



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

(21) **PI0608264-5 A2**

(22) Data de Depósito: 28/02/2006
(43) Data da Publicação: 16/11/2010
(RPI 2080)



(51) Int.Cl.:

A01H 1/00
A01H 5/00
C12N 15/29
C12N 15/82
C12N 9/12
C12N 15/05

(54) Título: **PLANTA, SEMENTE DA PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA, MOLÉCULA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, CASSETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, SEMENTE TRANSFORMADA, CÉLULA VEGETAL TRANSFORMADA, MÉTODOS PARA AUMENTAR ATIVIDADE DE AHAS RESISTENTE A HERBICIDA EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA AUMENTAR TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA, E PARA SELECIONAR PARA UMA CÉLULA VEGETAL TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, E, MÉTODOS PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA, E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA**

(57) Resumo: PLANTA, SEMENTE DA PLANTA, METODO PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA, MOLÉCULA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, CASSETE DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, SEMENTE TRANSFORMADA, CÉLULA VEGETAL TRANSFORMADA, METODOS PARA AUMENTAR ATIVIDADE DE AFIAS RESISTENTE A HIERBICIDA EM UMA PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, PARA AUMENTAR TOLERANCIA A HERBICIDA EM UMA PLANTA, E PARA SELECIONAR PARA UMA CELULA VEGETAL TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, E, METODOS PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE UMA PLANTA, E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA. Plantas de arroz resistentes a herbicida, polinucleotídeos isolados que codificam polipeptídeos de subunidade grande 1 de acetohidroxiácido sintase (AHASL1), e as seqüências de aminoácidos destes polipeptídeos, são descritos. Cassetes de expressão e vetores de transformação compreendendo os polinucleotídeos da invenção, assim como plantas e células hospedeiras transformadas com os polinucleotídeos, são descritas. Métodos de usar os polinucleotídeo para aumentar a resistência de plantas a herbicidas de imidazolinona, e métodos para controlar ervas daninhas na vizinhança de plantas resistentes a herbicida também são descritos.

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2005 US 60/657,969

(73) Titular(es): Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria

(72) Inventor(es): ALBERTO BLAS LIVORE, ALBERTO RAUL PRINA, BIJAY K. SIGH, ROBERT ASCENZI, SHERRY R. WHITT

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006007343 de 28/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/094084 de 08/09/2006

“PLANTA, SEMENTE DA PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR
ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA,
MOLÉCULA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, CASSETE DE
EXPRESSION, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE
5 TRANSFORMAÇÃO, SEMENTE TRANSFORMADA, CÉLULA
VEGETAL TRANSFORMADA, MÉTODOS PARA AUMENTAR
ATIVIDADE DE AHAS RESISTENTE A HERBICIDA EM UMA
PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A
HERBICIDA, PARA AUMENTAR TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM
10 UMA PLANTA, E PARA SELECIONAR PARA UMA CÉLULA
VEGETAL TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, E,
MÉTODOS PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE
UMA PLANTA, E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA”

CAMPO DA INVENÇÃO

15 Esta invenção se refere ao campo de biotecnologia agrícola,
particularmente a plantas de arroz resistentes a herbicida e a novas seqüências
de polinucleotídeos que codificam proteínas de subunidade grande de
acetohidroxiácido sintase resistentes a herbicida.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 Ervas daninhas são umas das principais limitações para
produção de arroz. Semeadura direta reduziu os problemas laborais de
transplantação; entretanto, esta tecnologia ajudou a aumentar o problema de
ervas daninhas. Uso de herbicida em arroz é uma prática comum na maioria
das regiões de arroz sob cultivo de semeadura direta e/ou países
25 desenvolvidos que crescem arroz sob sistemas ou de transplantação ou
semeadura direta. Normalmente um herbicida de gramínea e um de
dicotiledônea são aplicados uma ou mais vezes a fim de controlar ervas
daninhas em cultivos de arroz.

Gramíneas, ciperáceas e arroz daninho (arroz vermelho) foram

os principais grupos de espécies que possuem alta aptidão para os mesmos ambientes onde arroz é crescido. Elas se tornaram globalmente distribuídas e são difíceis para controlar ervas daninhas em cultivos de arroz. Embora existam diversas práticas culturais que auxiliam em controle de sementes e
5 são convenientes para melhor cuidado ambiental, estas práticas impõem restrições e aumentam custos de produção. Preparação de terra, nivelamento de terra, barragens e profundidade de água, rotação de terra, semente certificada, sistemas vegetais apropriados e datas de plantio podem ser algumas das práticas culturais que podem ajudar a reduzir o banco de
10 sementes de ervas daninhas e o desenvolvimento de ervas daninhas tolerantes a herbicida.

Apesar das muitas recomendações para melhores práticas culturais os fazendeiros ainda recorrem ao uso de herbicidas como a principal ferramenta para controlar ervas daninhas. O uso e abuso de alguns destes
15 químicos resultou no desenvolvimento de ervas daninhas tolerantes tipo capim-arroz (*Eclzinochloa crus galli*) resistente a propanil e resistente a butaclor. Nestes casos, seria conveniente ter outros herbicidas com diferentes modos de ação com a capacidade de controlar a maioria destas espécies de ervas daninhas. A disponibilidade de tais herbicidas permitiria uma rotação de
20 herbicidas com um modo de ação diferente do que aqueles herbicidas que são comumente usados em produção de arroz.

Imidazolinonas são um grupo de herbicidas com um modo de ação diferente do que os herbicidas de arroz usados comumente. Estes herbicidas são conhecidos por inibirem acetohidroxiácido sintase (AHAS; EC
25 4.1.3.18, também conhecida como acetolactato sintase ou ALS), uma enzima chave para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada. Em particular, acetohidroxiácido sintase (AHAS; EC 4.1.3.18, também conhecida como acetolactato sintase ou ALS), é a primeira enzima que catalisa a síntese bioquímica dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina

(Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine," in *Plant Amino Acid*, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. Nova Iorque, Nova Iorque, pp. 227-247). AHAS é o sítio de ação de quatro famílias estruturalmente diversas de herbicidas incluindo as sulfoniluréias (LaRossa and Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2:158-161), as imidazolinonas (Shaner *et al.* (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546), as triazolopirimidinas (Subramanian and Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines," in *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E., eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 277-288), e os pirimidiloxibenzoatos (Subramanian *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 94: 239-244.). Herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia são amplamente usados em agricultura moderna devido a sua efetividade em taxas de aplicação muito baixas e não toxicidade relativa em animais. Inibindo atividade de AHAS, estas famílias de herbicidas previnem crescimento adicional e desenvolvimento de plantas susceptíveis incluindo muitas espécies de ervas daninhas. Diversos exemplos de herbicidas de imidazolinona disponíveis comercialmente são PURSUIT® (imazetapir), SCEPTERS (imazaquin) e ARSENAL® (imazapir). Exemplos de herbicidas de sulfoniluréia são clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil e halosulfuron.

Devido a sua alta efetividade e baixa toxicidade, herbicidas de imidazolinona são favorecidos para aplicação pulverizando sobre o topo de uma ampla área de vegetação. A capacidade de pulverizar um herbicida sobre o topo de uma ampla extensão de vegetação diminui os custos associados com estabelecimento e manutenção de plantação, e diminui a necessidade de preparação de sítio antes de uso de tais químicos. Pulverizar sobre o topo de

uma espécie tolerante desejada também resulta na capacidade de atingir potencial de rendimento máximo da espécie desejada devido à ausência de espécies competitivas. Entretanto, a capacidade de usar tais técnicas de pulverização é dependente da presença de espécies resistentes a imidazolinona da vegetação desejada na área de pulverização.

Dentre os principais cultivos agrícolas, algumas espécies de leguminosas tal como soja são naturalmente resistentes a herbicidas de imidazolinona devido a sua capacidade de metabolizar rapidamente os compostos de herbicida (Shaner and Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

Outros cultivos tal como milho (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) e arroz (Barrett *et al.* (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, Nova Iorque, pp. 195-220) são de alguma maneira susceptíveis a herbicidas de imidazolinona. A sensibilidade diferencial para os herbicidas de imidazolinona é dependente da natureza química do herbicida particular e metabolismo diferencial do composto de uma forma tóxica para uma não tóxica em cada planta (Shaner *et al.* (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546; Brown *et al.*, (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* 27:24-29). Outras diferenças fisiológicas de planta tal como absorção e translocação também desempenham um papel importante em sensibilidade (Shaner and Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

Plantas resistentes a imidazolinonas, sulfoniluréias e triazolopirimidinas foram produzidas com sucesso usando mutagênese de semente, micrósporo, pólen, e calo em *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (i.e., canola) *Glicina max*, *Nicotiana tabacum*, e *Oryza sativa* (Sebastian *et al.* (1989) *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson *et al.*, 1989 *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand *et al.* (1993)1 *Heredity* 84:91-96; Patente Norte-Americana No. 5.545.822). Em todos os casos, um único, gene nuclear parcialmente dominante conferiu

resistência. Quatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona também foram previamente isoladas seguindo mutagênese de semente de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Estudos de herança confirmaram que um único, gene parcialmente dominante conferiu
5 resistência. Baseado em estudos alélicos, os autores concluíram que as mutações nas quatro linhagens identificadas foram localizadas no mesmo locus. Um dos genes de resistência de cultivar Fidel foi designado FS-4 (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886).

Modelagem baseada em computador da conformação
10 tridimensional do complexo AHAS-inibidor prediz diversos aminoácidos na área de ligação de inibidor proposta como sítios onde mutações induzidas iriam provavelmente conferir resistência seletiva para imidazolinonas (Ott *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368). Plantas de trigo produzidas com algumas destas mutações projetadas racionalmente nos sítios de ligação
15 propostos da enzima AHAS exibiram de fato resistência específica para uma única classe de herbicidas (Ott *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368).

Resistência vegetal a herbicidas de imidazolinona também foi relatada em diversas patentes. Patente Norte-Americana Nos. 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 e 6.222.100 geralmente
20 descrevem o uso de um gene de AHAS alterado para obter resistência a herbicida em plantas, e especificamente descrevem certas linhagens de milho resistentes a imidazolinona. Patente Norte-Americana No. 5.013.659 descreve plantas exibindo resistência a herbicida devido a mutações em pelo menos um aminoácido em uma ou mais regiões conservadas. As mutações descritas
25 nessa codificam ou resistência cruzada para imidazolinonas e sulfoniluréias ou resistência específica para sulfoniluréia, mas resistência específica para imidazolinona não é descrita. Patente Norte-Americana No. 5.731.180 e Patente Norte-Americana No. 5.767.361 discutem um gene isolado tendo uma única substituição de aminoácido em uma sequência de aminoácidos de

AHAS de monocotiledônea tipo selvagem que resulta em resistência específica para imidazolinona. Em adição, plantas de arroz que são resistentes a herbicidas que interferem com AHAS foram desenvolvidas por criação de mutação e também pela seleção de plantas resistentes a herbicida a partir de um conjunto de plantas de arroz produzidas por outra cultura. *Veja*, Patente Norte-Americana Nos. 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, a enzima AHAS é compreendida de duas subunidades: uma subunidade grande (papel catalítico) e uma subunidade pequena (papel regulador) (Duggleby and Pang (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:1-36). A subunidade grande de AHAS (também referida neste lugar como AHASL) pode ser codificada por um único gene como no caso de *Arabidopsis* e arroz ou por múltiplos membros de família de gene como em milho, canola, e algodão. Substituições específicas de único nucleotídeo na subunidade grande conferem na enzima um grau de insensibilidade para uma ou mais classes de herbicidas (Chang and Duggleby (1998) *Biochem J.* 333:765-777).

Por exemplo, trigo, *Triticum aestivum* L., contém três genes homólogos de subunidade grande de acetohidroxiácido sintase. Cada um dos genes exibe expressão significativa baseada em resposta de herbicida e dados bioquímicos de mutantes em cada um dos três genes (Ascenzi *et al.* (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, Spain, Ref. No. S10-17). As seqüências de codificação de todos os três genes compartilham extensiva homologia no nível de nucleotídeo (WO 03/014357). Através de seqüenciamento dos genes de AHASL de diversas variedades de *Triticum aestivum*, a base molecular de tolerância a herbicida nas linhagens mais IMI-tolerantes (imidazolinona-tolerantes) foi encontrada ser a mutação S653(At)N, indicando uma substituição de serina para asparagina em uma posição equivalente a serina em aminoácido 653 em *Arabidopsis thaliana*.

(WO 03/01436; WO 03/014357). Esta mutação é devida a um único polimorfismo de nucleotídeo (SNP) na sequência de DNA codificando a proteína AHASL.

5 Dado sua alta efetividade e baixa toxicidade, herbicidas de imidazolinona são favorecidos para uso agrícola. Entretanto, a capacidade de usar herbicidas de imidazolinona em um sistema de produção de safra particular depende da disponibilidade de variedades resistentes a imidazolinona da planta cultivada de interesse. Para produzir tais variedades resistentes a imidazolinona, melhoristas de plantas necessitam desenvolver
10 linhagens com a característica de resistência a imidazolinona. Assim, linhagens resistentes a imidazolinona adicionais e variedades de plantas cultivadas, assim como métodos e composições para a produção e uso de linhagens e variedades resistentes a imidazolinona, são necessários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 A presente invenção fornece plantas de arroz tendo resistência aumentada para herbicidas quando comparado a uma planta de arroz tipo selvagem. Em particular, as plantas de arroz da invenção têm resistência aumentada para herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia, quando comparado a uma planta de arroz tipo selvagem. As plantas resistentes a
20 herbicida de arroz da invenção compreendem pelo menos uma cópia de um gene ou polinucleotídeo que codificam uma subunidade grande 1 de acetohidroxiácido sintase (AHASL1) resistente a herbicida que compreende uma substituição de aminoácido em relação à sequência de aminoácidos de uma proteína AHASL1 de arroz tipo selvagem. Em uma forma de realização
25 da invenção, as plantas de arroz resistentes a herbicida compreendem uma proteína AHASL1 resistente a herbicida que compreende uma valina ou aspartato em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente. A planta de arroz resistente a herbicida da invenção pode conter uma, duas, três, quatro, ou mais cópias de um gene ou polinucleotídeo codificando uma proteína

AHASL1 resistente a herbicida da invenção. As plantas de arroz da invenção também incluem sementes e plantas de progenia que compreendem pelo menos uma cópia de um gene ou polinucleotídeo codificando uma AHASL1 resistente a herbicida da invenção.

5 A presente invenção fornece plantas de arroz resistentes a herbicida que são da linhagem de arroz que foi designada como IMINTA 16. Uma amostra de sementes da linhagem IMINTA 16 foi depositada com o depósito de patente em NCIMB Ltd. e designado Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262. As plantas de arroz IMINTA 16 compreendem em
10 seus genomas um gene de AHASL1 que compreende as seqüências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, ou que codificam a proteína AHASL1 compreendendo, a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2. Quando comparada à seqüência de aminoácidos da proteína AHASL1 que é codificada por um gene de AHASL1 de uma planta de arroz
15 tipo selvagem (No. de Acesso de GenBank AB049822), a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2 possui uma única diferença de aminoácido da seqüência de aminoácidos de tipo selvagem. Na seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, existe uma valina em posição de aminoácido 179. Na seqüência de aminoácidos da proteína AHASL1 de arroz
20 tipo selvagem, esta mesma posição de aminoácido tem uma alanina.

 A presente invenção fornece adicionalmente polinucleotídeos isolados e polipeptídeos isolados para proteínas AHASL1 de arroz (*Oryza sativa*). Os polinucleotídeos da invenção abrangem seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas AHASL1 resistentes a herbicida. As
25 proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção são proteínas AHASL1 resistentes a imidazolinona que compreendem uma substituição de alanina por valina em posição 179 nas suas seqüências de aminoácidos respectivas, quando comparado à seqüência de aminoácidos tipo selvagem correspondente. Os polinucleotídeos da invenção abrangem as seqüências de

nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, seqüências de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes de ditas seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas compreendendo atividade de AHAS, particularmente atividade de AHAS resistente a herbicida.

A presente invenção fornece cassetes de expressão para expressar os polinucleotídeos da invenção em plantas, células vegetais, e outras células hospedeiras não humanas. Os cassetes de expressão compreendem um promotor expressável na planta, célula vegetal, ou outras células hospedeiras de interesse operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína AHASL1 resistente a herbicida. Se necessário para direcionar expressão para o cloroplasto, o cassete de expressão também pode compreender uma seqüência tendo como alvo cloroplasto operavelmente ligada que codifica de um peptídeo de trânsito de cloroplasto para direcionar uma proteína AHASL1 expressa para o cloroplasto. Os cassetes de expressão da invenção encontram uso em um método para reforçar a tolerância a herbicida de uma planta e uma célula hospedeira. O método envolve transformar a planta ou célula hospedeira com um cassete de expressão da invenção, em que o cassete de expressão compreende um promotor que é expressável na planta ou célula hospedeira de interesse e o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que codificam uma proteína AHASL1 resistente a herbicida da invenção. O método compreende adicionalmente regenerar uma planta transformada a partir da célula vegetal transformada.

A presente invenção fornece um método para aumentar atividade de AHAS em uma planta compreendendo transformar uma célula vegetal com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir da célula

vegetal transformada. A sequência de nucleotídeos é selecionada a partir daquelas sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção, particularmente as sequências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, sequências de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes destas. Uma planta produzida por este método compreende atividade de AHAS aumentada, quando comparada a uma planta não transformada.

A presente invenção fornece um método para produzir uma planta resistente a herbicida compreendendo transformar uma célula vegetal com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir de dita célula vegetal transformada. A sequência de nucleotídeos é selecionada a partir daquelas sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção, particularmente as sequências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, sequências de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes destas, incluindo, mas não limitadas a, as formas maduras das proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção. Uma planta resistente a herbicida produzida por este método compreende resistência aumentada para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia, quando comparado a uma planta não transformada.

A presente invenção fornece um método para reforçar tolerância a herbicida em uma planta resistente a herbicida. O método encontra uso em aumentar a resistência de uma planta que já é resistente para um nível de um herbicida que iria matar ou prejudicar significativamente uma planta tipo selvagem. Uma tal planta tolerante a herbicida pode ser uma planta

tolerante a herbicida que foi modificada geneticamente para tolerância a herbicida ou uma planta tolerante a herbicida que foi desenvolvida por meios que não envolvem DNA recombinante tal como, por exemplo, as plantas de arroz IMINTA 16 da presente invenção. O método compreende transformar
5 uma planta tolerante a herbicida com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir da célula vegetal transformada. A seqüência de nucleotídeos é selecionada a partir daquelas seqüências de nucleotídeos que
10 codificam as proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção, particularmente as seqüências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NO: 1 e 3, seqüências de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes destas.

A presente invenção fornece vetores de transformação
15 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 seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína AHASL1 resistente a herbicida da invenção. O vetor de transformação pode
20 adicionalmente compreender um gene de interesse para ser expresso na célula hospedeira e também pode, se desejado, incluir uma seqüência tendo como alvo cloroplasto que é operavelmente ligada ao polinucleotídeo da invenção.

A presente invenção fornece adicionalmente métodos para usar os vetores de transformação da invenção para selecionar por células
25 transformadas com o gene de interesse. Tais métodos envolvem a transformação de uma célula hospedeira com o vetor de transformação, expondo a célula a um nível de um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia que iria matar ou inibir o crescimento de uma célula hospedeira não transformada, e identificar a célula hospedeira transformada por sua

capacidade de crescer na presença do herbicida. Em uma forma de realização da invenção, a célula hospedeira é uma célula vegetal e o gene marcador selecionável compreende um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal.

5 A presente invenção fornece um método para controlar ervas daninhas na vizinhança das plantas resistentes a herbicida da invenção, incluindo as plantas de arroz resistentes a herbicida descritas acima e plantas transformadas com os polinucleotídeos AHASL1 resistentes a herbicida da invenção. Tais plantas transformadas compreendem em seus genomas pelo
10 menos um cassete de expressão compreendendo um promotor que aciona expressão de gene em uma célula vegetal, em que o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo AHASL1 da invenção. O método compreende aplicar uma quantidade efetiva de um herbicida para as ervas daninhas e para a planta resistente a herbicida, em que a planta resistente a
15 herbicida, planta tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia, quando comparada a uma planta tipo selvagem ou não transformada.

As plantas da presente invenção podem ser transgênicas ou não transgênicas. Um exemplo de uma planta de arroz não transgênica tendo
20 resistência aumentada para imidazolinona e/ou herbicidas de sulfoniluréia inclui uma planta de arroz tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, ou mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente modificado da planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; ou de qualquer progenia da planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB
25 41262; ou uma planta que é uma progenia de qualquer destas plantas; ou uma planta que compreende as características de resistência a herbicida da planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262.

