivindicação 65 ou 66, caracterizado pelo fato de que referida vetor de transformação de planta ainda compreende pelo menos um gene de interesse.

68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 67, caracterizado pelo fato ainda compreender a etapa de regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada.

69. Método para controlar ervas daninhas na proximidade de uma planta transformada, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida imidazolinona, um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, um herbicida triazolopirimidina, um herbicida pirimidiniloxibenzoato, um herbicida sulfonilamino-carboniltriasolinona, ou mistura dos mesmos às ervas daninhas e à planta transformada, em que referida planta transformada tem aumentada resistência ao herbicida imidazolinona quando comparada a uma planta não transformada, e a planta transformada compreende em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona a expressão do gene em uma célula de planta, referida sequência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

70. Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinecarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila, e [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila, e mistura dos mesmos.

71. Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionada dentre o grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflussulfuron metila,

triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 71, caracterizado pelo fato de que referida planta é uma dicotiledônea ou monocotiledônea.

73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que é referida dicotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, *Arabidopsis thaliana*, tabaco, batata, beterraba, alfafa, cártamo, e amendoim.

74. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que é referida monocotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de trigo, tritcale, milho, arroz, sorgo, centeio e mileto e cevada.

75. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácido selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) uma seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2 ou 4;

(b) a seqüência de aminoácido codificada por uma seqüência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1 ou 3;

(c) uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO:2, em que referido polipeptídeo compreende um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma seqüência de aminoácido codificada por uma seqüência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para

uma sequência nucleotídica especificada em SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo um aminoácido diferente de treonina em posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida.

5 76. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender o cruzamento de uma primeira planta, que é resistente a uma herbicida para uma segunda planta que não é resistente ao herbicida, em que a primeira planta é a planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 12 a 15, e 33 a 44.

10 77. Método de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de ainda compreender selecionar uma planta descendente que é resistente ao herbicida.

78. Planta resistente a herbicida, caracterizada pelo fato de ser produzida pelo método como definido na reivindicação 76 ou 77.

15 79. Semente da planta como definida na reivindicação 78, caracterizada pelo fato de que referida semente compreende as características resistentes a herbicida da primeira planta.

80. Método para aumentar a resistência a herbicida de uma planta, caracterizado pelo fato de compreender o cruzamento de uma primeira
20 planta em uma segunda planta, em que a primeira planta é a planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 12 a 15, 33 a 44, e 78.

81. Método de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de ainda compreender selecionar uma planta descendente que compreende aumentada resistência a herbicida quando comparada com a
25 resistência a herbicida da referida segunda planta.

82. Planta, caracterizada pelo fato de ser produzida pelo método como definido na reivindicação 77 ou 78.

83. Semente da planta como definida na reivindicação 82, caracterizada pelo fato de que referida semente compreende a resistência a

herbicida aumentada.

84. Semente da planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 12 a 15, 33 a 44, 78, e 82, caracterizada pelo fato de que referida semente é tratada com um herbicida inibidor de AHAS.

5

85. Método para combater vegetação indesejada, caracterizado pelo fato de compreender contatar uma semente da planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 12 a 15, 33 a 44, 78, e 82, antes de semear e/ou após a pré-germinação com um herbicida inibidor de AHAS.

100

MUT9	SUNALS1
(1)	RHA266
(1)	NM_114714
(1)	X63553
(1)	U16279
(1)	U16280
200	
MUT9	SUNALS1
(1)	RHA266
(77)	NM_114714
(101)	X63553
(22)	U16279
(71)	U16279
(71)	U16280
300	
MUT9	SUNALS1
(1)	RHA266
(159)	NM_114714
(201)	X63553
(105)	U16279
(153)	U16279
(153)	U16280
400	
MUT9	SUNALS1
(1)	RHA266
(253)	NM_114714
(301)	X63553
(205)	U16279
(235)	U16279
(235)	U16280
500	
MUT9	SUNALS1
(98)	RHA266
(353)	NM_114714
(401)	X63553
(305)	U16279
(335)	U16279
(335)	U16280

FIGURA 1
(Folha 2 de 5)