A presente invenção também fornece plantas, órgãos vegetais, tecidos vegetais, células vegetais, 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 transformadas, órgãos vegetais, tecidos vegetais, células vegetais, sementes, e células hospedeiras não humanas têm tolerância ou resistência aumentada para pelo menos um herbicida, em níveis do herbicida que matam ou inibem o crescimento de uma planta não transformada, tecido vegetal, célula vegetal, ou célula hospedeira não humana, respectivamente. Preferivelmente, as plantas transformadas, tecidos vegetais, células vegetais, e sementes da invenção são *Arabidopsis thaliana* e plantas cultivadas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1 é um alinhamento de seqüência de nucleotídeos do gene de AHASL1 de arroz resistente a herbicida da presente invenção (SEQ ID NO: 1) com algumas seqüências de nucleotídeos de AHASL de plantas conhecidas. A transição de C para T (em relação a tipo selvagem) em nucleotídeo 542 na SEQ ID NO: 1 é indicada por fonte branca dentro de uma caixa preta. Os códons de início e término são representados em fonte em negrito. Os nomes das outras seqüências de AHASL na figura são definidos como segue: "OsAHASL1.1" é uma seqüência de nucleotídeos AHASL1 tipo selvagem de constituição de arroz El Paso; "OsAHASL1.2" é uma seqüência de nucleotídeos AHASL1 tipo selvagem de constituição de arroz IRGA;

"OsAHASL1.4" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 de arroz (No. de Acesso AB049822); "OsAHASL1.6" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 de arroz (No. de Acesso AB049823); "ZmAHASL1" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 de milho (No. de Acesso X63554); "ZmAHASL2" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL2 de milho (No. de Acesso X63553); "OsAHASL2" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL2 de arroz (No. de Acesso AL731599); "AtAHASL" é uma seqüência de nucleotídeos de AHASL de *Arabidopsis thaliana* (No. de Acesso AY124092).

Figura 2 é um alinhamento de seqüência de aminoácidos da proteína AHASL1 de arroz resistente a herbicida da presente invenção (SEQ ID NO:2) com algumas seqüências de nucleotídeos de AHASL de plantas conhecidas. A substituição de Ala por Val (em relação a tipo selvagem) em posição 179 na SEQ ID NO:2 é indicada por fonte branca dentro de uma caixa preta. A metionina inicial (M) é representada em fonte em negrito. Os outros nomes usados na figura se referem às seqüências de aminoácidos codificadas pelas seqüências de nucleotídeos indicadas na descrição de Figura 1 acima.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

As seqüências de nucleotídeo e de aminoácidos listadas na listagem de seqüências acompanhante são mostradas usando abreviações de letra padrão para bases de nucleotídeos, e código de três letras para aminoácidos. As seqüências de nucleotídeos seguem a convenção padrão de começar na extremidade 5' da seqüência e prosseguir adiante (i.e., de esquerda para direita em cada linha) para a extremidade 3'. Apenas uma fita de cada seqüência de ácidos nucleicos é mostrada, mas a fita complementar é entendida ser inclusa por qualquer referência à fita apresentada. As seqüências de aminoácidos seguem a convenção padrão de começar no término amino da seqüência e prosseguir adiante (i.e., de esquerda para direita em cada linha) para o término carboxil.

SEQ ID NO:1 expõe a seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1 resistente a imidazolinona de arroz com a substituição de Ala₁₇₉ por Val. A região de codificação de SEQ ID NO: 1 corresponde a nucleotídeos 7 a 1938.

SEQ ID NO:2 expõe a seqüência de aminoácidos de uma proteína AHASL1 resistente a imidazolinona de arroz com a substituição de Ala₁₇₉ por Val que é codificada pela seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 expõe a seqüência de nucleotídeos da região de

codificação de SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NOS: 4-18 expõe as seqüências de nucleotídeos de iniciadores usados para a amplificação por PCR e seqüenciamento de DNA do gene de AHASL1 da invenção como descrito em Exemplo 2 abaixo (veja, 5 Tabela 1).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a plantas de arroz tendo resistência aumentada para herbicidas quando comparado a uma planta de arroz tipo selvagem. As plantas resistentes a herbicida de arroz da invenção 10 foram produzidas como descrito a seguir expondo sementes de arroz tipo selvagem (com respeito à resistência a herbicida) a um mutagênico, semeando as sementes, permitindo que as plantas amadureçam e reproduzam, e selecionando plantas de progenia que apresentaram resistência aumentada para herbicidas de imidazolinona, em relação à resistência de uma planta de 15 arroz tipo selvagem. A invenção fornece a linhagem de arroz resistente a herbicida e plantas destas que são referidas neste lugar como IMINTA 16. Tais plantas resistentes a herbicida de arroz encontram uso em métodos para controlar ervas daninhas, particularmente arroz vermelho e outras ervas daninhas que são sensíveis a herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

20 A partir das plantas de arroz resistentes a herbicida IMINTA 16, a região de codificação de um gene de subunidade grande 1 de acetohidroxiácido sintase (AHASL1) foi isolado por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciado. Comparando as seqüências de polinucleotídeos das plantas resistentes a herbicida de arroz da invenção com 25 um cDNA de AHASL1 de arroz de uma planta de arroz tipo selvagem (No. de Acesso de GenBank AB049822), foi descoberto que a região de codificação da seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 de IMINTA 16 diferiu da seqüência de cDNA de AHASL1 de arroz tipo selvagem por um único nucleotídeo. Para a seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 de IMINTA

16, houve uma transição de C para T em nucleotídeo 542 (SEQ ID NO: 1, Figura 1). Esta transição de C para T na sequência de polinucleotídeos de AHASL1 resulta em uma substituição de Ala por Val em aminoácido 179 em uma região conservada da sequência de aminoácidos da proteína AHASL1 prevista, em relação à sequência de aminoácidos da proteína AHASL1 tipo selvagem (Figura 2).

A invenção se refere adicionalmente a moléculas isoladas de polinucleotídeo compreendendo seqüências de nucleotídeos que codificam as proteínas AHASL1 resistentes a herbicida de plantas de arroz IMINTA 16 e a tais proteínas AHASL1. A invenção descreve o isolamento e seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificando uma proteína AHASL1 de arroz resistente a herbicida de planta de arroz resistente a herbicida que foi produzido por mutagênese química de plantas de arroz tipo selvagem. As proteínas AHASL1 resistentes a herbicida da invenção compreendem uma substituição de alanina por valina em posição 179 em suas respectivas seqüências de aminoácidos, quando comparado à seqüência de aminoácidos de AHASL1 de tipo selvagem correspondente.

A presente invenção fornece moléculas isoladas de polinucleotídeo que codificam proteínas AHASL1 resistentes a herbicida de arroz (*Oryza sativa* L.). Especificamente, a invenção fornece moléculas isoladas de polinucleotídeo compreendendo: as seqüências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, seqüências de nucleotídeos codificando proteínas AHASL1 compreendendo a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes de tais seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas AHASL1 funcionais que compreendem atividade de AHAS resistente a herbicida.

As moléculas isoladas de polinucleotídeo de AHASL1 polinucleotídeo resistentes a herbicida da invenção compreendem seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas AHASL1 resistentes a herbicida.

Tais moléculas de polinucleotídeo podem ser usadas em construtos de polinucleotídeo para a transformação de plantas, particularmente plantas cultivadas, para estimular a resistência das plantas para herbicidas, particularmente herbicidas que são conhecidos por inibirem atividade de AHAS, mais particularmente herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia. Tais construtos de polinucleotídeo podem ser usados cassetes de expressão, vetores de expressão, vetores de transformação, plasmídeos e os semelhantes. As plantas transgênicas obtidas seguindo transformação com tais construtos de polinucleotídeo mostram resistência aumentada para herbicidas inibindo AHAS tal como, por exemplo, herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

Composições da invenção incluem moléculas de polinucleotídeo compreendendo seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas AHASL1. Em particular, a presente invenção sustenta moléculas isoladas de polinucleotídeo compreendendo seqüências de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes destas que codificam polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS. Adicionalmente são fornecidos polipeptídeos tendo uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de polinucleotídeo descrita neste lugar, por exemplo aquelas estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, e fragmentos e variantes destas que codificam polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS, particularmente atividade de AHASL resistente a herbicida. As moléculas de polinucleotídeos da invenção abrangem adicionalmente seqüências de nucleotídeos que codificam formas maduras das proteínas AHASL1 descritas acima. Tais formas maduras de proteínas AHASL1 compreendem atividade de AHAS, particularmente atividade de AHAS resistente a herbicida, mas carecem do peptídeo de trânsito de cloroplasto que é parte de proteínas AHASL1 de comprimento completo.

A invenção abrange composições de ácidos nucleicos ou

proteínas isoladas ou substancialmente purificadas. Uma molécula de polinucleotídeo ou proteína "isolada" ou "purificada", ou porção biologicamente ativa desta, é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com a molécula de polinucleotídeo ou proteína como encontrado em seu ambiente naturalmente

5
ocorrente. Assim, uma molécula de polinucleotídeo ou proteína isolada ou purificada é substancialmente livre de outro material celular, ou meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos quando sintetizada quimicamente. Preferivelmente, um ácido nucleico "isolado" é livre de

10
seqüências (preferivelmente seqüências codificando proteína) que naturalmente flanqueiam o ácido nucleico (i.e., seqüências localizadas nas extremidades 5' e 3' do ácido nucleico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucleico é derivado. Por exemplo, em várias formas de

15
realização, a molécula isolada de polinucleotídeo pode conter menos do que cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeos que naturalmente flanqueiam a molécula de polinucleotídeo em DNA genômico da célula da qual o ácido nucleico é derivado. Uma proteína que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de proteína

20
tendo menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, ou 1% (em peso seco) de proteína contaminante. Quando a proteína da invenção ou porção biologicamente ativa desta é produzida recombinantemente, preferivelmente meio de cultura representa menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, ou 1% (em peso seco) de precursores químicos ou químicos de não proteína de

25
interesse.

A presente invenção fornece polipeptídeos isolados compreendendo proteínas AHASL1. Os polipeptídeos isolados compreendem uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, as seqüências de

aminoácidos codificadas por seqüências de nucleotídeos estabelecidas na SEQ ID NOS: 1 e 3, e fragmentos funcionais e variantes de ditas seqüências de aminoácidos que codificam um polipeptídeo AHASL1 compreendendo atividade de AHAS. Por "fragmentos e variantes funcionais" é pretendido
5 fragmentos e variantes dos polipeptídeos exemplificados que compreendem atividade de AHAS.

Adicionalmente são fornecidos polipeptídeos isolados compreendendo as formas maduras das proteínas AHASL1 da invenção. Tais formas maduras de proteínas AHASL1 compreendem atividade de AHAS,
10 particularmente atividade de AHAS resistente a herbicida, mas carecem do peptídeo de trânsito de cloroplasto que é parte de proteínas AHASL1 de comprimento completo.

Em certas formas de realização da invenção, os métodos envolvem o uso de plantas tolerantes a herbicida ou resistentes a herbicida.
15 Por uma planta "tolerante a herbicida" ou "resistente a herbicida", é pretendido que uma planta seja tolerante ou resistente à pelo menos um herbicida em um nível que iria normalmente matar, ou inibir o crescimento de, uma planta normal ou tipo selvagem. Em uma forma de realização da invenção, as plantas tolerantes a herbicida da invenção compreendem uma
20 proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida. Por "proteína AHASL1 tolerante a herbicida" ou "proteína AHASL1 resistente a herbicida", é pretendido que uma tal proteína AHASL1 apresente maior atividade de AHAS, em relação à atividade de AHAS de uma proteína AHASL1 tipo selvagem, quando na presença de pelo menos um herbicida que
25 é conhecido por interferir na atividade de AHAS e em uma concentração ou nível do herbicida que é conhecido por inibir a atividade de AHAS da proteína AHASL1 tipo selvagem. Além disso, a atividade de AHAS de uma tal proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida pode ser referida neste lugar 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 são pretendidos para terem um significado equivalente e um escopo equivalente. Similarmente, os termos "tolerância a herbicida" e "resistência a herbicida" são usados permutavelmente e são pretendidos para terem um significado equivalente e um escopo equivalente. Da mesma maneira, os termos "resistente a imidazolinona" e "resistência a imidazolinona" são usados permutavelmente e são pretendidos serem de um significado equivalente e um escopo equivalente que os termos "tolerante a imidazolinona" e "tolerância a imidazolinona", respectivamente.

A invenção abrange polinucleotídeos AHASL1 resistentes a herbicida e proteínas AHASL1 resistentes a herbicida. Por "polinucleotídeo AHASL1 resistentes a herbicida" é pretendido um polinucleotídeo que codifica uma proteína compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida. Por "proteína AHASL1 resistente a herbicida" é pretendido uma proteína ou polipeptídeo que compreende atividade de AHAS resistente a herbicida.

Ademais, é reconhecido que uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida pode ser introduzida em uma planta transformando uma planta ou ancestral desta com uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida. Tais proteínas AHASL1 tolerantes a herbicida ou resistentes a herbicida são codificadas pelos polinucleotídeos AHASL1 tolerantes a herbicida ou resistentes a herbicida. Alternativamente, uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida pode ocorrer em uma planta como um resultado de uma mutação naturalmente ocorrente ou induzida em um gene de AHASL1 endógeno no genoma de uma planta ou progenitor desta.

A presente invenção fornece plantas, tecidos vegetais, células vegetais, e células hospedeiras com resistência ou tolerância aumentada para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia. A quantidade ou concentração preferida do herbicida é uma "quantidade efetiva" ou "concentração efetiva". Por "quantidade efetiva" e "concentração efetiva" é pretendido uma quantidade e concentração, respectivamente, que é suficiente para matar ou inibir o crescimento de uma planta, tecido vegetal, célula vegetal, ou célula hospedeira tipo selvagem similar, mas esta dita quantidade não mata ou inibe tão severamente o crescimento das plantas, tecidos vegetais, células vegetais, e células hospedeiras resistentes a herbicida da presente invenção. Tipicamente, a quantidade efetiva de um herbicida é uma quantidade que é rotineiramente usada em sistemas de produção agrícola para matar ervas daninhas de interesse. Uma tal quantidade é conhecido por aqueles de habitual verso na arte.

Por "planta, tecido vegetal, célula vegetal ou célula hospedeira tipo selvagem similar" é pretendido uma planta, tecido vegetal, célula vegetal, ou célula hospedeira, respectivamente, que carece das características de resistência a herbicida e/ou polinucleotídeo particular da invenção que são descritos neste lugar. O uso do termo "tipo selvagem" não é, portanto, pretendido para implicar que uma planta, tecido vegetal, célula vegetal, ou outra célula hospedeira careça de DNA recombinante em seu genoma, e/ou não possua características de resistência a herbicida que são diferentes daquelas descritas neste lugar.

Como usado neste lugar a menos que claramente indicado de outra maneira, o termo "planta" pretendeu significar uma planta em qualquer estágio de desenvolvimento, assim como qualquer parte ou partes de uma planta que pode ser acoplada a ou separada de uma planta intacta inteira. Tais partes de uma planta incluem, mas não são limitadas a, órgãos, tecidos, e

células de uma planta. Exemplos de partes vegetais particulares incluem um caule, uma folha, uma raiz, uma inflorescência, uma flor, uma flor pequena, uma fruta, um pedículo, a pedúnculo, um estame, uma antera, um estigma, um estilo, um ovário, uma pétala, uma sépala, um carpelo, uma ponta de raiz, uma coifa, um pêlo radicular, um pêlo foliar, um pêlo de semente, um grão de pólen, a micrósporo, um cotilédono, um hipocótilo, um epicótilo, xilema, floema, parênquima, endosperma, uma célula companheira, uma célula guarda, e quaisquer outros órgãos, tecidos, e células conhecidos de uma planta. Além disso, é reconhecido que uma semente é uma planta.

As plantas da presente invenção incluem tanto plantas não transgênicas e plantas transgênicas. Por "planta não transgênica" é pretendido significar uma planta carecendo de DNA recombinante em seu genoma. Por "planta transgênica" é pretendido significar uma planta compreendendo DNA recombinante em seu genoma. Uma tal planta transgênica pode ser produzida introduzindo DNA recombinante no genoma da planta. Quando tal DNA recombinante é incorporado no genoma da planta transgênica, progenia da planta também pode compreender o DNA recombinante. Uma planta de progenia que compreende pelo menos uma porção do DNA recombinante de pelo menos uma planta transgênica progenitora também é uma planta transgênica.

A presente invenção fornece a linhagem de arroz resistente a herbicida e plantas desta conhecidas como IMINTA 16. Um depósito de pelo menos 250 sementes de IMINTA 16 foi feito para o depósito de patente de NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland, UK em 5 de Janeiro de 2005 e concedido Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262. Devido a uma escassez de sementes da linhagem IMINTA 16 no momento de depósito, menos do que 2500 sementes da linhagem IMINTA 16 foram submetidas a NCIMB Ltd. antes de depósito. Requerentes irão fornecer sementes adicionais da linhagem IMINTA 16 para

atingir um total de pelo menos 2500 sementes à medida que as sementes se tornem disponíveis. Estes depósitos serão mantidos sob os termos do Tratado de Budapeste no Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para os Propósitos de Procedimento de Patente. O depósito das sementes de IMINTA 16 foi feito por um termo de pelo menos 30 anos e pelo menos 5 anos depois do requerimento mais recente para o fornecimento de uma amostra daquele depósito ser recebido por NCIMB Ltd. Adicionalmente, Requerentes satisfizeram todos os requerimentos de 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, incluindo fornecer uma indicação da viabilidade da amostra.

A presente invenção fornece plantas de arroz resistentes a herbicida da linhagem IMINTA 16 que foram produzidas por uma indução de mutação. Plantas de arroz tipo selvagem foram mutagenizadas expondo as plantas a um mutagênico, particularmente um mutagênico químico, mais particularmente azida de sódio. Entretanto, a presente invenção não é limitada a plantas de arroz resistentes a herbicida que são produzidas por um método de mutagênese envolvendo o mutagênico químico azida de sódio. Qualquer método de mutagênese conhecido na arte pode ser usado para produzir as plantas de arroz resistentes a herbicida da presente invenção.

Tais métodos de mutagênese podem envolver, por exemplo, o uso de qualquer um ou mais dos seguintes mutagênicos: radiação, tal como raios-X, raios Gamma (e.g., cobalto 60 ou cézio 137), nêutrons, (e.g., produto de fissão nuclear por urânio 235 em um reator atômico), radiação Beta (e.g., emitida de radioisótopos tal como fósforo 32 ou carbono 14), e radiação ultravioleta (preferivelmente de 2500 a 2900 nm), e mutagênicos químicos tal como análogos de base (e.g., 5-bromo-uracil), compostos relacionados (e.g., 8-etoxi cafeína), antibióticos (e.g., estreptonigrina), agentes alquilantes (e.g., mostardas de enxofre, mostardas de nitrogênio, epóxidos, etilenoaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nitroso,

etil metanosulfonato (EMS), ou acridinas. Plantas resistentes a herbicida também podem ser produzidas usando métodos de cultura de tecido para selecionar células vegetais compreendendo mutações de resistência a herbicida e então regenerando plantas resistentes a herbicida a partir destas.

5 Veja, por exemplo, Patente Norte-Americana Nos. 5.773.702 e 5.859.348, ambas as quais são neste lugar incorporadas em sua totalidade por referência. Detalhes adicionais de indução de mutação podem ser encontrados em "Principals of Cultivar Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company a descrição da qual é incorporada neste lugar por referência.

10 Análise do gene AHASL1 das plantas de arroz de linhagem IMINTA 16 revelou uma mutação pontual. No gene AHASL1 de IMINTA 16, a mutação pontual resulta na substituição de uma valina pela alanina que é encontrada em posição de aminoácido 179 na seqüência de aminoácidos de AHASL1 tipo selvagem No. de Acesso de GenBank AB049822. Assim, a
15 presente invenção descreve que substituir outro aminoácido pela alanina em posição de aminoácido 179 da proteína AHASL1 de arroz pode causar uma planta de arroz ter resistência aumentada a um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona e/ou sulfoniluréia. Como descrito em Exemplo 3 abaixo, alanina 179 é encontrada em uma região conservada de proteínas
20 AHASL e foram descritas outras substituições de aminoácidos pela alanina em 179 que são conhecidas por conferirem resistência a herbicida em uma planta que compreende uma tal proteína AHASL. Por conseguinte, as plantas de arroz resistentes a herbicida da invenção incluem, mas não são limitadas àquelas plantas de arroz que compreendem em seus genomas pelo menos uma
25 cópia de um polinucleotídeo AHASL1 que codifica uma proteína AHASL1 resistente a herbicida que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente.