MUT9 SUNALS1	(198)	501	600
RHA266	(453)		
NM_114714	(501)		
_X63553	(405)		
U16279	(435)		
U16280	(435)		
MUT9 SUNALS1	(298)	700	
RHA266	(553)		
NM_114714	(601)		
_X63553	(505)		
U16279	(535)		
U16280	(535)		
MUT9 SUNALS1	(398)	800	
RHA266	(653)		
NM_114714	(701)		
_X63553	(605)		
U16279	(635)		
U16280	(635)		
MUT9 SUNALS1	(498)	900	
RHA266	(753)		
NM_114714	(801)		
_X63553	(705)		
U16279	(735)		
U16280	(735)		
MUT9 SUNALS1	(598)	1000	
RHA266	(853)		
NM_114714	(901)		
_X63553	(805)		
U16279	(835)		
U16280	(835)		

FIGURA 1
(Folha 3 de 5)

MUT9 SUNALS1	(698)	1001	1100
RHA266	(953)		
NM_114714	(1001)		
X63553	(905)		
U16279	(935)		
U16280	(935)		
MUT9 SUNALS1	(797)	1101	1200
RHA266	(1052)		
NM_114714	(1100)		
X63553	(1004)		
U16279	(1034)		
U16280	(1034)		
MUT9 SUNALS1	(897)	1201	1300
RHA266	(1152)		
NM_114714	(1200)		
X63553	(1104)		
U16279	(1134)		
U16280	(1134)		
MUT9 SUNALS1	(997)	1301	1400
RHA266	(1252)		
NM_114714	(1300)		
X63553	(1204)		
U16279	(1234)		
U16280	(1234)		
MUT9 SUNALS1	(1097)	1401	1500
RHA266	(1352)		
NM_114714	(1400)		
X63553	(1304)		
U16279	(1334)		
U16280	(1334)		

FIGURA 1
(Folha 5 de 5)

	2001	2014
MUT9 SUNALS1 (1685)	-----	-----
RHA266 (1952)	CAKCGAAGATTTTC	CAKCGAAGATTTTC
NM_114714 (2000)	GGATTGAATTC	GGATTGAATTC
X63553 (1904)	GGCTGTGTC	GGCTGTGTC
U16279 (1934)	CAATGAAATTTCA	CAATGAAATTTCA
U16280 (1934)	CAATGAAATTTCA	CAATGAAATTTCA

FIGURA 2
(Folha 1 de 2)

1
100

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)

101

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(1)
(2)
(98)
(66)
(76)
(76)

201

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(1)
(82)
(98)
(66)
(76)
(76)

300

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(97)
(182)
(198)
(166)
(176)
(176)

301

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(197)
(282)
(298)
(266)
(276)
(276)

400

MUT9
RHA266
NM_114714
X63553
U16279
U16280

(197)
(282)
(298)
(266)
(276)
(276)

FIGURA 2
(Folha 2 de 2)

			500
		401	
MUT9	(297)	PAGGKQKQPHVSI	PGGLIYVALQCKKIL
RHA266	(382)	PAGGKQKQPHVSI	GGIINVAACCKRI
NM_114714	(398)	PAGGKQKQPHVSI	STWSEALCCNRY
X63553	(366)	PAGGKQKQPHVSI	AKXKALCCNRY
U16279	(376)	PAGGKQKQPHVSI	GGIINVAACCKRI
U16280	(376)	PAGGKQKQPHVSI	GGIINVAACCKRI
		501	
MUT9	(397)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
RHA266	(482)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
NM_114714	(498)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
X63553	(466)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
U16279	(476)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
U16280	(476)	YMKRQW	TSGGLGAMGFCLE
		601	
MUT9	(497)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
RHA266	(582)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
NM_114714	(598)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
X63553	(566)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
U16279	(576)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
U16280	(576)	FTNMREAEACDIP	AAVNTQ
		673	

RESUMO

“MÉTODOS PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE AHAS EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA
5 PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA MELHORAR A TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA TOLERANTE A HERBICIDA, PARA SELECIONAR UMA CÉLULA DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA PROXIMIDADE DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA
10 AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, CASSETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO”