As plantas de arroz da invenção adicionalmente incluem plantas que compreendem, em relação à proteína AHASL1 tipo selvagem, um

aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e uma ou mais substituições de aminoácidos adicionais na proteína AHASL1 em relação à proteína AHASL1 tipo selvagem, em que uma tal planta de arroz tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida quando comparado a uma planta de arroz tipo selvagem. Tais substituições de aminoácidos adicionais incluem, mas não são limitadas a: uma treonina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente; uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente; uma leucina em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente; e uma asparagina, treonina, ou fenilalanina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente.

A presente invenção fornece proteínas AHASL1 com substituições de aminoácidos em particular posições de aminoácidos dentro de regiões conservadas das proteínas AHASL1 de arroz descritas neste lugar.

A menos que de outra maneira indicado neste lugar, posições de aminoácidos particulares se referem à posição daquele aminoácido nas seqüências de aminoácidos de AHASL1 de arroz de comprimento completo estabelecidas na SEQ ID NO:2. Além disso, aqueles de habitual verso na arte irão reconhecer que tais posições de aminoácidos podem variar dependendo se os aminoácidos são adicionados ou removidos de, por exemplo, a extremidade N-terminal de uma seqüência de aminoácidos. Assim, a invenção abrange as substituições amino na posição referida ou posição equivalente (e.g., "posição de aminoácido 179 ou posição equivalente"). Por "posição equivalente" é pretendido significar uma posição que está dentro da mesma região conservada que a posição de aminoácido exemplificada. Exemplos de tais regiões conservadas são fornecidos em Tabela 2 abaixo.

Em adição, a presente invenção fornece polipeptídeos AHASL1 de arroz compreendendo um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e uma ou mais substituições de

aminoácidos adicionais na proteína AHASL1, em relação à proteína AHASL1 tipo selvagem, em que polipeptídeo AHASL1 compreende atividade de AHAS tolerante a herbicida, quando comparado à atividade de AHAS de um AHASL1 tipo selvagem. Estas substituições de aminoácidos incluem, mas não são limitadas, àquelas que são conhecidas por conferir resistência em uma planta para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona e/ou um herbicida de sulfoniluréia. Tais substituições de aminoácidos adicionais incluem, mas não são limitadas a: uma treonina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente; uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente; uma leucina em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente; e uma asparagina, treonina, ou fenilalanina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente. A invenção fornece adicionalmente polinucleotídeos isolados codificando tais polipeptídeos AHASL1, assim como cassetes de expressão, vetores de transformação, células hospedeiras transformadas, plantas transformadas, e métodos compreendendo tais polinucleotídeos.

A presente invenção fornece métodos para estimular a tolerância ou resistência de uma planta, tecido vegetal, célula vegetal, ou outra célula hospedeira para pelo menos um herbicida que interfere na atividade da enzima AHAS. Preferivelmente, um tal herbicida inibindo AHAS é um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, um herbicida de sulfonilaminocarboniltriazolino, ou mistura destes. Mais preferivelmente, um tal herbicida é um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, ou mistura destes. Para a presente invenção, os herbicidas de imidazolinona incluem, mas não são limitados a, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), um

derivado de qualquer dos herbicidas acima mencionados, e uma mistura de dois ou mais dos herbicidas acima mencionados, por exemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEYS).

Mais especificamente, o herbicida de imidazolinona pode ser selecionado a partir de, mas não é 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 [5etil-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 metil [6-(4-isopropil-4)-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato e metil [2-(4-isopropil-4-metil-5-] oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato. 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-(metoximetil)- nicotínico é preferido. O uso de ácido [2-(4-isopropil-4)-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico é particularmente preferido.

Para a presente invenção, os herbicidas de sulfoniluréia incluem, mas não são limitados a, clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron metil, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, um derivado de qualquer dos herbicidas acima mencionados, e uma mistura dois ou mais dos herbicidas acima mencionados. Os herbicidas de triazolopirimidina da invenção incluem, mas não são limitados a, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, e penoxsulam. Os herbicidas de

pirimidiniloxibenzoato da invenção incluem, mas não são limitados a, bispiribac, piritiobac, piriminobac, piribenzoxim e piriftalid. Os herbicidas de sulfonilamino-carboniltriazolinona incluem, mas não são limitados a, flucarbazona e propoxicarbazona.

5 É reconhecido que herbicidas de pirimidiniloxibenzoato são intimamente relacionados aos herbicidas de pirimidiniltiobenzoato e são generalizados sob o título do último nome pela Weed Science Society of America. Por conseguinte, os herbicidas da presente invenção incluem adicionalmente herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, incluindo, mas não
10 limitados a, os herbicidas de pirimidiniloxibenzoato descritos acima.

A presente invenção fornece métodos para estimular atividade de AHAS em uma planta compreendendo transformar uma planta com um construto de polinucleotídeo compreendendo um promotor operavelmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 da invenção. Os
15 métodos envolvem introduzir um construto de polinucleotídeo da invenção em pelo menos uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir desta. Os métodos envolvem o uso de um promotor que é capaz de acionar expressão de gene em uma célula vegetal. Preferivelmente, um tal promotor é um promotor constitutivo ou um promotor tecido-específico. Os
20 métodos encontram uso em estimular ou aumentar a resistência de uma planta para pelo menos um herbicida que interfere na atividade catalítica da enzima AHAS, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia.

A presente invenção fornece cassetes de expressão para expressar os polinucleotídeos da invenção em plantas, tecidos vegetais, células vegetais, e outras células hospedeiras. Os cassetes de expressão
25 compreendem um promotor expressável na planta, tecido vegetal, célula vegetal, ou outras células hospedeiras de interesse operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que compreende uma seqüência de nucleotídeos codificando ou uma proteína AHASL1 de comprimento completo (i.e.

incluindo o peptídeo de trânsito de cloroplasto) ou madura (i.e. sem o peptídeo de trânsito de cloroplasto). Se expressão é desejada nos plastídeos ou cloroplastos de plantas ou células vegetais, o cassete de expressão também pode compreender uma seqüência tendo como alvo cloroplasto operavelmente ligada que codifica um peptídeo de trânsito de cloroplasto.

Os cassetes de expressão da invenção encontram uso em um método para reforçar a tolerância a herbicida de uma planta ou uma célula hospedeira. O método envolve transformar a planta ou célula hospedeira com um cassete de expressão da invenção, em que o cassete de expressão compreende um promotor que é expressável na planta ou célula hospedeira de interesse e o promotor é operavelmente ligado a um polinucleotídeo da invenção que compreende uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1 resistente a imidazolinona da invenção.

O uso do termo "construtos de polinucleotídeos" neste lugar não é pretendido para limitar a presente invenção a construtos de polinucleotídeos compreendendo DNA. Aqueles de habitual verso na arte irão reconhecer que construtos de polinucleotídeos, particularmente polinucleotídeos e oligonucleotídeos, compreendidos de ribonucleotídeos e combinações de ribonucleotídeos e desoxiribonucleotídeos também podem ser empregadas nos métodos descritos neste lugar. Assim, os construtos de polinucleotídeos da presente invenção abrangem todos os construtos de polinucleotídeos que podem ser empregados nos métodos da presente invenção para transformar plantas incluindo, mas não limitados a, aqueles compreendidos de desoxiribonucleotídeos, ribonucleotídeos, e combinações destes. Tais desoxiribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem tanto moléculas naturalmente ocorrentes como análogos sintéticos. Os construtos de polinucleotídeos da invenção também abrangem todas as formas de construtos de polinucleotídeos incluindo, mas não limitadas a, formas de fita simples, formas de dupla fita, formas de grampo de cabelo, estruturas de

hastes e alças, e os semelhantes. Além disso, é entendido por aqueles de habitual verso na arte que cada seqüência de nucleotídeos descrita neste lugar também abrange o complemento daquela seqüência de nucleotídeos exemplificada.

5 Além disso, é reconhecido que os métodos da invenção podem empregar um construto 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 antisentido que é complementar a pelo menos uma porção de um mRNA. Tipicamente um tal construto de
10 polinucleotídeo é compreendido de uma seqüência de codificação para uma proteína ou RNA operavelmente ligado a regiões reguladoras transcricionais 5' e 3'. Alternativamente, também é reconhecido que os métodos da invenção podem empregar um construto de polinucleotídeo que não é capaz de direcionar, em uma planta transformada, a expressão de uma proteína ou
15 RNA.

Ademais, 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
20 métodos da invenção para expressar os polinucleotídeos em células hospedeiras não dependem de promotor particular. Os métodos abrangem o uso de qualquer promotor que é conhecido na arte e que é capaz de acionar expressão de gene na célula hospedeira de interesse.

A presente invenção abrange moléculas de polinucleotídeo
25 AHASL1 e fragmentos e variantes destas. Moléculas de polinucleotídeo que são fragmentos destas seqüências de nucleotídeos também são abrangidas pela presente invenção. Por "fragmento" é pretendido uma porção da seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1 da invenção. Um fragmento de uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 da invenção

pode codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína AHASL1, ou ele pode ser um fragmento que pode ser usado como uma sonda de hibridização ou iniciador de PCR usando métodos descritos abaixo. Uma porção biologicamente ativa de uma proteína AHASL1 pode ser preparada isolando uma porção de uma das seqüências de nucleotídeos de AHASL1 da invenção, expressando a porção codificada da proteína AHASL1 (e.g., por expressão recombinante *in vitro*), e verificando a atividade da porção codificada da proteína AHASL1. Moléculas de polinucleotídeo que são fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 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, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, ou 1950 nucleotídeos, ou até o número de nucleotídeos presentes em uma seqüência de nucleotídeos de comprimento completo descrita neste lugar (por exemplo, 1961 e 1932 nucleotídeos para SEQ ID NOS: 1 e 3, respectivamente) dependendo do uso pretendido.

Um fragmento de uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 que codifica uma porção biologicamente ativa de uma proteína AHASL1 da invenção irá codificar pelo menos cerca de 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, ou 625 aminoácidos contíguos, ou até o número total de aminoácidos presentes em uma proteína AHASL1 de comprimento completo da invenção (por exemplo, 644 aminoácidos para SEQ ID NO:2). Fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 que são úteis como sondas de hibridização para iniciadores de PCR geralmente não necessitam codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína AHASL1.

Moléculas de polinucleotídeo que são variantes das seqüências de nucleotídeos descritas neste lugar também são abrangidas pela presente invenção. "Variantes" das seqüências de nucleotídeos de AHASL1 da

invenção incluem aquelas seqüências que codificam as proteínas AHASL1 descritas neste lugar mas que diferem conservativamente por causa da degenerescência do código genético. Estas variantes alélicas naturalmente ocorrentes podem ser identificadas com o uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas, tal como reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridização como esboçado abaixo. Seqüências de nucleotídeos variantes também incluem seqüências de nucleotídeos derivadas sinteticamente que foram geradas, por exemplo, usando mutagênese sítio acionada mas que ainda codificam a proteína AHASL1 descrita na presente invenção como discutido abaixo. Geralmente, variantes de seqüência de nucleotídeos da invenção terão pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com uma seqüência de nucleotídeos particular descrita neste lugar. Uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 variante irá codificar uma proteína AHASL1, respectivamente, que tem uma seqüência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a seqüência de aminoácidos de uma proteína AHASL1 descrita neste lugar.

Em adição, o artesão versado irá adicionalmente perceber que mudanças podem ser introduzidas por mutação nas seqüências de nucleotídeos da invenção levando com isso a mudanças na seqüência de aminoácidos das proteínas AHASL1 codificadas sem alterar a atividade biológica da proteína AHASL1s. Assim, uma molécula isolada de polinucleotídeo codificando uma proteína AHASL1 tendo uma seqüência que difere daquela de SEQ ID NOS: 1 ou 3, respectivamente, pode ser criada introduzindo uma ou mais substituições, adições, ou deleções de nucleotídeo na seqüência de nucleotídeos correspondente descrita neste lugar, de forma que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos são introduzidas na proteína codificada. Mutações podem ser introduzidas por técnicas padrão, tal como mutagênese sítio acionada e mutagênese mediada

por PCR. Tais seqüências de nucleotídeos variantes também são abrangidas pela presente invenção.

Por exemplo, preferivelmente, substituições de aminoácidos conservativas podem ser feitas em um ou mais previstos, preferivelmente

5 resíduos de aminoácidos não essenciais. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da seqüência tipo selvagem de uma proteína AHASL1 (e.g., a seqüência de SEQ ID NO:2) sem alterar a atividade biológica, ao passo que um resíduo de aminoácido "essencial" é requerido para atividade biológica. Uma "substituição de

10 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 aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram definidas na arte. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (e.g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (e.g., ácido

15 aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (e.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (e.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (e.g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e.g., tirosina,

20 fenilalanina, triptofano, histidina). Tais substituições não seriam feitas para resíduos de aminoácidos conservados, ou para resíduos de aminoácidos residindo dentro de um motivo conservado.

As proteínas da invenção podem ser alteradas de várias maneiras incluindo substituições, deleções, truncamentos, e inserções de

25 aminoácidos. Métodos para tais manipulações geralmente são conhecidos na arte. Por exemplo, variantes de seqüência de aminoácidos das proteínas AHASL1 podem ser preparadas por mutações no DNA. Métodos para mutagênese e alterações de seqüência de nucleotídeos são bem conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-

492; Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; Patente Norte-Americana No. 4.873.192; Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova Iorque) e as referências citadas nestes. Orientação como para substituições de aminoácidos
5 apropriadas que não afetam atividade biológica da proteína de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), neste lugar incorporado por referência. Substituições conservativas, tal como trocar um aminoácido por outro tendo propriedades similares, pode ser preferível.

10 Alternativamente, seqüências de nucleotídeos de AHASL1 variantes podem ser feitas introduzindo mutações aleatoriamente ao longo de toda ou parte de uma seqüência de codificação de AHASL1, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser monitorados para atividade de AHAS para identificar mutantes que retêm atividade de
15 AHAS, incluindo atividade de AHAS resistente a herbicida. Seguindo mutagênese, a proteína codificada pode ser expressa recombinantemente, e a atividade da proteína pode ser determinada usando técnicas de ensaio padrão.

Assim, as seqüências de nucleotídeos da invenção incluem as seqüências descritas neste lugar assim como fragmentos e variantes destas. As
20 seqüências de nucleotídeos de AHASL1 da invenção, e fragmentos e variantes destas, podem ser usadas 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 codificando as mesmas proteínas ou idênticas.

25 Desta maneira, métodos tal como PCR, hibridização, e os semelhantes podem ser usados para identificar tais seqüências tendo identidade substancial com as seqüências da invenção. *Vêja*, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) e Innis, *et al.* (1990) PCR

Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, NY). Sequências de nucleotídeos de AHASL isoladas baseado na sua identidade de sequência com as sequências de nucleotídeos de AHASL1 estabelecidas neste lugar ou com fragmentos e variantes destas são abrangidas pela presente invenção.

Em um método de hibridização, toda ou parte de uma sequência de nucleotídeos de AHASL1 conhecida pode ser usada para monitorar cDNA ou bibliotecas genômicas. Métodos para construção de tal cDNA e bibliotecas genômicas são geralmente conhecido na arte e são descritos em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). As assim chamadas sondas de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA, ou outros oligonucleotídeos, e podem ser marcadas com um grupo detectável tal como ^{32}P , ou qualquer outro marcador detectável, tal como outros radioisótopos, um composto fluorescente, uma enzima, ou um co-fator de enzima. Sondas para hibridização podem ser feitas marcando oligonucleotídeos sintéticos baseado na sequência de nucleotídeos de AHASL1 conhecida descrita neste lugar. Iniciadores degenerados projetados com base em nucleotídeos conservados ou resíduos de aminoácidos em uma sequência de nucleotídeos de AHASL1 conhecida ou sequência de aminoácidos codificada podem adicionalmente ser usadas. A sonda tipicamente compreende uma região de sequência de nucleotídeos que hibridiza em condições estridentes com pelo menos cerca de 12, preferivelmente cerca de 25, mais preferivelmente cerca de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, ou 1800 nucleotídeos consecutivos de uma sequência de nucleotídeos de AHASL1 da invenção ou um fragmento ou variante desta. Preparação de sondas para hibridização é geralmente conhecida na arte e é descrita em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*

(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque), neste lugar incorporado por referência.

Por exemplo, a seqüência inteira de AHASL1 descrita neste lugar, ou uma ou mais porções desta, pode ser usada como uma sonda capaz de especificamente hibridizar com seqüências de AHASL1 correspondentes e RNAs mensageiros. Técnicas de hibridização incluem triagem por hibridização de bibliotecas de DNA emplacadas (ou placas ou colônias; veja, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque)).

Hibridização de tais seqüências pode ser realizada em condições estringentes. Por "condições estringentes" ou "condições de hibridização estringentes" é pretendido condições nas quais uma sonda irá hibridizar com sua seqüência alvo para um grau detectavelmente maior do que para outras seqüências (e.g., pelo menos 2-vezes sobre base). Condições estringentes são dependentes de seqüência e serão diferentes em circunstâncias diferentes.

Tipicamente, condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração de sal é menos do que cerca de 1,5 M de íon Na, tipicamente concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íon Na (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (e.g., 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (e.g., maior do que 50 nucleotídeos). Condições estringentes também podem ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Condições de baixa estringência exemplares incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 37°C, e uma lavagem em 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M de NaCl/0,3 M de citrato trissódico) a 50 a 55°C. Condições de moderada estringência exemplares incluem hibridização em 40 a 45% de formamida, 1,0

M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, e uma lavagem em 0,5X a 1X SSC a 55 a 60°C. Condições de alta estringência exemplares incluem hibridização em 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, e uma lavagem em 0,1X SSC a 60 a 65°C. Opcionalmente, tampões de lavagem podem compreender cerca de 0,1% a cerca de 1% de SDS. A duração de hibridização é geralmente menos do que cerca de 24 horas, normalmente cerca de 4 a cerca de 12 horas.

Especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridização, os fatores críticos sendo a força 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 and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$; onde M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é a porcentagem de nucleotídeos guanosina e citosina no DNA, % de forma é a porcentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A T_m , é a temperatura (em força iônica e pH definidos) na qual 50% de uma seqüência alvo complementar hibridiza com uma sonda perfeitamente compatível. T_m , é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de desigualdade; assim, T_m , condições de hibridização, e/ou lavagem podem ser ajustadas para hibridizar com seqüências da identidade desejada. Por exemplo, se seqüências com >90% de identidade são procuradas, a T_m pode ser diminuída 10°C. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para ser cerca de 5°C menor do que o ponto térmico de fusão (T_m) para a seqüência específica e seu complemento em uma força iônica e pH definidos. Entretanto, condições severamente estringentes 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 estringentes podem utilizar 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.). Usando a equação, composições de hibridização e lavagem, e T_m desejada, aqueles de habitual verso irão entender que variações na estringência de soluções de hibridização e/ou lavagem são inerentemente descritas. Se o grau desejado de desigualdade resulta em uma T. de menos do que 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), é preferido aumentar a concentração de SSC para que uma temperatura maior possa ser usada. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, Nova Iorque); e Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova Iorque). Veja Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d 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 nucleotídeos ou de aminoácidos que é suficientemente idêntica à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NOS: 1, 3, 4, e/ou 6, ou à sequência de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 e/ou 5. O termo "suficientemente idêntica" é usado neste lugar para se referir a uma primeira sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos que contém um número suficiente ou mínimo de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos idênticos ou equivalentes (e.g., com uma cadeia lateral similar) a uma segunda sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos de forma que a primeira e segunda sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos têm um domínio estrutural comum e/ou atividade funcional comum. Por exemplo, sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos que contém um domínio estrutural comum tendo pelo menos cerca de 45%, 55%, ou 65% de identidade, preferivelmente

75% de identidade, mais preferivelmente 85%, 95%, ou 98% de identidade são definidas neste lugar como suficientemente idênticas.

Para determinar a identidade percentual de duas seqüências de aminoácidos ou de dois ácidos nucleicos, as seqüências são alinhadas para propósitos de comparação ótima. A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhado pelas seqüências (i.e., identidade percentual = número de posições idênticas/número total de posições (e.g., posições sobrepostas) x 100). Em uma forma de realização, as duas seqüências são do mesmo comprimento. A identidade percentual entre duas seqüências pode ser determinada usando técnicas similares àquelas descritas abaixo, com ou sem permitir lacunas. Ao calcular identidade percentual, compatibilidade tipicamente exatas são contadas.