Plantas de girassol resistentes a herbicida, polinucleotídeos
15 isolados que codificam polipeptídeos de subunidade grande de ácido acetohidróxi sintase (AHASL), resistentes a herbicida e de tipo selvagem, e as seqüências de aminoácido destes polipeptídeos são descritas. Os cassetes de expressão e vetores de transformação compreendendo os polinucleotídeos da invenção, assim como plantas e células hospedeiras transformadas com os
20 polinucleotídeos, são descritos. Os métodos de usar os polinucleotídeos para melhorar a resistência de plantas a herbicidas, e métodos para controlar ervas daninhas na proximidade das plantas resistentes a herbicidas são também descritos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar ervas daninhas na proximidade de uma planta de girassol, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida imidazolinona, um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, um herbicida triazolopirimidina, um herbicida pirimidiniloxibenzoato, um herbicida sulfonilamino-carboniltriazinona, ou mistura dos mesmos às ervas daninhas e a uma planta de girassol, referida planta de girassol é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma planta de girassol de tipo selvagem,

(b) uma planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

(d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de

girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

(f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-] imidiazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinacarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-] 5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila, [2-(4-] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin- 2-il)-p-toluato de metila, e mistura dos mesmos.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionado dentre o grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuon, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

4. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um promotor ligado operativamente à molécula de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

5 (c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de ácido aceto-hidróxi sintase (AHAS) resistente a herbicida;

10 (d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

15 (e) uma sequência nucleotídica que é completamente complementar a pelo menos uma sequência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de sequências nucleotídicas especificadas em (a)-(d).

20 5. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida proteína codificada pela sequência nucleotídica de (c) ou (d), ainda compreende pelo menos um membro selecionado dentre o grupo consistindo de:

(a) uma treonina na posição de aminoácido 107 ou posição equivalente;

25 (b) uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina na posição de aminoácido 182 ou posição equivalente;

(c) um aspartato ou valina na posição de aminoácido 190 ou posição equivalente;

(d) uma leucina na posição de aminoácido 559 ou posição

equivalente; e

(e) uma asparagina, treonina, ou fenilalanina na posição de aminoácido 638 ou posição equivalente.

5 6. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que referido promotor é capaz de direcionar expressão de genes em uma bactéria, célula fúngica, célula de animal ou célula de planta.

10 7. Célula hospedeira não humana, caracterizada pelo fato de ser transformada com o cassete de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 6.

8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que referida célula hospedeira é selecionada dentre o grupo consistindo de uma bactéria e célula fúngica.

15 9. Vetor de transformação, caracterizado pelo fato de compreender um gene de interesse e um gene marcador selecionável, referido gene marcador selecionável compreendendo um promotor ligado operativamente a uma sequência nucleotídica, em que referido promotor direciona expressão em uma célula hospedeira e referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

20 (a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

25 (c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência de

aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

5 10. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que referido promotor é expressável em uma célula de planta.

11. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que referido promotor é um promotor constitutivo.

10 12. Vetor de transformação de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que referido gene marcador selecionável ainda compreende uma sequência de marcação de cloroplasto ligado operativamente.

15 13. Vetor de transformação de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que referido promotor é expressável em uma bactéria ou uma levedura.

14. Célula hospedeira não humana, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de transformação como definido em qualquer uma das reivindicações 9 a 13.

20 15. Método para aumentar a atividade de AHAS em uma planta, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula de planta com uma construção de polinucleotídeo compreendendo uma sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta e regenerar uma planta transformada a
25 partir da referida célula de planta transformada, em que referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

em que a atividade de AHAS é aumentada em referida planta ou pelo menos uma parte da mesma, quando comparada a uma planta não transformada.

16. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula de planta com uma construção de polinucleotídeo compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta e regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada, em que referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína

tendo pelo menos 75% de identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

5 em que referida planta transformada tem aumentada resistência a pelo menos uma herbicida com relação à resistência de uma planta não transformada para referido herbicida.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que referido promotor é selecionado dentre o grupo consistindo de promotores constitutivos e promotores preferidos de tecido.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que referida construção de polinucleotídeo ainda compreende uma seqüência de marcação de cloroplasto ligado operativamente.