A determinação de identidade percentual entre duas seqüências pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitante preferido de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas seqüências é o algoritmo de Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como em Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Um tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Buscas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, score = 100, extensão de palavra = 12, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas às moléculas de polinucleotídeo da invenção. Buscas de proteínas BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, score = 50, extensão de palavra = 3, para obter seqüências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteínas da invenção. Para obter alinhamentos com lacunas para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, PSI-Blast pode ser usado para realizar uma busca

repetida que detecta relações distantes entre moléculas. *Veja* Altschul *et al.* (1997) *supra*. Quando utilizando programas BLAST, Gapped BLAST, e PSI-Blast, os parâmetros padrão dos programas respectivos (e.g., XBLAST e NBLAST) podem ser usados. *Veja* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Outro exemplo não limitante preferido de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de seqüências é o algoritmo de Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. m tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), que é parte do pacote de aplicativo computacional de alinhamento de seqüência GCG. Quando utilizando o programa ALIGN para comparar seqüências de aminoácidos, uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12, e uma penalidade de lacuna de 4 podem ser usadas. Alinhamento também pode ser realizado manualmente por inspeção.

A menos que de outra forma determinado, valores de identidade/similaridade de seqüência fornecidos neste lugar se referem ao valor obtido usando as seqüências de comprimento completo da invenção e usando alinhamento múltiplo por meio do algoritmo Clustal W (Nucleic Acid Research, 22(22):4673-4680, 1994) usando o programa AlignX incluído no pacote de aplicativo computacional Vector NTI Suite Versão 7 (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA) usando os parâmetros padrão; ou qualquer programa equivalente deste. Por "programa equivalente" é pretendido qualquer programa de comparação de seqüências que, para quaisquer duas seqüências em questão, fornece um alinhamento tendo compatibilidades idênticas de nucleotídeo ou resíduo de aminoácido e uma identidade de seqüência percentual idêntica quando comparado ao alinhamento correspondente gerado por AlignX no pacote de aplicativo computacional Vector NTI Suite Versão 7.

As seqüências de nucleotídeos de AHASL1 da invenção incluem tanto as seqüências naturalmente ocorrentes assim como formas mutantes, particularmente formas mutantes que codificam proteínas AHASL1

compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida. Da mesma maneira, as proteínas da invenção abrangem tanto proteínas naturalmente ocorrentes assim como variações e formas modificadas destas. Tais variantes continuarão a possuir a atividade de AHAS desejada. Obviamente, as mutações que serão feitas no DNA codificando a variante não devem colocar a seqüência fora de quadro de leitura e preferivelmente não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura secundária de mRNA. Veja, Publicação de Pedido de Patente Européia No. 75.444.

As deleções, inserções, e substituições das seqüências de proteínas abrangidas neste lugar não são esperadas produzirem mudanças radicais nas características da proteína. Entretanto, quando é difícil prever o efeito exato da substituição, deleção, ou inserção antecipadamente a fazê-lo, alguém versado na arte irá perceber que o efeito será avaliado por ensaios de triagem de rotina. Isto é, a atividade pode ser avaliada por ensaios de atividade de AHAS. *Veja*, por exemplo, Singh *et al.* (1988) *Anal. Biochem.* 171:173-179, neste lugar incorporado por referência.

Seqüências de nucleotídeos e proteínas variantes também abrangem seqüências e proteínas derivadas de um procedimento mutagênico e recombinogênico tal como embaralhamento de DNA. Com um tal procedimento, uma ou mais diferentes seqüências de codificação de AHASL podem ser manipuladas para criar uma nova proteína AHASL possuindo as propriedades desejadas.

Desta maneira, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeos de seqüência relacionada compreendendo regiões de seqüência que têm identidade de seqüência substancial e podem ser homologamente recombinadas *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, usando esta abordagem, motivos de seqüências codificando um domínio de interesse podem ser recombinados entre o gene AHASL1 da invenção e outros genes AHASL conhecidos para obter um novo

gene codificando para uma proteína com uma propriedade melhorada de interesse, tal como um K_m aumentado no caso de uma enzima. Estratégias para tal embaralhamento de DNA são conhecidas na arte. Veja, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer
5 (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer *et al.* (1998) *Nature* 391:288-291; e Patente Norte-Americana Nos. 5.605.793 e 5.837.458.

As seqüências de nucleotídeos da invenção podem ser usadas
10 para isolar seqüências correspondentes de outros organismos, particularmente outras plantas, mais particularmente outras dicotiledôneas. Desta maneira, métodos tal como PCR, hibridização, e os semelhantes podem ser usados para identificar tais seqüências com base na sua homologia de seqüência com as seqüências expostas neste lugar. Seqüências isoladas baseado na sua
15 identidade de seqüência com as seqüências inteiras de AHASL1 expostas neste lugar ou com fragmentos destas são abrangidas pela presente invenção. Assim, seqüências isoladas que codificam para uma proteína AHASL e que hibridizam em condições estringentes com a seqüência descrita neste lugar, ou com fragmentos desta, são abrangidas pela presente invenção.

20 Em uma abordagem de PCR, iniciadores de oligonucleotídeos podem ser projetados para uso em reações de PCR para amplificar seqüências de DNA correspondentes 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 arte e são descritos em Sambrook *et al.*
25 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque). Veja também Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nova Iorque); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nova Iorque); e Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR*

Methods Manual (Academic Press, Nova Iorque). Métodos conhecidos de PCR incluem, mas não são limitados a, métodos usando iniciadores pareados, pares de iniciadores, iniciadores específicos únicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene-específicos, iniciadores vetor-específicos, iniciadores parcialmente incompatíveis, e os semelhantes.

As seqüências de polinucleotídeos de AHASL1 da invenção são fornecidos em cassetes de expressão para expressão na planta de interesse. O cassete irá incluir seqüências reguladoras 5' e 3' operavelmente ligadas a uma seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 da invenção. Por "operavelmente ligada" é pretendida uma ligação funcional entre um promotor e uma segunda seqüência, em que a seqüência de promotor inicia e media transcrição da seqüência de DNA correspondente à segunda seqüência. Geralmente, operavelmente ligadas significa que as seqüências de ácidos nucleicos sendo ligadas são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteína, contíguas e no mesmo quadro de leitura. O cassete pode adicionalmente conter pelo menos um gene adicional para ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(is) pode ser fornecido em múltiplos cassetes de expressão.

Um tal cassete de expressão é fornecido com uma pluralidade de sítios de restrição para inserção da seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 estar sob a regulação transcricional das regiões reguladoras. O cassete de expressão pode adicionalmente conter genes marcadores selecionáveis.

O cassete de expressão irá incluir na direção 5'-3' de transcrição, uma região de iniciação transcricional e traducional (i.e., um promotor), uma seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 da invenção, e uma região de terminação transcricional e traducional (i.e., região de terminação) funcional em plantas. O promotor pode ser nativo ou análogo, ou exógeno ou heterólogo, para o hospedeiro vegetal e/ou para a seqüência de

polinucleotídeos de AHASL1 da invenção. Adicionalmente, o promotor pode ser a seqüência natural ou alternativamente uma seqüência sintética. Onde o promotor é "exógeno" ou "heterólogo" para o hospedeiro vegetal, é pretendido que o promotor não seja encontrado na planta nativa na qual o

5 promotor é introduzido. Onde o promotor é "exógeno" ou "heterólogo" para a seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 da invenção, é pretendido que o promotor não seja o promotor nativo ou naturalmente ocorrente para a seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 operavelmente ligada da invenção. Como usado neste lugar, um gene quimérico compreende uma

10 seqüência de codificação operavelmente ligada a uma região de iniciação de transcrição que é heteróloga para a seqüência de codificação.

Embora possa ser preferível expressar os polinucleotídeos AHASL1 da invenção usando promotores heterólogos, as seqüências de promotor nativo podem ser usadas. Tais construtos mudariam níveis de

15 expressão da proteína AHASL1 na planta ou célula vegetal. Assim, o fenótipo da planta ou célula vegetal é alterado.

A região de terminação pode ser nativa com a região de iniciação transcricional, pode ser nativa com a seqüência AHASL1 operavelmente ligada de interesse, pode ser nativa com o hospedeiro vegetal,

20 ou pode ser derivada de outra fonte (i.e., exógena ou heteróloga para o promotor, a seqüência de polinucleotídeos de AHASL1 de interesse, o hospedeiro vegetal, ou qualquer combinação destes). Regiões de terminação convenientes estão disponíveis do plasmídeo-Ti de *A. tuinefaciens*, tal como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Veja também

25 Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; e Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Onde apropriado, o(s) gene(s) pode(m) ser otimizado(s) para expressão aumentada na planta transformada. Isto é, os genes podem ser sintetizados usando códons preferidos de plantas para expressão melhorada. Veja, por exemplo, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para uma discussão de uso de códon preferido de hospedeiro. Métodos estão disponíveis na arte para sintetizar genes preferidos de plantas. Veja, por exemplo, Patente Norte-Americana Nos. 5.380.831, e 5.436.391, e Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, neste lugar incorporados por referência.

Modificações adicionais de seqüência são conhecidas por estimular expressão de gene em um hospedeiro celular. Estas incluem eliminação de seqüências codificando sinais de poliadenilação artificiais, sinais de sítio de corte de éxon-íntron, repetições tipo transposon, e outras tais seqüências bem caracterizadas que podem ser deletérias para expressão de gene. O teor de G-C da seqüência pode ser ajustado para média de para um dado hospedeiro celular, quando calculado por referência a genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas secundárias de mRNA de grampo de cabelo previstas.

Seqüências de nucleotídeos para estimular expressão de gene também podem ser usadas nos vetores de expressão de plantas. Estas incluem os íntrons do Adhl de milho, gene intron1 (Callis *et al. Genes and Development* 1:1183-1200, 1987), e seqüências líder, (seqüência W) do Vírus do Mosaico de Tabaco (TMV), Vírus da Mancha Clorótica de Milho e Vírus do Mosaico de Alfafa (Gallie *et al. Nucleic Acid Res.* 15:8693-8711, 1987 e Skuzeski *et al. Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). O primeiro íntron do locus shrunken-1 de milho, foi mostrado aumentar expressão de genes em construtos de gene quimérico. Patente Norte-Americana Nos. 5.424.412 e 5.593.874 descreve o uso de íntrons específicos em construtos de expressão de gene, e Gallie *et al. (Plant Physiol.* 106:929-939, 1994) também mostrou

que íntrons são úteis para regular expressão de gene em uma base específica para tecido. Para estimular adicionalmente ou para otimizar expressão de gene de subunidade pequena de AHAS, os vetores de expressão de plantas da invenção também podem conter seqüências de DNA contendo regiões de interação com a matriz (MARs). Células vegetais transformadas com tais sistemas de expressão modificados, então, podem exibir superexpressão ou expressão constitutiva de uma seqüência de nucleotídeos da invenção.

Os cassetes de expressão podem adicionalmente conter seqüências líder 5' no construto de cassete de expressão. Tais seqüências líder podem atuar para estimular tradução. Líderes de tradução são conhecidos na arte e incluem: líderes de picornavírus, por exemplo, líder de EMCV (região não codificante 5' de Encefalomiocardite) (Elroy-Stein *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); líderes de potivírus, por exemplo, líder de TEV (Vírus Etch do Tabaco) (Gallie *et al.* (1995) *Gene* 165(2):233-238), líder de MDMV (Vírus do Mosaico do Nanismo de Milho) (*Virology* 154:9-20), e proteína de ligação de cadeia pesada de imunoglobulina humana (BiP) (Macejak *et al.* (1991) *Nature* 353:90-94); líder não traduzido do mRNA de proteína de revestimento de vírus do mosaico de alfafa (AMV RNA 4) (Jobling *et al.* (1987) *Nature* 325:622-625); líder de vírus do mosaico de tabaco (TMV) (Gallie *et al.* (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, Nova Iorque), pp. 237-256); e líder de vírus da mancha clorótica de milho (MCMV) (Lommel *et al.* (1991) *Virology* 81:382-385). Veja também, Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968. Outros métodos conhecidos por estimularem tradução também podem ser utilizados, por exemplo, íntrons, e os semelhantes.

Ao preparar o cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de forma a sustentar as seqüências de DNA na orientação apropriada e, se apropriado, no quadro de leitura apropriado. Para este fim, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para unir os

fragmentos de DNA ou outras manipulações podem estar envolvidas para sustentar sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, ou os semelhantes. Para este propósito, mutagênese *in vitro*, reparo de iniciador, restrição, anelamento, re-

5 substituições, e.g., transições e transversões, podem estar envolvidos.

Diversos 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.

10 Tais promotores constitutivos incluem, por exemplo, o promotor do core do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos descritos em WO 99/43838 e Patente Norte-Americana No. 6.072.050; o promotor do core CaMV 35S (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina

15 (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 e Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (Patente Norte-Americana No. 5.659.026), e os semelhantes. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, Patente Norte-

20 Americana Nos. 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 direcionar expressão de AHASL1 estimulada dentro de um tecido vegetal particular. Tais promotores tecido-específicos incluem, mas não são limitados

25 a, promotores preferidos por folha, promotores preferidos por raiz, promotores preferidos por semente, e promotores preferidos por caule. Promotores tecido-específicos incluem Yamamoto *et al.* (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen *et al.* (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343; Russell *et al.* (1997)

Transgenic Res. 6(2):157-168; Rinehart *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto *et al.* (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl Cell Differ.* 20:181-196; Orozco *et al.* (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka *et al.* (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; e Guevara-Garcia *et al.* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Tais promotores podem ser modificados, se necessário, para expressão fraca.

Em uma forma de realização, os ácidos nucleicos de interesse são direcionados para o cloroplasto para expressão. Desta maneira, onde o ácido nucleico de interesse não é diretamente inserido no cloroplasto, o cassete de expressão irá adicionalmente conter uma seqüência tendo como alvo cloroplasto compreendendo uma seqüência de nucleotídeos que codifica um peptídeo de trânsito de cloroplasto para direcionar o produto de gene de interesse para os cloroplastos. Tais peptídeos de trânsito são conhecidos na arte. Com respeito a seqüências tendo como alvo cloroplastos, "operavelmente ligadas" significa que a seqüência de ácidos nucleicos codificando um peptídeo de trânsito (i.e., a seqüência tendo como alvo cloroplasto) é ligada ao polinucleotídeo AHASL1 da invenção de forma que as duas seqüências são contíguas e no mesmo quadro de leitura. Veja, por exemplo, Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; e Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481. Embora as proteínas AHASL1 da invenção incluam um peptídeo de trânsito de cloroplasto nativo, qualquer peptídeo de trânsito de cloroplasto conhecido na arte pode ser fusionado à seqüência de aminoácidos de uma proteína AHASL1 madura da invenção operavelmente ligando uma seqüência tendo como alvo cloroplasto à extremidade 5' de uma seqüência de nucleotídeos

codificando uma proteína AHASL1 madura da invenção.

Sequências tendo como alvo cloroplasto são conhecidas na arte e incluem a subunidade pequena de cloroplasto de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco) (de Castro Silva Filho *et al.* (1996) *Plant MoL Biol.* 30:769-780; Schnell *et al.* (1991) *Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5-
 5 (enolpiruvil)shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS) (Archer *et al.* (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); triptofano sintase (Zhao *et al.* (1995) *Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); plastocianina (Lawrence *et al.* (1997) *Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); corismato sintase (Schmidt *et al.* (1993) *J.*
 10 *Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); e a proteína de ligação de clorofila coletora de luz a/b (LHBP) (Lamppa *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999). Veja também Von Heijne *et al.* (1991) *Plant MoL Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys.*
 15 *Res. COMMUN.* 196:1414-1421; e Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

Métodos para transformação de cloroplastos são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. O método se pauta em
 20 liberação por canhão de partículas de DNA contendo um marcador selecionável e direcionando o DNA para o genoma de plastídeo através de recombinação homóloga. Adicionalmente, transformação de plastídeo pode ser realizada por transativação de um transgene silencioso gerado em plastídeo por expressão tecido-preferida de uma RNA polimerase nuclear-
 25 codificada e direcionada por plastídeo. Um tal sistema foi relatado em McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Os ácidos nucleicos de interesse a serem direcionados para o cloroplasto podem ser otimizados para expressão no cloroplasto para considerar diferenças em uso de códon entre o núcleo vegetal e esta organela.

Desta maneira, os ácidos nucleicos de interesse podem ser sintetizados usando códons preferidos de cloroplasto. Veja, por exemplo, Patente Norte-Americana No. 5.380.831, neste lugar incorporada por referência.

Como descrito neste lugar, as seqüências de nucleotídeos de
5 AHASL1 da invenção encontram uso em estimular a tolerância a herbicida de plantas que compreendem em seus genomas um gene codificando uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida. Um tal gene pode ser um gene endógeno ou um transgene. Adicionalmente, em certas formas de realização, as seqüências de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser sobrepostas
10 com qualquer combinação de seqüências de polinucleotídeos de interesse a fim de criar plantas com um fenótipo desejado. Por exemplo, os polinucleotídeos da presente invenção podem ser sobrepostos com quaisquer outros polinucleotídeos codificando polipeptídeos tendo atividade de pesticida e/ou inseticida, tal como, por exemplo, as proteínas de toxina de *Bacillus*
15 *thuringiensis* (descritas em Patente Norte-Americana Nos. 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109). As combinações geradas também podem incluir múltiplas cópias de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse.

É reconhecido que com estas seqüências de nucleotídeos,
20 construções antisentido, complementares a pelo menos uma porção do RNA mensageiro (mRNA) para as seqüências de polinucleotídeos de AHASL1 podem ser construídas. Nucleotídeos antisentido são construídos para hibridizar com o mRNA correspondente. Modificações das seqüências antisentido podem ser feitas contanto que as seqüências hibridizem com e
25 interfiram em expressão do mRNA correspondente. Desta maneira, construções antisentido tendo 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 85% de identidade de seqüência com as seqüências antisentido correspondentes podem ser usadas. Além disso, porções dos nucleotídeos antisentido podem ser usadas para interromper a expressão do

gene alvo. Geralmente, seqüências de pelo menos 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos, ou mais podem ser usadas.

As seqüências de nucleotídeos da presente invenção também podem ser usadas na orientação sentido para suprimir a expressão de genes endógenos em plantas. Métodos para suprimir expressão de gene em plantas usando seqüências de nucleotídeos na orientação sentido são conhecidos na arte. Os métodos geralmente envolvem transformar plantas com um construto de DNA compreendendo um promotor que aciona expressão em uma planta operavelmente ligada à pelo menos uma porção de uma seqüência de nucleotídeos que corresponde ao transcrito do gene endógeno. Tipicamente, uma tal seqüência de nucleotídeos tem identidade de seqüência substancial com a seqüência do transcrito do gene endógeno, preferivelmente maior do que cerca de 65% de identidade de seqüência, mais preferivelmente maior do que cerca de 85% de identidade de seqüência, o mais preferivelmente maior do que cerca de 95% de identidade de seqüência. Veja, Patente Norte-Americana Nos. 5.283.184 e 5.034.323; neste lugar incorporadas por referência.

Embora os polinucleotídeos AHASL1 resistentes a herbicida da invenção encontrem uso como genes marcadores selecionáveis para transformação vegetal, 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 são limitados a, genes codificando resistência a antibiótico, tal como aqueles codificando neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), assim como genes conferindo resistência a compostos de herbicida, tal como glufosinato de amônio, bromoxinil, imidazolinonas, e 2,4-diclorofenoxyacetato (2,4-D). Veja geralmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511;

Christopherson *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao *et al.* (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley *et al.* (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu *et al.* (1987) *Cell* 48:555-566; Brown *et al.* (1987) *Cell* 49:603-612; Figge *et al.* (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle *et al.* (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb *et al.* (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt *et al.* (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva *et al.* (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka *et al.* (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill *et al.* (1988) *Nature* 334:721-724. Tais descrições são neste lugar incorporadas por referência.

20 A lista acima de genes marcadores selecionáveis não é pretendida para ser limitante. Qualquer gene marcador selecionável pode ser usado na presente invenção.

25 As moléculas isoladas de polinucleotídeo compreendendo sequência de nucleotídeos que codificam as proteínas AHASL1 da invenção podem ser usadas em vetores para transformar plantas de forma que as plantas criadas têm resistência estimulada para herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona. As moléculas isoladas de polinucleotídeo AHASL1 da invenção podem ser usadas em vetores apenas ou em combinação com uma sequência de nucleotídeos codificando a subunidade pequena da enzima

AHAS (AHASS) para conferir resistência a herbicida em plantas. *Veja*, Patente Norte-Americana No. 6.348.643; que é neste lugar incorporada por referência.

5 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 isolada de polinucleotídeo da invenção. A molécula isolada de polinucleotídeo compreende uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1, particularmente uma proteína AHASL1 compreendendo uma seqüência amino que é estabelecida
10 na SEQ ID NO:2, ou um fragmento funcional e variante desta. O vetor de expressão de planta da invenção não depende de um promotor particular, apenas que um tal promotor seja capaz de acionar expressão de gene em uma célula vegetal. Promotores preferidos incluem promotores constitutivos e promotores tecido-específicos.

15 Os vetores de transformação da invenção podem ser usados para produzir plantas transformadas com um gene de interesse. O vetor de transformação irá compreender um gene marcador selecionável da invenção e um gene de interesse a ser introduzido e tipicamente expresso na planta transformada. Um tal gene marcador selecionável compreende um
20 polinucleotídeo AHASL1 resistente a herbicida da invenção operavelmente ligado a um promotor que aciona expressão em uma célula hospedeira. Para uso em plantas e células vegetais, o vetor de transformação compreende um gene marcador selecionável compreendendo um polinucleotídeo AHASL1 resistente a herbicida da invenção operavelmente ligado a um promotor que
25 aciona expressão em uma célula vegetal.

Os genes de interesse da invenção variam dependendo do resultado desejado. Por exemplo, várias mudanças em fenótipo podem ser de interesse incluindo modificar a composição de ácidos graxos em uma planta, alterar o teor de aminoácidos de uma planta, alterar mecanismos de defesa

contra inseto e/ou patógeno de uma planta, e os semelhantes. Estes resultados podem ser atingidos fornecendo expressão de produtos heterólogos ou expressão aumentada de produtos endógenos em plantas. Alternativamente, os resultados podem ser atingidos sustentando uma redução de expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas ou cofatores na planta. Estas mudanças resultam em uma mudança em fenótipo da planta transformada.

Em uma forma de realização da invenção, os genes de interesse incluem genes de resistência a inseto tal como, por exemplo, genes de proteína de toxina de *Bacillus thuringiensis* (Patente Norte-Americana Nos. 5.366.892; 5.747.450; 5.736.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109).

As proteínas ou polipeptídeos AHASL1 da invenção podem ser purificadas a partir de, por exemplo, plantas de arroz e podem ser usadas em composições. Também, uma molécula isolada de polinucleotídeo codificando uma proteína AHASL1 da invenção pode ser usada para expressar uma proteína AHASL1 da invenção em um micróbio tal como *E. coli* ou uma levedura. A proteína AHASL1 expressa pode ser purificada a partir de extratos de *E. coli* ou levedura por qualquer método conhecido por aqueles de habitual verso na arte.

A invenção também se refere a um método para criar uma planta transgênica que é resistente a herbicidas, compreendendo transformar uma planta com um vetor de expressão de planta compreendendo um promotor que aciona expressão em uma planta operavelmente ligada a uma molécula isolada de polinucleotídeo da invenção. A molécula isolada de polinucleotídeo compreende uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína AHASL1 da invenção, particularmente uma proteína AHASL1 compreendendo: uma seqüência amino que é estabelecida na SEQ ID NO:2, uma seqüência de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 ou 3, ou um

fragmento funcional e variante de ditas seqüências de aminoácidos.

A invenção também se refere às plantas não transgênicas de arroz, plantas transgênicas produzidas pelos métodos da invenção, e progenia e outros descendentes de tais plantas não transgênicas e transgênicas, cujas plantas exibem resistência estimulada ou aumentada para herbicidas que interferem na enzima AHAS, particularmente herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia.

Os polinucleotídeos AHASL1 da invenção, particularmente aqueles codificando proteínas AHASL1 resistentes a herbicida, encontram uso em métodos para estimular a resistência de plantas tolerantes a herbicida. Em uma forma de realização da invenção, as plantas tolerantes a herbicida compreendem uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida ou resistente a herbicida. As plantas tolerantes a herbicida incluem tanto plantas transformadas com uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 tolerante a herbicida como plantas que compreendem em seus genomas um gene endógeno que codifica uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida. Seqüências de nucleotídeos codificando proteínas AHASL1 tolerantes a herbicida e plantas tolerantes a herbicida compreendendo um gene endógeno que codifica uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida incluem os polinucleotídeos e plantas da presente invenção e aqueles que são conhecidos na arte. *Veja*, por exemplo, Patente Norte-Americana Nos. 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 neste lugar incorporadas por referência. Tais métodos para estimular a resistência de plantas tolerantes a herbicida compreendem transformar uma planta tolerante a herbicida com pelo menos uma construção de polinucleotídeo compreendendo um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal que é operavelmente ligado a um polinucleotídeo AHASL1 resistente a herbicida da invenção, particularmente o polinucleotídeo codificando uma proteína AHASL1 resistente a herbicida

estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3 polinucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2, e fragmentos e variantes ditos polinucleotídeos que codificam polipeptídeos compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida.

5 Numerosos vetores de transformação vegetal e métodos para transformar plantas estão disponíveis. *Veja*, por exemplo, An, G. *et al.* (1986) *Plant Pysiol.*, 81:301-305; Fry, J., *et al.* (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76:767-774; Hinchee, *et al.* (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203212.203-212; Cousins, *et al.* (1991) *Aust. J. Plant*
10 *Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. and Slightom, J. L. (1992) *Gene*.118:255-260; Christou, *et al.* (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; D'Halluin, *et al.* (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir, *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas *et al.* (1993) *Proc. Nat. Acad Sci. USA* 90:11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*; 29P:119-124; Davies, *et al.* (1993)
15 *Plant Cell Rep.* 12:180-183; Dong, J. A. and Mchughen, A. (1993) *Plant Sci.* 91:139-148; Franklin, C. I. and Trieu, T. N. (1993) *Plant. Physiol.* 102:167; Golovkin, *et al.* (1993) *Plant Sci.* 90:41-52; *Guo Chin Sci. Bull.* 38:2072-2078; Asano, *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. and Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo, *et al.* (1994) *Plant. J.*
20 5:583-592; Becker, *et al.* (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska *et al.* (1994) *Acta. Physiol Plant.* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5: 17-27; Eapen *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman, *et al.* (1994) *Bio-Technology* 12: 919923; Ritala, *et al.* (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24:317-325; e Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104:3748.

25 Os métodos da invenção envolvem introduzir um construto de polinucleotídeo em uma planta. Por "introduzir" é pretendido apresentar à planta o construto de polinucleotídeo de uma maneira tal que o construto ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos da invenção não dependem de um método particular para introduzir um construto de

polinucleotídeo para uma planta, apenas que o construto de polinucleotídeo ganhe acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Métodos para introduzir construtos de polinucleotídeos em plantas são conhecidos na arte incluindo, mas não limitados a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória, e métodos mediados por vírus.

Por "transformação estável" é pretendido que o construto de polinucleotídeo introduzido em uma planta se integre no genoma da planta e seja capaz de ser herdado por progenia desta. Por "transformação transitória" é pretendido que um construto de polinucleotídeo introduzido em uma planta não se integre no genoma da planta.

Para a transformação de plantas e células vegetais, as seqüências de nucleotídeos da invenção são inseridas usando técnicas padrão em qualquer vetor conhecido na arte que é adequado para expressão das seqüências de nucleotídeos em uma planta ou célula vegetal. A seleção do vetor depende da técnica de transformação preferida e da espécie de planta alvo a ser transformada. Em uma forma de realização da invenção, uma seqüência de nucleotídeos de AHASL1 é operavelmente ligada a um promotor vegetal que é conhecido por expressão de alto nível em uma célula vegetal, e este construto é então introduzido em uma planta que é susceptível a um herbicida de imidazolinona e uma planta transformada é regenerada. A planta transformada é tolerante a exposição a um nível de um herbicida de imidazolinona que iria matar ou significativamente prejudicar uma planta não transformada. Este método pode ser aplicado a qualquer espécie de planta; entretanto, ele é mais benéfico quando aplicado a plantas cultivadas, particularmente plantas cultivadas que tipicamente são crescidas na presença de pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de imidazolinona.

Metodologias para construir cassetes de expressão de plantas e introduzir ácidos nucleicos exógenos em plantas são geralmente conhecidas na arte e foram previamente descritas. Por exemplo, DNA exógeno pode ser

introduzido em plantas, usando plasmídeos vetores indutores de tumor (Ti). Outros métodos utilizados para liberação de DNA exógeno envolvem o uso de transformação de protoplasto mediada por PEG, eletroporação, filmes de microinjeção, e biolísticas ou bombardeamento de microprojétil para absorção direta de DNA. Tais métodos são conhecidos na arte. (Patente Norte-Americana No. 5.405.765 para Vasil *et al.*; Bilang *et al.* (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid *et al.*, (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 228: 104-112; Guerche *et al.*, (1987) *Plant Science* 52: 111-116; Neuhaus *et al.*, (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36; Klein *et al.*, (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell *et al.*, (1980) *Science* 208:1265; Horsch *et al.*, (1985) *Science* 227: 1229-1231; DeBlock *et al.*, (1989) *Plant Physiology* 91: 694-701; *Methods for 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 vegetal a ser transformada, estabilidade de vetores usados, nível de expressão de produtos de gene e outros parâmetros.

Outros métodos adequados de introduzir seqüências de nucleotídeos em células vegetais e subsequente inserção no genoma vegetal incluem microinjeção como Crossway *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:320-334, eletroporação como descrito por Riggs *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, transformação mediada por *Agrobacterium* como descrito por Townsend *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5.563.055, Zhao *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5.981.840, transferência de gene direta como descrito por Paszkowski *et al.* (1984) *EMBO J* 3:2717-2722, e aceleração de partícula balística como descrito em, por exemplo, Sanford *et al.*, Patente Norte-Americana No. 4.945.050; Tomes *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5,879,918; Tomes *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5.886.244; Bidney *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5.932.782; Tomes *et al.* (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in

- Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:923-926); e transformação de Lecl (WO 00/28058). Também veja, Weissinger *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford *et al.* (1987)
- 5 *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebola); Christou *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh *et al.* (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad.*
- 10 *Sci. USA* 85:4305-4309 (milho); Klein *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (milho); Tomes, Patente Norte-Americana No. 5.240.855; Buising *et al.*, Patente Norte-Americana Nos. 5.322.783 e 5.324.646; Tomes *et al.* (1995) 'Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment,' in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental*
- 15 *Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (milho); Klein *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (milho); Fromm *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren *et al.* (1984) *Nature (London)* 311:763-764; Bowen *et al.*, Patente Norte-Americana No. 5.736.369 (cereais); Bytebier *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae);
- 20 De Wet *et al.* (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman *et al.* (Longman, Nova Iorque), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler *et al.* (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 e Kaeppler *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformação mediada por filme); D'Halluin *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li *et al.* (1993) *Plant Cell Reports*
- 25 12:250-255 e Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (milho através de *Agrobacterium tumefaciens*); todos os quais são neste lugar incorporados por referência.

Os polinucleotídeos da invenção podem ser introduzidos em

plantas colocando em contato plantas com um vírus ou ácidos nucleicos virais. Geralmente, tais métodos envolvem incorporar um construto de polinucleotídeo da invenção dentro de uma molécula de DNA ou RNA viral. É reconhecido que a proteína AHASL1 da invenção pode ser inicialmente sintetizada como parte de uma poliproteína viral, que pode ser depois processada por proteólise *in vivo* ou *in vitro* para produzir a proteína recombinante desejada. Ademais, é reconhecido que promotores da invenção também abrangem promotores utilizados para transcrição por RNA polimerases virais. Métodos para introduzir construtos de polinucleotídeos em plantas e expressar uma proteína codificada nesse, envolvendo moléculas de DNA ou RNA viral, são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Patente Norte-Americana Nos. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931; neste lugar incorporadas por referência.

As células que foram transformadas podem ser crescidas em plantas em conformidade com meios convencionais. Veja, por exemplo, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas podem então ser crescidas, e ou polinizadas com a mesma linhagem transformada ou linhagens diferentes, e o híbrido resultante tendo expressão constitutiva da característica fenotípica desejada identificada. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para assegurar que expressão da característica fenotípica desejada seja estavelmente mantida e herdada e então sementes coletadas para assegurar expressão da característica fenotípica desejada tenha sido atingida. Desta maneira, a presente invenção fornece semente transformada (também referida como "semente transgênica") tendo um construto de polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, estavelmente incorporado no seu genoma.

A presente invenção pode ser usada para transformação de qualquer espécie de planta, incluindo, mas não limitada a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Exemplos de espécies de planta de interesse incluem, mas não

são limitados a, cereal ou milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (e.g., *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 (*Sorgo bicolor*, *Sorgo vulgare*), milheto (e.g., milheto pérola (*Pennisetum glaucum*), milheto miúdo (*Panicum miliaceum*), painço português (*Setaria italica*), capim pé-de-galinha (*Eleusine coracana*)), girassol (*Helianthus annuus*), açafrão (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum* ssp. *durum*), soja (*Glicina max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), 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*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), mamão (*Carica papaya*), castanha (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterrabas açucareiras (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), aveias, cevada, hortaliças, ornamentais, e coníferas. Preferivelmente, plantas da presente invenção são plantas cultivadas (por exemplo, girassol, *Brassica* sp., algodão, açúcar, beterraba, soja, amendoim, alfafa, açafrão, tabaco, milho, arroz, trigo, centeio, cevada triticales, sorgo, milheto, etc.).

As plantas resistentes a herbicida da invenção encontram uso em métodos para controlar ervas daninhas. Assim, a presente invenção fornece adicionalmente um método para controlar ervas daninhas na vizinhança de uma planta resistente a herbicida da invenção. O método compreende aplicar uma quantidade efetiva de um herbicida às ervas daninhas e à planta resistente a herbicida, em que a planta tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida de

imidazolinona ou sulfoniluréia, quando comparado a uma planta tipo selvagem. Em um tal método para controlar ervas daninhas, as plantas resistentes a herbicida da invenção são preferivelmente plantas cultivadas, incluindo, mas não limitadas a, arroz, girassol, alfafa, *Brassica sp.*, soja, algodão, açafrão, amendoim, tabaco, tomate, batata, trigo, milho, sorgo, cevada, centeio, milheto, e sorgo.

Fornecendo plantas tendo resistência aumentada para herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréia, uma ampla variedade de formulações pode ser empregada para proteger plantas de ervas daninhas, assim como para estimular crescimento vegetal e reduzir competição por nutrientes. Um herbicida pode ser usado por si só para pré-emergência, pós-emergência, controle pré-plantio e em plantio de ervas daninhas em áreas circundando as plantas descritas neste lugar ou pode ser usada uma formulação de herbicida de imidazolinona que contém outros aditivos. O herbicida também pode ser usado como um tratamento de semente. Aditivos encontrados em uma formulação de herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia incluem outros herbicidas, detergentes, adjuvantes, agentes de espalhamento, agentes de adesão, agentes estabilizantes, ou os semelhantes. A formulação de herbicida pode ser uma preparação úmida ou seca e pode incluir, mas não é limitada a, pós dispersáveis, concentrados emulsionáveis e concentrados líquidos. O herbicida e formulações de herbicida podem ser aplicados em conformidade com métodos convencionais, por exemplo, pulverizando, irrigando, polvilhando, ou os semelhantes.

A presente invenção fornece sementes não transgênicas e transgênicas com tolerância aumentada para pelo menos um herbicida, particularmente um herbicida inibindo AHAS, mais particularmente um herbicida de imidazolinona. Tais sementes incluem, por exemplo, sementes de arroz não transgênicas compreendendo as características de tolerância a herbicida da

planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, e sementes transgênicas compreendendo uma molécula de ácido nucleico IMI da invenção que codifica uma proteína IMI.

5 A presente invenção fornece métodos para produzir uma planta resistente a herbicida, particularmente uma planta de arroz resistente a herbicida, através de melhoramento vegetal convencional envolvendo reprodução sexual. Os métodos compreendem cruzar 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 das plantas resistentes a herbicida da presente invenção incluindo, por exemplo, plantas transgênicas
10 compreendendo pelo menos um dos polinucleotídeos da presente invenção que codificam uma proteína IMI resistente a herbicida e plantas não transgênicas de arroz que compreendem as características de tolerância a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB
15 41262. A segunda planta pode ser qualquer planta que é capaz de produzir plantas de progenia viáveis (i.e., sementes) quando cruzada com a primeira planta. Tipicamente, mas não necessariamente, a primeira e segunda planta são da mesma espécie. Os métodos da invenção podem envolver adicionalmente uma ou mais gerações de retrocruzamento das plantas de progenia do primeiro cruzamento com uma planta da mesma linhagem ou
20 genótipo que ou a primeira ou segunda planta. Alternativamente, a progenia do primeiro cruzamento ou qualquer cruzamento subsequente pode ser cruzada com uma terceira planta que é de uma linhagem ou genótipo diferente do que ou a primeira ou segunda planta. Os métodos da invenção podem
25 adicionalmente envolver selecionar plantas que compreendem as características de tolerância a herbicida da primeira planta.

A presente invenção fornece adicionalmente métodos para aumentar a resistência a herbicida de uma planta, particularmente uma planta de arroz resistente a herbicida, através de melhoramento vegetal convencional

envolvendo reprodução sexual. Os métodos compreendem cruzar 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 herbicidas diferentes do que a primeira planta. A primeira planta pode ser

5 qualquer das plantas resistentes a herbicida da presente invenção incluindo, por exemplo, plantas transgênicas compreendendo pelo menos um dos ácidos nucleicos IMI da presente invenção que codificam proteína IMI e plantas não transgênicas de arroz que compreendem as características de tolerância a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB

10 41262. A segunda planta pode ser qualquer planta que é capaz de produzir plantas de progenia viáveis (i.e., sementes) quando cruzada com a primeira planta. Tipicamente, mas não necessariamente, a primeira e segunda planta são da mesma espécie. As plantas de progenia produzidas por este método da presente invenção têm resistência aumentada para um herbicida quando

15 comparado a ou a primeira ou segunda planta ou ambas. Quando a primeira e segunda planta são resistentes a herbicidas diferentes, as plantas de progenia terão as características de tolerância a herbicidas da primeira e segunda planta combinadas. Os métodos da invenção podem envolver adicionalmente uma ou mais gerações de retrocruzamento das plantas de progenia do primeiro

20 cruzamento com uma planta da mesma linhagem ou genótipo que ou a primeira ou segunda planta. Alternativamente, a progenia do primeiro cruzamento ou qualquer cruzamento subsequente pode ser cruzada com uma terceira planta que é de uma linhagem ou genótipo diferente do que ou a primeira ou segunda planta. Os métodos da invenção podem adicionalmente

25 envolver selecionar plantas que compreendem as características de tolerância a herbicida da primeira planta, da segunda planta, ou ambas a primeira e a segunda planta.

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

resistência aumentada para imidazolinona é a planta de arroz (IMINTA 16) tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; ou mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente modificado da planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; ou de qualquer progenia da
5 planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; ou uma planta que é uma progenia de qualquer destas plantas; ou uma planta que compreende as características de tolerância a herbicida da planta tendo Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262.

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

A presente invenção fornece métodos que envolvem o uso de
20 pelo menos um herbicida inibindo AHAS selecionado a partir do grupo consistindo de herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfoniluréia, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de pirimidiniloxibenzoato, herbicidas de sulfonilamino-carboniltriazinona, e misturas dos mesmos.
25 Nestes métodos, o herbicida inibindo AHAS pode ser aplicado por qualquer método conhecido na arte incluindo, mas não limitado a, tratamento de semente, tratamento de solo, e tratamento foliar.

Antes de aplicação, o herbicida inibindo AHAS -pode ser convertido nas formulações habituais, por exemplo soluções, emulsões,

suspensões, polvilhos, pós, pastas e grânulos. A forma de uso depende do propósito pretendido particular; em cada caso, ela deve assegurar uma fina e igual distribuição do composto de acordo com a invenção.

As formulações são preparadas de uma maneira conhecida
 5 (veja e.g. para revisão Patente Norte-Americana 3.060.084, Patente Européia-A 707 445 (para concentrados líquidos), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, Nova Iorque, 1963, pages 8-57 e et seq. WO 91/13546, Patente Norte-Americana 4.172.714, Patente Norte-Americana
 10 4.144.050, Patente Norte-Americana 3.920.442, Patente Norte-Americana 5.180.587, Patente Norte-Americana 5.232.701, Patente Norte-Americana 5.208.030, Patente Britânica 2.095.558, Patente Norte-Americana 3.299.566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., Nova Iorque, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell
 15 Scientific Publications, Oxford, 1989 e Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 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
 20 para a formulação de agroquímicos, tal como solventes e/ou carreadores, se desejado emulsificantes, tensoativos e dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelantes, para formulação de tratamento de semente também opcionalmente corantes e/ou ligantes e/ou agentes geleificantes.