15 19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que a atividade de AHAS de referida planta transformada é aumentada com relação a uma planta não transformada.

20 20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida imidazolinona.

25 21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-)] imidiazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)- 3-quinolinecarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-)] 5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila e [2-(4-)] isopropil-4-metil-5-oxo-

2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida sulfoniluréia.

5 23. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionado dentre o grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, 10 triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

15 24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 23, caracterizado pelo fato de que referida planta transformada é uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea.

20 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que referida dicotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, *Arabidopsis thaliana*, tabaco, batata, beterraba, alfafa, cártamo, e amendoim.

25 26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que referida monocotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de trigo, arroz, milho, cevada, centeio, aveia, tritcale, mileto, e sorgo.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 26, caracterizado pelo fato de que referida célula de planta compreende resistência a pelo menos uma herbicida, antes da referida etapa de transformação.

28. Método para melhorar a tolerância a herbicida em uma planta tolerante a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de

transformar uma planta tolerante a herbicida com uma
5 construção de polinucleotídeo compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona expressão em uma célula de planta, e

regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada, em que referida sequência nucleotídica é selecionada
10 dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% de
15 identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína
20 tendo pelo menos 75% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

em que a tolerância a herbicida da referida planta tolerante a
25 herbicida é aumentada na referida planta quando comparada a uma planta não transformada tolerante a herbicida.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida compreende uma proteína AHASL tolerante a herbicida, antes da referida etapa de

transformação.

30. Método de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida não foi geneticamente engenheirado para expressar referida proteína AHASL tolerante a herbicida.

31. Método de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que referido planta tolerante a herbicida foi geneticamente engenheirado para expressar referida proteína AHASL tolerante a herbicida.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 31, caracterizado pelo fato de que referida planta tolerante a herbicida é uma planta tolerante a imidazolinona, antes de referida etapa de transformação.

33. Método para selecionar uma célula de planta transformada, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

transformar uma célula de planta com o vetor de transformação de planta,

expor referida célula de planta transformada a pelo menos um herbicida em uma concentração que inibe o crescimento de uma célula de planta não transformada, e

identificar referida célula de planta transformada por sua camada de crescer na presença de referido herbicida;

em que referido vetor de transformação de planta compreende um gene marcador selecionável compreendendo um promotor e uma sequência nucleotídica ligada operativamente, referido promotor direciona expressão em uma célula de planta, e referida sequência nucleotídica é selecionada dentre o grupo consistindo de:

(a) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(b) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de

aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de seqüência para uma seqüência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida seqüência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(d) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% de identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que referido herbicida é um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, ou mistura dos mesmos.

35. Método de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que referida vetor de transformação de planta ainda compreende pelo menos um gene de interesse.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizado pelo fato ainda compreender a etapa de regenerar a planta transformada a partir de referida célula de planta transformada.

37. Método para controlar ervas daninhas na proximidade de uma planta transformada, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida imidazolinona, um herbicida imidazolinona, um herbicida sulfoniluréia, um herbicida triazolopirimidina, um herbicida pirimidiniloxibenzoato, um herbicida sulfonilamino-carboniltriaolinona, ou mistura dos mesmos às ervas daninhas e à planta transformada, em que referida planta transformada tem aumentada resistência ao herbicida imidazolinona quando comparada a uma planta não transformada, e a planta transformada compreende em seu genoma pelo

menos um cassete de expressão compreendendo a seqüência nucleotídica ligada operativamente a uma promotor que direciona a expressão do gene em uma célula de planta, referida seqüência nucleotídica selecionada dentre o grupo consistindo de:

- 5 (a) a seqüência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;
- (b) uma seqüência nucleotídica codificando a seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;
- (c) uma seqüência nucleotídica tendo pelo menos 75% de identidade de seqüência para uma seqüência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida seqüência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e
- 10 (d) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% de identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que referido herbicida imidazolinona é selecionado dentre o grupo consistindo de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinecarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de 6- (4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila, e [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila, e mistura dos mesmos.

39. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que referido herbicida sulfoniluréia é selecionada dentre o grupo

consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metila, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, e misturas dos mesmos.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 39, caracterizado pelo fato de que referida planta é uma dicotiledônea ou monocotiledônea.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que é referida dicotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, *Arabidopsis thaliana*, tabaco, batata, beterraba, alfafa, cártamo, e amendoim.

42. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que é referida monocotiledônea é selecionada dentre o grupo consistindo de trigo, tritcale, milho, arroz, sorgo, centeio e mileto e cevada.

43. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender o cruzamento de uma primeira planta, que é resistente a uma herbicida para uma segunda planta que não é resistente ao herbicida, em que a primeira planta é selecionada do grupo consistindo de:

(a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma planta de girassol de tipo selvagem,

(b) uma planta de girassol compreendendo as características de

resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

5 (d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

10 (e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

15 (f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

20 (g) uma planta transformada compreendendo em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente para uma promotor que direciona expressão de gene em uma célula de planta, referida sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

(i) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

25 (ii) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(iii) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína

compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(iv) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de ainda compreender selecionar uma planta descendente que é resistente ao herbicida.

45. Método para aumentar a resistência a herbicida de uma planta, caracterizado pelo fato de compreender o cruzamento de uma primeira planta em uma segunda planta, em que a primeira planta é selecionada do grupo consistindo de:

(a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma planta de girassol de tipo selvagem,

(b) uma planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

(d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

(g) uma planta transformada compreendendo em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente para um promotor que direciona expressão de gene em uma célula de planta, referida sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

(i) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(ii) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(iii) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(iv) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado

pelo fato de ainda compreender selecionar uma planta descendente que compreende aumentada resistência a herbicida quando comparada com a resistência a herbicida da referida segunda planta.

5 47. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma semente de uma planta e uma quantidade eficaz de um herbicida inibidor de AHAS, em que dita planta é selecionada do grupo consistindo de:

10 (a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma planta de girassol de tipo selvagem,

15 (b) uma planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

20 (d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

25 (e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol

compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

(g) uma planta transformada compreendendo em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente para uma promotor que direciona expressão de gene em uma célula de planta, referida sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

(i) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(ii) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(iii) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida sequência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(iv) uma sequência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de sequência para uma sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

48. Método para combater vegetação indesejada, caracterizado pelo fato de compreender contatar uma semente de uma planta antes de semear e/ou após a pré-germinação com um herbicida inibidor de AHAS, em que a referida planta é selecionada do grupo consistindo de:

(a) uma planta de girassol compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de pelo menos um polinucleotídeo AHASL que codifica uma proteína AHASL resistente a herbicida compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente, em que referida planta tem aumentada resistência a pelo menos um herbicida quando comparada a uma

planta de girassol de tipo selvagem,

(b) uma planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

5 (c) uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA- 6325;

(d) uma planta de girassol que é um descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de
10 girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(e) uma planta de girassol que é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente engenheirado da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325 ou de qualquer descendente da planta com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325, referida planta de girassol
15 compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325;

(f) uma planta de girassol que é um descendente de pelo menos uma dentre as plantas de girassol de (b)-(f), referida planta de girassol compreendendo as características de resistência a herbicida de uma planta de
20 girassol com Número de Depósito de Patente ATCC PTA-6325; e

(g) uma planta transformada compreendendo em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo a sequência nucleotídica ligada operativamente para uma promotor que direciona expressão de gene em uma célula de planta, referida sequência nucleotídica selecionada do
25 grupo consistindo de:

(i) a sequência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1;

(ii) uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2;

(iii) uma sequência nucleotídica tendo pelo menos 75%

identidade de seqüência para uma seqüência nucleotídica especificada na SEQ ID NO:1, em que referida seqüência nucleotídica codifica uma proteína compreendendo uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e em que referida proteína compreende atividade de AHAS resistente a herbicida; e

- 5 (iv) uma seqüência nucleotídica codificando uma proteína tendo pelo menos 75% identidade de seqüência para uma seqüência de aminoácido especificada na SEQ ID NO:2, em que referida proteína compreende uma isoleucina na posição 188 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.