25 Exemplos de solventes adequados são água, solventes aromáticos (por exemplo produtos de Solvesso, xileno), parafinas (por exemplo frações de óleo mineral), álcoois (por exemplo metanol, butanol, pentanol, benzil álcool), cetonas (por exemplo ciclohexanona, gama-butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP), acetatos (glicol diacetato), glicóis,

dimetilamidas de ácido graxo, ácidos graxos e ésteres de ácido graxo. Em princípio, misturas de solventes também podem ser usadas.

Exemplos de carreadores adequados são minerais naturais do solo (por exemplo caolims, argilas, talco, giz) e minerais sintéticos do solo
5 (por exemplo sílica altamente dispersa, silicatos).

Emulsificantes adequados são emulsificantes não iônicos e aniônicos (por exemplo éteres de álcool graxo de polioxietileno, alquilsulfonatos e arilsulfonatos).

Exemplos de dispersantes são licores residuais de lignina-sulfito e metilcelulose.
10

Tensoativos adequados são metal alcalino, metal alcalino terroso e sais de amônio de ácido lignosulfônico, ácido naftalenosulfônico, ácido fenolsulfônico, ácido dibutilnaftalenosulfônico, alquilarilsulfonatos, alquil sulfatos, alquilsulfonatos, sulfatos de álcool graxo, ácidos graxos e
15 glicol éteres de álcool graxo sulfatado, além disso condensados de naftaleno sulfonado e derivados de naftaleno com formaldeído, condensados de naftaleno ou de ácido naftalenosulfônico com fenol e formaldeído, polioxietileno octilfenol éter, isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, alquilfenol poliglicol éteres, tributilfenil poliglicol éter, tristearilfenil
20 poliglicol éter, alquilaril poliéter álcoois, condensados de óxido de etileno de álcool e álcool graxo, óleo de ricínio etoxilado, polioxietileno alquil éteres, polioxipropileno etoxilado, lauril álcool poliglicol éter acetal, sorbitol ésteres, licores residuais de lignosulfito e metilcelulose.

Substâncias que são adequadas para a preparação de soluções, emulsões, pastas ou dispersões oleosas pulverizáveis diretamente são frações
25 de óleo mineral de ponto de ebulição médio a alto, tal como querosene ou óleo diesel, além disso óleos de piche de carvão e óleos de origem vegetal ou animal, hidrocarbonos alifáticos, cíclicos e aromáticos, por exemplo tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados ou seus derivados,

metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, solventes altamente polares, por exemplo dimetil sulfóxido, N-metilpirrolidona ou água.

5 Também agentes anticongelantes tal como glicerina, etilenoglicol, propilenoglicol e bactericidas tal como podem ser adicionados à formulação.

Agentes antiespumantes adequados são por exemplo agentes antiespumantes baseados em silicone ou estearato de magnésio.

10 Conservantes adequados são por exemplo Diclorofeno e enzilalcoolhemiformal.

Formulações de tratamento de semente podem adicionalmente compreender ligantes e opcionalmente corantes.

15 Ligantes podem ser adicionados para melhorar a adesão dos materiais ativos nas sementes depois de tratamento. Ligantes adequados são copolímeros de bloqueio EO/P0 tensoativos mas também álcoois de polivinil, polivinilpirrolidonas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenoaminas, polietilenoaminas, polietilenoiminas (Lupasol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, polivinilacetato, tilose e copolímeros derivados destes polímeros.

20 Opcionalmente, também corantes podem ser incluídos na formulação. Corantes ou tinturas adequadas para formulações de tratamento de semente são Rodamina B, C.I. Pigmento Vermelho 112, C.I. Solvente Vermelho 1, pigmento azul 15:4, pigmento azul 15:3, pigmento azul 15:2, pigmento azul 15:1, pigmento azul 80, pigmento amarelo 1, pigmento
25 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 básico 10, violeta básico 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 geleificante adequado é carragenano (Satiagel).

Pós, materiais para espalhamento, e produtos polvilháveis
5 podem ser preparados misturando ou concomitantemente moendo as substâncias ativas com um carreador sólido.

Grânulos, por exemplo grânulos revestidos, grânulos impregnados e grânulos homogêneos, podem ser preparados ligando os compostos ativos a carreadores sólidos. Exemplos de carreadores sólidos são
10 terras minerais mineral tal como géis de sílica, silicatos, talco, caolim, “attaclay”, pedra calcária, cal, giz, fuste, loess, argila, dolomita, terra diatomácea, sulfato de cálcio, sulfato de magnésio, óxido de magnésio, materiais sintéticos do solo, fertilizantes, tal como, por exemplo, sulfato de amônio, fosfato de amônio, nitrato de amônio, uréias, e produtos de origem
15 vegetal, tal como farelo de cereal, farelo de casca de árvore, farelo de madeira e farelo de casca de noz, pós de celulose e outros carreadores sólidos.

Em geral, as formulações compreendem de 0,01 a 95% em peso, preferivelmente de 0,1 a 90% em peso, do herbicida inibindo AHAS. Neste caso, os herbicidas inibindo AHAS são empregados em uma pureza de
20 a partir de 90% a 100% em peso, preferivelmente 95% a 100% em peso (de acordo com espectro de NMR). Para propósitos de tratamento de semente, respectivas formulações podem ser diluídas 2-10 vezes levando a concentrações nas preparações prontas para uso de 0,01 a 60% em peso de composto ativo em peso, preferivelmente 0,1 a 40% em peso.

25 O herbicida inibindo AHAS pode ser usado como tal, na forma de suas formulações ou as formas de uso preparadas a partir destas, por exemplo na forma de soluções, pós, suspensões ou dispersões diretamente pulverizáveis, emulsões, dispersões oleosas, pastas, produtos polvilháveis, materiais para espalhamento, ou grânulos, por meio de pulverização,

atomização, polvilhamento, espalhamento ou derramamento. As formas de uso dependem inteiramente dos propósitos pretendidos; elas são pretendidas para assegurar em cada caso a melhor distribuição possível do herbicida inibindo AHAS de acordo com a invenção.

5 Formas de uso aquosas podem ser preparadas a partir de concentrados de emulsão, pastas ou pós molháveis (pós pulverizáveis, dispersões oleosas) adicionando 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 umectante, 10 taquificante, dispersante ou emulsificante. Entretanto, também é possível preparar concentrados compostos de substância ativa, umectante, taquificante, dispersante ou emulsificante e, se apropriado, solvente ou óleo, e tais concentrados são adequados para diluição com água.

 As concentrações do composto ativo nas preparações prontas 15 para uso podem ser variadas dentro de extensões relativamente amplas. Em geral, elas são de 0,0001 a 10%, preferivelmente de 0,01 a 1% em peso.

 O herbicida inibindo AHAS também pode ser usado com sucesso no processo de volume ultra baixo (ULV), sendo possível aplicar formulações compreendendo mais de 95% em peso de composto ativo, ou 20 mesmo aplicar o composto ativo sem aditivos.

 Os seguintes são exemplos de formulações:

 1. Produtos para diluição com água para aplicações foliares.

Para propósitos de tratamento de semente, tais produtos podem ser aplicados à semente diluídos ou não diluídos.

25 A) Concentrados solúveis em água (SL, LS)

Dez partes em peso do herbicida inibindo AHAS são dissolvidas em 90 partes em peso de água ou um solvente solúvel em água. Como uma alternativa, umectantes ou outros auxiliares são adicionados. O herbicida inibindo AHAS dissolve com diluição com água, por meio do que

uma formulação com 10 % (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

B) Concentrados dispersáveis (DC)

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

C) Concentrados emulsionáveis (EC)

Quinze partes em peso do herbicida inibindo AHAS são dissolvidas em 7 partes em peso de xileno com adição de dodecilbenzenosulfonato de cálcio e óleo de ricínio etoxilado (em cada caso 5 partes em peso). Diluição com água fornece uma emulsão, por meio do que uma formulação com 15% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

D) Emulsões (EW, BO, ES)

Vinte e cinco partes em peso do herbicida inibindo AHAS são dissolvidas em 35 partes em peso de xileno com adição de dodecilbenzenosulfonato de cálcio e óleo de ricínio etoxilado (em cada caso 5 partes em peso). Esta mistura é introduzida em 30 partes em peso de água por meio de uma máquina emulsificante (e.g. Ultraturrax) e feita em uma emulsão homogênea. Diluição com água fornece uma emulsão, por meio do que uma formulação com 25% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

E) Suspensões (SC, OD, FS)

Em um moinho de bolas agitado, 20 partes em peso do herbicida inibindo AHAS são fracionadas com adição de 10 partes em peso de dispersantes, umectantes e 70 partes em peso de água ou de um solvente orgânico para gerar uma suspensão fina do herbicida inibindo AHAS. Diluição com água fornece uma suspensão estável do herbicida inibindo AHAS, por meio do que uma formulação com 20% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

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

Cinquenta partes em peso do herbicida inibindo AHAS são finamente moídas com adição de 50 partes em peso de dispersantes e umectantes e feitas como grânulos dispersáveis em água ou solúveis em água por meio de ferramentas técnicas (por exemplo extrusão, torre de pulverização, cama fluidizada). Diluição com água fornece uma dispersão ou solução estável do herbicida inibindo AHAS, por meio do que uma formulação com 50% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

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

Setenta e cinco partes em peso do herbicida inibindo AHAS são moídas em um moinho de rotor-estator com adição de 25 partes em peso de dispersantes, umectantes e gel de sílica. Diluição com água fornece uma dispersão ou solução estável do herbicida inibindo AHAS, por meio do que uma formulação com 75% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida.

I) Formulação de Gel (GF)

Em um moinho de bolas agitado, 20 partes em peso do herbicida inibindo AHAS são fracionadas com adição de 10 partes em peso de dispersantes, 1 parte em peso de umectantes de um agente geleificante e 70 partes em peso de água ou de um solvente orgânico para gerar uma suspensão fina do herbicida inibindo AHAS. Diluição com água fornece uma suspensão estável do herbicida inibindo AHAS, por meio do que uma formulação com 20% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida. Esta formulação de gel é adequada para uso como um tratamento de semente.

2. Produtos para serem aplicados não diluídos para aplicações foliares. Para propósitos de tratamento de semente, tais produtos podem ser aplicados à semente diluídos.

A) Pós polvilháveis (DP, DS)

Cinco partes em peso do herbicida inibindo AHAS são finamente moídas e misturadas intimamente com 95 partes em peso de caolim finamente dividida. Isto fornece um produto polvilhável tendo 5% (w/w) de herbicida inibindo AHAS.

5 B) Grânulos (GR, FG, GG, MG)

Meia parte em peso do herbicida inibindo AHAS é finamente moída e associada com 95,5 partes em peso de carreadores, por meio do que uma formulação com 0,5% (w/w) de herbicida inibindo AHAS é obtida. Métodos atuais são extrusão, secagem por pulverizador ou a cama fluidizada.

10 Isto fornece grânulos para serem aplicados não diluídos para uso foliar.

Formulações convencionais de tratamento de semente incluem por exemplo concentrados dispersáveis FS, soluções LS, pós para tratamento seco DS, pós dispersáveis em água para tratamento pastoso WS, pós solúveis em água SS e emulsão ES e EC e formulação de gel GF. Estas formulações
15 podem ser aplicadas à semente diluídas ou não diluídas. Aplicação às sementes é realizada antes de semear, ou diretamente nas sementes.

Em uma forma de realização preferida uma formulação FS é usada para 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
20 g/l de agente anticongelante, 0 a 400 g/l de ligante, 0 a 200 g/l de um pigmento e até 1 litro de um solvente, preferivelmente água.

As sementes não transgênicas e transgênicas da presente invenção das plantas resistentes a herbicida da presente invenção. Tais sementes incluem, por exemplo, sementes de arroz não transgênicas
25 compreendendo as características de tolerância a herbicida da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, e sementes transgênicas compreendendo uma molécula de polinucleotídeo da invenção que codifica uma proteína IMI.

Para tratamento de semente, sementes das plantas resistentes a

herbicida de acordo com a presente invenção são tratadas com herbicidas, preferivelmente herbicidas selecionados a partir do grupo consistindo de herbicidas inibindo AHAS tal como amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pirazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxisulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxycarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piriftalid, piritiobac, e misturas dos mesmos, ou com uma formulação compreendendo um herbicida inibindo AHAS.

O termo tratamento de semente compreende todas as técnicas adequadas de tratamento de semente conhecidas na arte, tal como tratamento de sementes, recobrimento de sementes, polvilhamento de sementes, embebição de sementes, e peletização de sementes.

Em conformidade com uma variante da presente invenção, um assunto adicional da invenção é um método de tratar solo pela aplicação, em particular na semeadora: ou de uma formulação granular contendo o herbicida inibindo AHAS como uma composição/formulação (e.g. uma formulação granular, com opcionalmente um ou mais carreadores sólidos ou líquidos, agricolamente aceitáveis e/ou opcionalmente com um ou mais tensoativos agricolamente aceitáveis). Este método é vantajosamente empregado, por exemplo, em canteiros de cereais, milho, algodão, e girassol.

A presente invenção também compreende sementes revestidas com ou contendo com uma formulação de tratamento de semente compreendendo pelo menos um herbicida inibindo AHAS selecionado a partir

do grupo consistindo de amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pirazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxisulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxycarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piriftalid e piritiobac.

O termo semente inclui sementes e propágulos vegetais de todos os tipos incluindo mas não limitados a sementes verdadeiras, pedaços de semente, brotos secundários, cormos, bulbos, fruto, tubérculos, grãos, estacas, ramos cortados e os semelhantes e significa em uma forma de realização preferida sementes verdadeiras.

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

A aplicação de tratamento de semente com o herbicida inibindo AHAS ou com uma formulação compreendendo o herbicida inibindo AHAS é realizada pulverizando ou polvilhando as sementes antes de semeadura das plantas e depois de emergência das plantas.

No tratamento de sementes, as formulações correspondentes são aplicadas tratando as sementes com uma quantidade efetiva do herbicida inibindo AHAS ou uma formulação compreendendo o herbicida inibindo AHAS. Neste lugar, as taxas de aplicação são geralmente de 0,1 g a 10 kg do

a.i. (ou da mistura de a.i. ou da formulação) por 100 kg de semente, preferivelmente de 1 g a 5 kg por 100 kg de semente, em particular de 1 g a 2,5 kg por 100 kg de semente. Para cultivos específicas tal como alface a taxa pode ser maior.

5 A presente invenção fornece um método para combater vegetação indesejada ou controlar ervas daninhas compreendendo colocar em contato as sementes das plantas resistentes de acordo com a presente invenção antes de semeadura e/ou depois de pré-germinação com um herbicida inibindo AHAS. O método pode compreender adicionalmente semear as sementes, por
10 exemplo, em solo em um campo ou em um substrato em casa de vegetação. O método encontra uso particular para combater vegetação indesejada ou controlar ervas daninhas na vizinhança imediata da semente.

O controle de vegetação indesejada é entendido como significando o assassinato de ervas daninhas e/ou de outra maneira retardando
15 ou inibindo o crescimento normal das ervas daninhas. Ervas daninhas, no sentido mais amplo, são entendidas como significando todas as plantas que crescem em localizações onde elas são indesejadas.

As ervas daninhas da presente invenção incluem, por exemplo, ervas daninhas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Ervas daninhas
20 dicotiledôneas incluem, mas não são 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,
25 Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, e Taraxacum. Ervas daninhas monocotiledôneas incluem, mas não são 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.

Em adição, as ervas daninhas da presente invenção podem incluir, por exemplo, plantas cultivadas que estão crescendo na localização indesejada. Por exemplo, uma planta voluntária de milho 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 de plantas de soja.

Os artigos "um" e "uma" são usados neste lugar para se referir a um ou mais do que um (i.e., a pelo menos um) dos objetos gramaticais do artigo. Como forma de exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos.

Como usado neste lugar, a palavra "compreendendo," ou variações tal como "compreende" ou "compreendendo," serão entendidas para implicar a inclusão de um determinado elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos,, números inteiros ou etapas.

Os exemplos seguintes são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação.

EXEMPLO 1: Produção de uma Linhagem de Arroz Resistente a Imidazolinona

AHASL é uma enzima codificada no núcleo e seu gene, em diferentes espécies, foi seqüenciado em sua forma selvagem e outras formas mostrando sítios de mutação que conferem resistência a herbicidas de sulfoniluréia e de imidazolinona. A fim de produzir plantas de arroz com enzimas AHAS resistentes a herbicida, sementes de arroz foram tratadas com um mutagênico químico em uma tentativa de induzir pequenas mudanças no sítio ativo de interação com o herbicida a fim de prevenir inibição. Variedades

dominantes de arroz e linhagens elite de arroz foram selecionadas a fim de gerar uma nova mutação que é resistente as imidazolinonas mais ativas em germoplasma excelente. Pressão de seleção foi baseada em exposição de plantas em estágio de quatro folhas para dois dos mais ativos herbicidas de imidazolinona aplicados em uma aplicação durante diversas gerações até que linhagens homozigotas altamente resistentes fossem obtidas. As linhagens de arroz com resistência a imidazolinona foram produzidas como descrito abaixo.

Na primavera tardia da estação de crescimento número 1, duas amostras de sementes (600 g cada) da cultivar IRGA 417 de arroz foram tratadas com uma solução aquosa de azida de sódio 0,001 M em pH 3 (tampão fosfato 0,067M). Este tratamento foi aplicado embebendo cada semente-amostra em um Erlenmeyer de dois litros contendo um litro da solução de azida de sódio, em agitação constante, por 18 horas, em temperatura ambiente. Depois de tratamento, as sementes foram enxaguadas em água de torneira e, mais tarde, elas foram parcialmente seco-aerado em folhas de papel mata-borrão a fim de extrair a umidade da superfície de sementes. Depois disso, sementes tratadas foram semeadas diretamente no viveiro em Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina.

Sementes tratadas (M_1) e não tratadas controle da cultivar IRGA 417 de arroz foram plantadas no viveiro em uma taxa de 50 plantas por metro quadrado. As plantas foram crescidas em condições inundadas até maturidade (26 % de umidade do grão) e volume coletado. Sementes (M_2) das plantas foram coletadas e secas em um secador por convecção por 14 h a 45°C. Elas foram mantidas em armazenamento fechado até próxima estação de crescimento.

Na primavera tardia da estação de crescimento número 2, sementes M_2 foram plantadas com uma semeadeira experimental para grandes áreas em uma taxa de 50 kg/ha no viveiro em Concepcion del

Uruguay, E.R., Argentina. Uma área de 3 ha foi estabelecida compreendendo uma população de aproximadamente 6×10^6 plantas M2. IRGA 417 (tipo selvagem) também foi plantado como um controle. A área inteira foi sujeita a uma pressão de seleção com uma mistura de dois herbicidas de imidazolinona. Três aplicações separadas foram feitas com um pulverizador comercial in diferentes direções para prevenir qualquer fuga e resultando em um tratamento de 3X. Um volume total de 222 L/ha foi pulverizado a 50 psi (344,7 kPa), com bocais Teejets 8002, em cada aplicação. A taxa do tratamento de 1x foi uma mistura de Arsenal® (Imazapir $75 \text{ cm}^3 \text{ a.i./ha}$) e Cadre® (Imazapic $24,85 \text{ cm}^3 \text{ a.i./ha}$) em uma solução aquosa com um tensoativo não iônico (Citowett) na taxa de 0,25%. As aplicações foram feitas no estágio de quatro folhas das plantas de arroz. Nenhuma chuva foi registrada durante os 7 dias depois de tratamentos.

Observações em tempos regulares foram feitas para avaliar a área inteira tratada com herbicida. Em 90 dias depois do tratamento com herbicida, os indivíduos sobreviventes foram marcados e transplantados para a casa de vegetação para multiplicação assexual e produção de semente. Um total de 10 plantas individuais foram crescidas, e a semente foi coletada e seca em um incubador de semente por 7 dias a 50°C . Como esperado, nenhuma das plantas de controle (IRGA 417) sobreviveu ao tratamento com herbicida.

Sementes (M_3) de plantas M2 selecionadas foram plantadas em potes individuais em condições de casa de vegetação em Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina durante o inverno imediatamente seguindo a segunda estação. Um tratamento de 2X foi aplicado com um pulverizador costal dividido em duas aplicações de uma taxa de 1X de Arsenal® (Imazapir $75 \text{ cm}^3 \text{ a.i./ha}$) e Cadre® (Imazapic $24,85 \text{ cm}^3 \text{ a.i./ha}$) em uma solução aquosa com um tensoativo não iônico (Citowet) na taxa de 0,25%.

Perfilhos das plantas tolerantes a herbicida (e.g., plantas que sobreviveram a tratamentos com herbicida) foram crescidos até maturidade

(26% de umidade de grão) e coletados manualmente. A semente coletada (M₄) foi sujeita a um tratamento de quebra de dormência de 7 dias a 50°C e preparada para o plantio de próxima estação de crescimento. Sementes de duas plantas tolerantes a herbicida foram mantidas separadamente. As sementes de foram preparadas para um plantio de estação tardia externo em Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina.

No verão de estação de crescimento número 3, sementes M₄ de uma planta M₃ tolerante a herbicida que foi designado como IMINTA 16 foram plantadas com a taxa de 50 kg/ha.

Um tratamento de 2X de herbicidas de imidazolinona foi aplicado no estágio de quatro a cinco folhas das plantas de arroz como duas aplicações de uma taxa de 1X de Arsenal® (Imazapir 75 cm³ a.i/ha) e Cadre® (Imazapic 24,85 cm³ a.i/ha) em uma solução aquosa com um tensoativo não iônico (Citowet) na taxa de 0,25%. Nenhum sintoma fitotóxico foi observado para plantas da linhagem IMINTA 16. Nenhum segregante tipo selvagem (i.e., não tolerante ao tratamento com herbicida) foi observado, e uma população altamente homogênea em características agronômicas e de tolerância foi produzida. Plantas IMINTA 16 individuais foram transplantadas para a casa de vegetação para produção de semente, e sementes (M₅) foram coletadas mais tarde naquele ano.

EXEMPLO 2: Uma Linhagem de Arroz Resistente a Imidazolina com uma Mutação no Gene AHASL1

DNA genômico foi separadamente extraído de folhas de plântulas crescidas na casa de vegetação da linhagem IMINTA 16 descrita em Exemplo 1 acima e o gene AHASL1 foi amplificado por um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores descritos abaixo. Os produtos resultantes das amplificações de PCR individuais foram seqüenciados usando métodos padrão.

Os iniciadores usados para PCR e seqüenciamento são

fornecidos em Tabela 1. Os iniciadores foram selecionados manualmente por inspeção visual das seqüências de arroz conhecidas publicamente para *Oryza sativa* 'Kinmaze', *Oryza sativa japonica* e *Oryza sativa indica*. Os iniciadores foram pareados aproximadamente a cada 400-500 bp ao longo dos aproximadamente 2000 bp do gene AHAS. Diversos iniciadores foram projetados para cada trecho de 500 bp para maximizar a probabilidade de sucesso de amplificação. Nenhum peso foi dado para regiões conservadas quando escolhendo iniciadores. As seqüências de iniciadores foram verificadas para formas de grampo de cabelo e dímeros através do sítio da rede mundial de computadores www.mature.com/oligonucleotide.html. Pelo fato de não haver íntrons presentes no gene AHASL1, o gene inteiro representa seqüência de codificação, e é portanto conservado. Iniciadores foram projetados para ter um teor de GC perto de 50% e temperaturas de fusão similares, aproximadamente 54-58°C. Os nomes de iniciadores em Tabela 1 refletem a exata posição de base de começo de acordo com seqüências de nucleotídeos de AHASL1 públicas para arroz (e.g., No. de Acesso de GenBank AB049822). U136851 se refere a uma região antes do códon de início no gene AHAS e foi projetado a partir de um clone BAC (OSJNBa0053B21), No. de Acesso AL731599.

Tabela 1 Iniciadores para Amplificação por PCR e Seqüenciamento de DNA do Gene AHASL1 de Arroz em IMINTA 16

Nome de Iniciador	Seqüência 5' a 3'	Temp. de fusão (°C)	Teor de GC (%)
Par 1			
U136851	GACATATGGGGCCCACTGT (SEQ ID NO: 4)	58,8	58
L789	GTAGATTCATCGAGGTGTC (SEQ ID NO: 5)	54,5	47,4
Par 2			
U642*	GTCCTTGATGTGGAGGACAT (SEQ ID NO: 6)	57,3	50
L1369	CATATTGCGGTGGGATCTCT (SEQ ID NO: 7)	57,3	50
Par 3			
U1229	GGGCTTGAATGCTCTGCTAC (SEQ ID NO: 8)	59,4	55
L1742	CGGGTTGCCCAAGTATGTAT (SEQ ID NO: 9)	57,3	50
Par 4			

U1633	ACCTCCCTGTGAAGGTGATG (SEQ ID NO: 10)	59,4	55
L2155*	AGGATTACCATGCCAAGCAC (SEQ ID NO: 11)	57,3	50
Iniciadores de PCR e iniciadores de seqüenciamento alternados			
U037	CACCACCCACCATGGCTA (SEQ ID NO: 12)	58,2	61,1
U114	GTAAGAACCACCAGCGAC (SEQ ID NO: 13)	56	55,6
U1109	GTGGATAAGGCTGACCTGT (SEQ ID NO: 14)	56,7	52,6
U1166	GGGAAAATTGAGGCTTTTGCA (SEQ ID NO: 15)	55,9	42,9
L1299	CTCATTGTGCCATGCACTAA (SEQ ID NO: 16)	55,3	45
U1721	GCATACATACTGGGCAAC (SEQ ID NO: 17)	54	47
L2054	CATACCACTCTTATGGGTC (SEQ ID NO: 18)	52	45

*Também usou U642 e L2155 como um par de PCR

Quando o DNA genômico amplificado por PCR das plântulas IMINTA 16 foi examinado, uma mudança de base única (i.e., transição, C para T) foi identificada na região de codificação do gene que causou uma substituição de aminoácido na proteína AHASL1 em posição de aminoácido 179 de Ala na linhagem tipo selvagem para Val na linhagem IMINTA 16. O sítio desta substituição corresponde à posição 205 na proteína AHASL de *Arabidopsis thaliana* (veja, Tabela 2 abaixo). A substituição de Ala205 por Val na proteína AHASL de *Arabidopsis thaliana* é conhecida por conferir em plantas que expressam esta proteína tolerância a herbicidas de imidazolinona.

EXEMPLO 3: Proteínas AHASL1 de Arroz Resistentes a Herbicida

A presente invenção descreve tanto seqüências de nucleotídeos como de aminoácidos para polipeptídeos AHASL1 de arroz resistentes a herbicida. Plantas compreendendo polipeptídeos AHASL1 resistentes a herbicida foram previamente identificadas, e diversas regiões conservadas de polipeptídeos AHASL1 que são os sítios de substituições de aminoácidos que conferem resistência a herbicida foram descritas. *Veja*, Devine and Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe et al. (eds.), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam; e Devine and Shukla, (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

Usando as moléculas de polinucleotídeo AHASL1 da invenção e métodos conhecidos por aqueles de habitual verso na arte, alguém pode

produzir moléculas de polinucleotídeo adicionais codificando polipeptídeos AHASL1 resistentes a herbicida tendo uma, duas, três, ou mais substituições de aminoácidos nos sítios identificados nestas regiões conservadas. Tabela 2 fornece as regiões conservadas de proteínas AHASL1, as substituições de aminoácidos conhecidas por conferir resistência a herbicida dentro destas regiões conservadas, e os aminoácidos correspondentes na proteína AHASL1 de arroz estabelecida na SEQ ID NO:2.

Tabela 2

Substituições de aminoácidos em Regiões conservadas de Polipeptídeos AHASL que são conhecidos por Conferir Resistência a herbicida e sua Posição equivalente em Polipeptídeos AHASL1 de Arroz

Região conservada	Mutação	Referência	Posição de aminoácido em arroz
VFAYPGGASMEIHQALTRS ³	Ala122 para Thr	Bernasconi <i>et al.</i> ⁴	Ala96
AITGQVPRRMIGT ³	Pro ₁₉₇ para Ala	Boutsalis <i>et al.</i> ⁵	Pro17112
	Prom para Thr	Guttieri <i>et al.</i> ⁶	
	Pro ₁₉₇ para His	Guttieri <i>et al.</i> ⁷	
	Pro ₁₉₇ para Leu	Guttieri <i>et al.</i> ⁶	
	Pro ₁₉₇ para Arg	Guttieri <i>et al.</i> ⁶	
	Pro ₁₉₇ para Ile	Boutsalis <i>et al.</i> ⁶	
	Pro ₁₉₇ para Gln	Guttieri <i>et al.</i> ⁶	
	Pro ₁₉₇ para Ser	Guttieri <i>et al.</i> ⁶	
	AFQETP ³	Ala ₂₀₅ para Asp	
Ala ₂₀₅ para Val ^{li}		Simpson	
QWED ³	Trp574 para Leu	Brtiniardl ^o	Trp548
		Boutsalis <i>et al.</i> ⁵	
IPSGG ³	Ser ₆₅₃ para Asn	Chang & Duggleby ¹²	Ser627
	Ser ₆₅₃ para Thr	Lee <i>et al.</i> ¹³	
	Ser ₆₅₃ para Phe		

¹Regiões conservadas de Devine and Eberlein (1997)

"Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe *et al.* (eds.), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam e Devine and Shukla, (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

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

³A proteína AHASL de arroz AHASL1 da invenção (SEQ ID NO:2) tem as mesmas regiões conservadas.

5 ⁴Bernasconi *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270(29):17381-17385.

⁵Boutsalis *et al.* (1999) *Pestic. Sci.* 55:507-516. ⁶Guttieri *et al.* (1995) *Weed Sci.* 43:143-178.

⁷Guttieri *et al.* (1992) *Weed Sci.* 40:670-678.

10 ⁸Hartnett *et al.* (1990) "Herbicide-resistant plants carrying mutated

acetolactate synthase genes," In: *Managing Resistance to Agrochemicals: Fundamental Research to Practical Strategies*, Green *et al.* (eds.),

15 American Chemical Soc. Symp., Series No. 421, Washington, DC, USA

⁹Simpson (1998) *Down to Earth* 53(1):26-35.

20 ¹⁰Bruniard (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Ph.D. Thesis, North Dakota State University, Fargo, ND, USA, pp 1-78.

"A presente invenção descreve a sequência de aminoácidos de uma proteína AHASL1 de arroz resistente a herbicida com a substituição de Ala₁₇₉ por Val (SEQ ID NO:2) e a seqüências de polinucleotídeos codificando esta AHASL1 resistente a herbicida (SEQ ID NOS: 1 e 3).

25 ¹²Chang and Duggleby (1998) *Biochem. J.* 333:765-777.

¹³Lee *et al.* (1999) *FEBS Lett.* 452:341-345.

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados no relatório são indicativos do nível daqueles versados na arte ao qual esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patente são neste lugar

incorporadas por referência no mesmo grau que se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

- 5 Embora a invenção precedente tenha sido descrita em algum detalhe como forma de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de entendimento, será óbvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações anexadas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria
 Livore, Blas
 Prina, Alberto Raul
 Singh, Bijay
 Ascenzi, Robert
 Whitt, Sherry R.

<120> Plantas de arroz resistentes a herbicida, polinucleotídeos codificando proteínas de subunidade grande de acetohidroxiácido sintase resistentes a herbicida, e métodos de uso

<130> 038867/306618

<150> 60/657.968

<151> 2005-03-02

<160> 18

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1961

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (7)...(1938)

<400> 1

cccacc atg gct acg acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc acc ttg tcc gcc	48
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala	
1 5 10	
gcc gcg acg gcc aag acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc	96
Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val	
15 20 25 30	
ttt ccc gct cga ggc cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tgc gcg	144
Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala	
35 40 45	
gtg tcc ccg gtc acc ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc	192
Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu	
50 55 60	
cgg ccg tgg ggg ccg gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg	240
Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val	
65 70 75	
gag gcg ctg gag cgg tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc	288
Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly	
80 85 90	
ggc gcg tcc atg gag atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc	336
Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile	
95 100 105 110	
acc aac cac ctc ttc cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc	384
Thr Asn His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser	

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

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

cct atg atc cca agt ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt 1920
 Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly
 625 630 635

gat ggc agg act gtg tat taatctataa tctgtatggt ggc 1961
 Asp Gly Arg Thr Val Tyr
 640

<210> 2

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 1932

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 3

atggctacga	ccgccgcggc	cgcgcccgcc	accttgctcg	ccgcgcgcgc	ggccaagacc	60
ggccgtaaga	accaccagcg	acaccacgtc	tttcccgctc	gaggccgggt	gggggcggcg	120
gcggtcaggt	gctcggcggt	gtccccggtc	acccgcgcgt	ccccggcgcc	gccggccacg	180
ccgctccggc	cgtggggggc	ggccgagccc	cgcaaggggc	cggacatcct	cgtggaggcg	240
ctggagcggg	gcggcgctcag	cgacgtgttc	gcctaccggg	gcggcgcgctc	catggagatc	300
caccaggcgc	tgacgcgctc	cccggtcctc	accaaccacc	tcttccgcca	cgagcagggc	360
gaggcgcttc	cggcgtccgg	gtacgcgcgc	gcgtccggcc	gcgtcggggg	ctgcgtcgcc	420
acctccggcc	ccggggcaac	caacctcgtg	tccgcgctcg	ccgacgcgct	gctcgactcc	480
gtcccgatgg	tcgccatcac	gggccaggtc	ccccgcgcga	tgatcggcac	cgacgtcttc	540
caggagacgc	ccatagtcga	ggtcacccgc	tccatcacca	agcacaatta	ccttgctcct	600
gatgtggagg	acatcccccg	cgtcatacag	gaagccttct	tcctcgcgctc	ctcgggcccgt	660
cctggccccg	tgctgggtcga	catccccaa	gacatccagc	agcagatggc	tgtgccaagtc	720
tgggacacct	cgatgaatct	accgggggtac	attgcacgcc	tgcccaagcc	acccgcgcga	780
gaattgcttg	agcaggctct	gcgtctggtt	ggcgagtcac	ggcgcccgat	tctctatgtc	840
ggtggtggct	gctctgcctc	tggtgatgaa	ttgcgcgggt	ttgttgagct	gaccggcatc	900
ccagttacaa	ccactctgat	gggcctcggc	aatttcccca	gtgatgatcc	gttgctccctg	960
cgcagcttg	ggatgcagtg	cacggtgtac	gcaaattatg	cggtggataa	ggctgacctg	1020
ttgcttgcat	ttggcgtgcg	gtttgatgat	cgtgtgacag	ggaaaattga	ggcttttgca	1080
agcagggcca	agattgtgca	cattgacatt	gatccagcgg	agattggaaa	gaacaagcaa	1140
ccacatgtgt	caatttgccg	agatgtttaag	cttgctttac	agggcttgaa	tgctctgcta	1200
gaccagagca	caacaaagac	aagtctctgat	tttagtgcgt	ggcacaatga	gttggaaccag	1260

```

cagaagaggg agtttcctct ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga 1380
cagcaccaga tggggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtg ttctgtggct 1500
aaccacgggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggtttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagttag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcctgac cgccatcaag 1800
aagatgctcg ataccacagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
aggactgtgt at 1932

```

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação por PCR e sequenciamento U136851

<400> 4

gacatatggg gccactgt

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação por PCR e sequenciamento L789

<400> 5

gtagattcat cgaggtgtc

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação por PCR e sequenciamento U642

<400> 6

gtccttgatg tggaggacat

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação por PCR e sequenciamento L1369

<400> 7

catattgcgg tgggatctct

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U1229

<400> 8
 gggccttgaat gctctgctac 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento L1742

<400> 9
 cggggttgccc aagtatgtat 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U1633

<400> 10
 acctccctgt gaaggtgatg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento L2155

<400> 11
 aggattacca tgccaagcac 20

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U037

<400> 12
 caccacccac catggcta 18

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U114

<400> 13
 gtaagaacca ccagcgac 18

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U1109

<400> 14
gtggataagg ctgacctgt 19

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U1166

<400> 15
gggaaaattg aggcttttgc a 21

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento L1299

<400> 16
ctcattgtgc catgcactaa 20

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento U1721

<400> 17
gcatacatatc ttgggcaac 19

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador de amplificação por PCR e seqüenciamento L2054

<400> 18
cataccactc tttatgggtc 20

REIVINDICAÇÕES

1. Planta de arroz, caracterizada pelo fato de compreender em seu genoma pelo menos uma cópia de um polinucleotídeo de subunidade grande de acetohidroxiácido sintase (AHASL1) de arroz que codifica uma proteína AHASL1 resistente a herbicida, dita proteína AHASL1 resistente a herbicida compreendendo um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente, em que dita planta tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida ser comparada a uma planta de arroz tipo selvagem.

2. Planta de arroz de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita proteína AHASL1 resistente a herbicida compreende uma valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente.

3. Planta de arroz de acordo com reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que dita proteína AHASL1 resistente a herbicida compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2.

4. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que dito polinucleotídeo AHASL1 de arroz compreende a sequência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3.

5. Planta de arroz de acordo com reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que dita proteína AHASL1 resistente a herbicida compreende adicionalmente pelo menos um membro selecionado a partir do grupo consistindo de:

(a) uma treonina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente;

(b) uma alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente;

(c) uma leucina em posição de aminoácido 548 ou posição

equivalente; e

(d) uma asparagina, treonina, ou fenilalanina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente.

5 6. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que dita planta é transgênica.

7. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que dita planta é não transgênica.

10 8. Semente da planta de arroz como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que dita semente compreende em seu genoma pelo menos uma cópia de dito polinucleotídeo AHASL1.

15 9. Planta de arroz, caracterizada pelo fato de compreender as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262.

10. Planta de arroz de acordo com reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que dita planta de arroz:

(a) tem Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262;

20 (b) é uma progenia da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262;

(c) é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente modificado da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, ou de qualquer progenia da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; ou

25 (d) é uma progenia de pelo menos uma das plantas de (a)-(c).

11. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que dita planta tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida selecionado a partir do grupo consistindo de herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfoniluréia,

herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de pirimidiniloxibenzoato, e herbicidas de sulfonilamino-carboniltriasolinona.

12. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que dita planta é transgênica.

5 13. Planta de arroz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que dita planta é não transgênica.

14. Semente da planta de arroz como definida em qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizada pelo fato de que dita semente
10 compreende as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262.

15 15. Método para controlar ervas daninhas na vizinhança de uma planta de arroz, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade efetiva de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, e um herbicida de sulfonilamino-carboniltriasolinona, ou mistura destes às ervas daninhas e à planta de arroz, em que dita planta de arroz é selecionada a partir do grupo consistindo de:

20 (a) uma planta de arroz compreendendo em seu genoma pelo menos uma cópia de um polinucleotídeo AHASL1 que codifica uma proteína AHASL1 resistente a herbicida, dita proteína AHASL1 resistente a herbicida compreendendo um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente, em que dita planta tem resistência aumentada para pelo menos um herbicida se comparada a uma planta de arroz tipo selvagem;

25 (b) uma planta de arroz compreendendo as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262;

(c) a planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262;

(d) uma planta de arroz que é uma progenia da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, dita planta de arroz compreendendo as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262;

5 (e) é um mutante, recombinante, ou um derivado geneticamente modificado da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, ou de qualquer progenia da planta com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262, dita planta de arroz compreendendo as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de
10 Acesso de NCIMB, NCIMB 41262; e

(f) uma planta de arroz que é uma progenia de pelo menos uma das plantas de arroz de (b)-(e), dita planta de arroz compreendendo as características de resistência a herbicida da planta de arroz com Número de Acesso de NCIMB, NCIMB 41262.

15 16. Método de acordo com reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dito herbicida de imidazolinona é selecionado a partir do 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 metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato, metil [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato, e mistura destes.

25 17. Método de acordo com reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dito herbicida de sulfoniluréia é selecionado a partir do grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil,

triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil, halosulfuron, e misturas dos mesmos.

18. Molécula de polinucleotídeo isolada, caracterizada pelo fato de compreender uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina;

(d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(e) uma seqüência de nucleotídeos que é completamente complementar a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo das seqüências de nucleotídeos estabelecidas em (a)-(d).

19. Cassete de expressão, caracterizado por compreender um

promotor operavelmente ligado à molécula de polinucleotídeo como definida na reivindicação 18.

20. Cassete de expressão de acordo com reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que dito promotor é capaz de acionar expressão de gene em uma bactéria, uma célula fúngica, uma célula animal, ou uma célula vegetal.

21. Célula hospedeira não humana, caracterizada por ser transformada com o cassete de expressão como definido na reivindicação 19 ou 20.

22. Célula hospedeira de acordo com reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que dita célula hospedeira é selecionada a partir do grupo consistindo de uma bactéria, uma célula fúngica, uma célula animal, e uma célula vegetal.

23. Vetor de transformação, caracterizado pelo fato de compreender um gene de interesse e um gene marcador selecionável, dito gene marcador selecionável compreendendo um promotor operavelmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos, em que dito promotor aciona expressão em uma célula hospedeira e dita seqüência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a

prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou

5 posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

(d) um fragmento da sequência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

10 24. Vetor de transformação de acordo com reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que dito promotor é expressável em uma célula vegetal.

25. Vetor de transformação de acordo com reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que dito promotor é um promotor constitutivo.

15 26. Vetor de transformação de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, caracterizado pelo fato de que dito gene marcador selecionável compreende adicionalmente uma sequência tendo como alvo cloroplasto operavelmente ligada.

20 27. Vetor de transformação de acordo com reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que dito promotor é expressável em uma bactéria ou uma levedura.

28. Célula hospedeira não humana, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de transformação como definido em qualquer uma das reivindicações 23 a 27.

25 29. Planta transformada, caracterizada pelo fato de compreender estavelmente incorporado em seu genoma um construto de polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal, em que dita sequência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo

consistindo de:

(a) a sequência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

5 (b) uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido
10 selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente
15 é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina;

(d) um fragmento da sequência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou
20 posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(e) uma sequência de nucleotídeos que é completamente complementar a pelo menos uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo das sequências de nucleotídeos estabelecidas em (a)-(d).

25 30. Planta transformada de acordo com reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que dito promotor é selecionado a partir do grupo consistindo de promotores constitutivos e promotores preferidos para tecidos.

31. Planta transformada de acordo com reivindicação 29 ou 30, caracterizada pelo fato de que dito construto de polinucleotídeo compreende

adicionalmente uma sequência tendo como alvo cloroplasto operavelmente ligada.

32. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizada pelo fato de que a atividade de AHAS de dita planta transformada é aumentada em relação a uma planta não transformada.

33. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizada pelo fato de que a resistência de dita planta transformada para pelo menos um herbicida é aumentada quando comparada a uma planta não transformada.

34. Planta transformada de acordo com reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que dito herbicida é um herbicida de imidazolinona.

35. Planta transformada de acordo com reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que dito herbicida de imidazolinona é selecionado a partir do 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 metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato e metil [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato.

36. Planta transformada de acordo com reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que dito herbicida é um herbicida de sulfoniluréia.

37. Planta transformada de acordo com reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que dito herbicida de sulfoniluréia é selecionado a partir do grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil,

triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil, halosulfuron, e misturas dos mesmos.

38. Planta transformada de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 37, caracterizada pelo fato de que dita planta transformada
5 é uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea.

39. Planta transformada de acordo com reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que dita dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, tabaco, batata, beterraba açucareira, alfafa, açafrão, e amendoim.

10 40. Planta transformada de acordo com reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que dita monocotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo de trigo, arroz, cevada, centeio, aveia, tritcale, milho, e sorgo.

15 41. Semente transformada, caracterizada pelo fato de ser da planta transformada como definida em qualquer uma das reivindicações 29 a 40.

20 42. Célula vegetal transformada, caracterizada pelo fato de compreender estavelmente incorporado em seu genoma um construto de polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal, em que dita sequência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a sequência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

25 (b) uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a sequência de aminoácidos

de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina;

(d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida; e

(e) uma seqüência de nucleotídeos que é completamente complementar a pelo menos uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo das seqüências de nucleotídeos estabelecidas em (a)-(d).

43. Método para aumentar atividade de AHAS resistente a herbicida em uma planta, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula vegetal com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir de dita célula vegetal transformada, em que dita seqüência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita

proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a

5 prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

10 (d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

em que a atividade de AHAS resistente a herbicida é

15 aumentada em dita planta ou pelo menos uma parte desta, quando comparada a uma planta não transformada.

44. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula vegetal com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de

20 nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir de dita célula vegetal transformada, em que dita seqüência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1

25 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita

proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a

5 prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

10 (d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

em que dita planta transformada tem resistência aumentada

15 para pelo menos um herbicida em relação à resistência de uma planta não transformada para dito herbicida.

45. Método de acordo com reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que dito promotor é selecionado a partir do grupo consistindo de promotores constitutivos e promotores preferidos para tecidos.

20 46. Método de acordo com reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que dito construto de polinucleotídeo compreende adicionalmente uma seqüência tendo como alvo cloroplasto operavelmente ligada.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

25 44 a 46, caracterizado pelo fato de que a atividade de AHAS de dita planta transformada é aumentada em relação a uma planta não transformada.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 47, caracterizado pelo fato de que dito herbicida é um herbicida de imidazolinona.

49. Método de acordo com reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que dito herbicida de imidazolinona é selecionado a partir do 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 metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-tolurato e metil [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-tolurato.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 47, caracterizado pelo fato de que dito herbicida é um herbicida de sulfoniluréia.

51. Método de acordo com reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que dito herbicida de sulfoniluréia é selecionado a partir do grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil, halosulfuron, e misturas dos mesmos.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 51, caracterizado pelo fato de que dita planta transformada é uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea.

53. Método de acordo com reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que dita dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo de girassol, soja, algodão, *Brassica spp.*, tabaco, batata, beterraba açucareira, alfafa, açafrão, e amendoim.

54. Método de acordo com reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que dita monocotiledônea é selecionada a partir do grupo

consistindo de trigo, arroz, cevada, centeio, aveia, triticale, milho, e sorgo.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 54, caracterizado pelo fato de que dita célula vegetal compreende resistência para pelo menos um herbicida, antes de dita etapa de transformação.

56. Método para aumentar tolerância a herbicida em uma planta tolerante a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de transformar uma planta tolerante a herbicida com um construto de polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão em uma célula vegetal e regenerar uma planta transformada a partir de dita célula vegetal transformada, em que dita sequência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a sequência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma sequência de nucleotídeos codificando a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma sequência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

(d) um fragmento da sequência de nucleotídeos de qualquer

uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida;

5 em que a tolerância a herbicida de dita planta tolerante a herbicida é aumentada em dita planta quando comparada a uma planta tolerante a herbicida não transformada.

57. Método de acordo com reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que dita planta tolerante a herbicida compreende uma proteína AHASL1 tolerante a herbicida, antes de dita etapa de transformação.

10 58. Método de acordo com reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de que dita planta tolerante a herbicida não foi geneticamente modificada para expressar dita proteína AHASL1 tolerante a herbicida.

15 59. Método de acordo com reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de que dita planta tolerante a herbicida foi geneticamente modificada para expressar dita proteína AHASL1 tolerante a herbicida.

20 60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 59, caracterizado pelo fato de que dita planta tolerante a herbicida é uma planta tolerante a imidazolinona, antes de dita etapa de transformação.

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

transformar uma célula vegetal com o vetor de transformação vegetal,

25 expor dita célula vegetal transformada a pelo menos um herbicida em uma concentração que inibe o crescimento de uma célula vegetal não transformada, e

identificar dita célula vegetal transformada por sua capacidade de crescer na presença de dito herbicida;

em que dito vetor de transformação vegetal compreende um gene marcador selecionável compreendendo um promotor e uma seqüência de nucleotídeos operavelmente ligada, dito promotor aciona expressão em uma célula vegetal, e dita seqüência de nucleotídeos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

(a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

(d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

62. Método de acordo com reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que dito herbicida é um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, e um herbicida de sulfonilamino-carboniltriasolinona, ou mistura destes.

63. Método de acordo com reivindicação 61 ou 62, caracterizado pelo fato de que dito vetor de transformação vegetal compreende adicionalmente pelo menos um gene de interesse.

5 64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de regenerar uma planta transformada a partir de dita célula vegetal transformada.

65. Método para controlar ervas daninhas na vizinhança de uma planta transformada, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma quantidade efetiva de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, e um herbicida de sulfonilamino-carboniltriasolinona, ou mistura destes às ervas daninhas e à planta transformada, em que dita planta transformada tem resistência aumentada ao herbicida de imidazolinona se comparada a uma planta não transformada, e a planta transformada
10 compreende em seu genoma pelo menos um cassete de expressão compreendendo uma seqüência de nucleotídeos operavelmente ligada a um promotor que aciona expressão de gene em uma célula vegetal, dita seqüência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo de:

20 (a) a seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(b) uma seqüência de nucleotídeos codificando a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína variante compreendendo atividade de AHAS resistente a herbicida, dita
25 proteína variante compreendendo adicionalmente a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída

com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina; e

- 5 (d) um fragmento da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento codifica um polipeptídeo, que compreende um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente e atividade de AHAS resistente a herbicida.

66. Método de acordo com reivindicação 65, caracterizado
 10 pelo fato de que dito herbicida de imidazolinona é selecionado a partir do 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-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-
 15 2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, e uma mistura de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato e metil [2-(4-] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato, e mistura destes.

67. Método de acordo com reivindicação 65, caracterizado
 20 pelo fato de que dito herbicida de sulfoniluréia é selecionado a partir do grupo consistindo de: clorsulfuron, metsulfuron metil, sulfometuron metil, clorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nicosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron,
 25 imazosulfuron, pirazosulfuron etil, halosulfuron, e misturas dos mesmos.

68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 67, caracterizado pelo fato de que dita planta é uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea.

69. Método de acordo com reivindicação 68, caracterizado

pelo fato de que dita dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo de girassol, alfafa, *Brassica*, soja, algodão, açafrão, amendoim, tabaco, tomate e batata.

70. Método de acordo com reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que dita monocotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo de trigo, tritcale, milho, arroz, sorgo, centeio, e milheto e cevada.

71. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo de:

10 (a) a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:2;
(b) a seqüência de aminoácidos codificada pela seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou 3;

(c) uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 com pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo de (i) a alanina em posição de aminoácido 96 ou posição equivalente é substituída com treonina, (ii) a prolina em posição de aminoácido 171 ou posição equivalente é substituída com alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina, ou serina, (iii) o triptofano em posição de aminoácido 548 ou posição equivalente é substituído com leucina, e (iv) a serina em posição de aminoácido 627 ou posição equivalente é substituída com asparagina, treonina, ou fenilalanina, em que dito polipeptídeo compreende uma atividade de AHAS resistente a herbicida; e

20 (d) um fragmento da seqüência de aminoácidos de qualquer uma de (a) a (c), em que dito fragmento compreende atividade de AHAS resistente a herbicida e um aspartato ou valina em posição de aminoácido 179 ou posição equivalente.

72. Método para produzir uma planta resistente a herbicida, caracterizado pelo fato de compreender cruzar uma primeira planta que é resistente a um herbicida com uma segunda planta que não é resistente ao

herbicida, em que a primeira planta é a planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, 9 a 13, e 29 a 40.

5 73. Método de acordo com reivindicação 72, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente selecionar para uma planta de progenia que é resistente ao herbicida.

74. Planta resistente a herbicida, caracterizada por ser produzida pelo método como definido na reivindicação 72 ou 73.

10 75. Semente da planta de acordo com reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que dita semente compreende as características de resistência a herbicida da primeira planta.

76. Método para aumentar a resistência a herbicida de uma planta, caracterizado pelo fato de compreender cruzar uma primeira planta com uma segunda planta, em que a primeira planta é a planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7, 9-13, 29-40 e 74.

15 77. Método de acordo com reivindicação 76, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente selecionar para uma planta de progenia que compreende resistência a herbicida aumentada quando comparada à resistência a herbicida de dita segunda planta.

20 78. Planta, caracterizada por ser produzida pelo método como definido na reivindicação 76 ou 77.

79. Semente da planta como definida na reivindicação 78, caracterizada pelo fato de que dita semente compreende a resistência a herbicida aumentada.

25 80. Semente da planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, 9 a 13, 29 a 40, 74, e 78, caracterizada pelo fato de que dita semente é tratada com um herbicida inibindo AHAS.

81. Semente de acordo com reivindicação 81, caracterizada pelo fato de que dito herbicida inibindo AHAS é selecionado a partir do grupo consistindo de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia,

um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, e um herbicida de sulfonilamino-carboniltriazolinona, ou mistura destes.

5 82. Método para combater vegetação indesejada, caracterizado por compreender colocar em contato uma semente da planta como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, 9 a 13, 29 a 40, 74, e 78 antes de semeadura e/ou depois de pré-germinação com um herbicida inibindo AHAS.

10 83. Método de acordo com reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que dito herbicida inibindo AHAS é selecionado a partir do grupo consistindo de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, e um herbicida de sulfonilamino-carboniltriazolinona, ou mistura destes.

Figura 1

	601				650
SEQ ID NO:1					
OsAHASL1.1					
OsAHASL1.2					
OsAHASL1.4		CCCAAA	CCCAGAAACC	CTCGCCGCCG	CCGCCGCCGC
OsAHASL1.6				CTCGCCGCCG	CCGCCGCCGC
ZmAHASL1	CCCACTCCGT	GCCAGGTGCC	ACCCTCCCCA	AGCCCTCGCG	CCGCCTCCGA
ZmAHASL2	CCCACTCCGT	GTC.CGTGGC	ACCCACCCCA	AACCCCTCGCG	CCGCCTCCGA
OsAHASL2				ATGGCTGCCG	CCGCCGCCGC
AtAHASL	ATGGCGGCCG	CAACAACAAC	AACAACAACA	TCTTCTTCGA	TCTCCTTCTC
	651				700
SEQ ID NO:1	CCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.1	CCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.2		.ATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.4	CACCACCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCGCCCTGT
OsAHASL1.6	CACCACCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCGCCCTGT
ZmAHASL1	GACAGCCGCC	CGCAACCATG	GCCACCGCCG	CC..ACCGCC	GCCGCCGCCG
ZmAHASL2	GACAGCCG.C	CGCAACCATG	GCCACCGCCG	CC..GCCGCG	TCTACCGCGC
OsAHASL2	CGCCTCACTC	TCCGTCTCCG	AC.GCCGCCG	CTAAGCTGCC	CAAACCGGGA
AtAHASL	CACCAAAC.C	ATCTCCTTCC	TCCTCCAAAT	CACCATTACC	AATCTCCAGA
	701				750
SEQ ID NO:1	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.1	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.2	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.4	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.6	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
ZmAHASL1	TCACCGGCGC	CACTACCGCT	ACGCCCAAGT	CGAGGCGCCG	AGCCCACCAC
ZmAHASL2	TCACTGGCGC	CACTACCGCT	GCGCCCAAGG	CGAGGCGCCG	GGCGCACCTC
OsAHASL2	GGGCAAGTGC	AACGGCGACG	CGACAGGGAT	CGTCCACGCG	TGGATGCTGC
AtAHASL	TTCTCCCTCC	CATTCTCCCT	AAACCCCAAC	AAATCATCCT	CCTCCTCCCC
	751				800
SEQ ID NO:1	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.1	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.2	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.4	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.6	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
ZmAHASL1	TTGGC....C	ACCCGGCGCG	CC.CTC...G	CCGCGCCCAT	CAGGTGCTCA
ZmAHASL2	CTGGC....C	ACCCGGCGCG	CC.CTC...G	CCGCGCCCAT	CAGGTGCTCA
OsAHASL2	CGCCT...GC	ACCCGGCGACA	GC.CGCCGTC	CCACGCGCGA	GAGGTGCTCG
AtAHASL	CCGCCGCGGT	ATCAAATCCA	GCTCTCCCTC	CTCCATCTCC	GCCGTGCTCA

Figura 1 cont.

	851				900
SEQ ID NO:1		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.1		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.2		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.4		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.6		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
ZmAHASL1		.GCTACGTCC	GTGGGGGCGG	AACGAGCCCC	GCAAGGGCTC
ZmAHASL2		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCGG	ACCGATCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL2	GTGCGCGCGC	CGGTCCGGAC	GCGGGGCGCC	ATGGGGCAGC	GGAAGGGCGC
AtAHASL	CCCGAAACAT	TCATCTCCCG	ATTCCGCTCCA	GATCAACCCC	GCAAGGGCGC
	901				950
SEQ ID NO:1	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTTCG
OsAHASL1.1	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTTCG
OsAHASL1.2	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTTCG
OsAHASL1.4	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTTCG
OsAHASL1.6	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTTCG
ZmAHASL1	CGACATCCTC	GTCGAGGCTC	TGGAGCGGTG	TGGCGTCCGT	GACGTCTTCG
ZmAHASL2	CGACATCCTC	GTCGAGTCCC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCCGC	GACGTCTTCG
OsAHASL2	GGACATCGTC	GTCGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCCGC	GACGTGTTTCG
AtAHASL	TGATATCCTC	GTCGAAGCTT	TAGAACGTCA	AGGCGTAGAA	ACCGTATTTCG
	951				1000
SEQ ID NO:1	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.1	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.2	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.4	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.6	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
ZmAHASL1	CCTACCCCGG	CGGCGCATCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCACT	CACCCGCTCC
ZmAHASL2	CCTACCCCGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCACT	CACCCGCTCC
OsAHASL2	AGTACCCGGG	CGGCGCGTCA	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGGTCC
AtAHASL	CTTACCCTGG	AGGTGCATCA	ATGGAGATTC	ACCAAGCCTT	AACCCGCTCT
	1001				1050
SEQ ID NO:1	CCGGTCATCA	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTTCGC
OsAHASL1.1	CCGGTCATCA	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTTCGC
OsAHASL1.2	CCGGTCATCA	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTTCGC
OsAHASL1.4	CCGGTCATCA	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTTCGC
OsAHASL1.6	CCGGTCATCA	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTTCGC
ZmAHASL1	CCCGTCATCG	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAACAAGGGG	AGGCCTTTCGC
ZmAHASL2	CCCGTCATCG	CCAACCACCT	CTTCCGCCAC	GAGCAAGGGG	AGGCCTTTCGC
OsAHASL2	CCGGTGATCC	GCAACCACCT	GCTCCGCCAC	GAGCAGGGGG	AGGCCTTTCGC
AtAHASL	TCCTCAATCC	GTAACGTCTT	TCCTCGTCAC	GAACAAGGAG	GTGTATTTCGC

Figura 1 cont.

	1051				1100
SEQ ID NO:1	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGCCG	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.1	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGCCG	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.2	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGCCG	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.4	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGCCG	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.6	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGCCG	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
ZmAHASL1	CGCCTCCGCG	TACGCGCGCT	CCTCGGGCCG	CGTTGGCGTC	TGCATCGCCA
ZmAHASL2	GGCCTCCGCG	TACGCGCGCT	CCTCGGGCCG	CGTCGGCGTC	TGCATCGCCA
OsAHASL2	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCT	CGTCGGGGCG	GCCGGGCGTC	TGCGTCGCCA
AtAHASL	AGCAGAAGGA	TACGCTCGAT	CCTCAGGTAA	ACCAGGTATC	TGTATAGCCA
	1101				1150
SEQ ID NO:1	CCTCCGGCCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
OsAHASL1.1	CCTCCGGCCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
OsAHASL1.2	CCTCCGGCCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
OsAHASL1.4	CCTCCGGCCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
OsAHASL1.6	CCTCCGGCCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
ZmAHASL1	CCTCCGGCCC	CGGCGCCACC	AACCTAGTCT	CTGCGCTCGC	AGACGCGTTG
ZmAHASL2	CCTCCGGCCC	CGGCGCCACC	AACCTTGTCT	CCGCGCTCGC	CGACGCGCTG
OsAHASL2	CCTCCGGCCC	GGGCGCCACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACGCCCAC
AtAHASL	CTTCAGGTCC	CGGAGCTACA	AATCTCGTTA	GCGGATTAGC	CGATGCGTTG
	1151				1200
SEQ ID NO:1	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCAT
OsAHASL1.1	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCAT
OsAHASL1.2	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCAT
OsAHASL1.4	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCAT
OsAHASL1.6	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCAT
ZmAHASL1	CTCGACTCCG	TCCCCATGGT	CGCCATCACG	GGACAGGTGC	CGCGACGCAT
ZmAHASL2	CTCGATTCCG	TCCCCATGGT	CGCCATCACG	GGACAGGTGC	CGCGACGCAT
OsAHASL2	CTCGACTCCG	TCCCGCTCGT	CGCCATCACG	GGGCAGGCCC	CGCGCCGCAT
AtAHASL	TTAGATAGTG	TTCTCTTTGT	AGCAATCACA	GGACAAGTCC	CTCGTCGTAT
	1201				1250
SEQ ID NO:1	GATCGGCACC	GACGCTTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.1	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.2	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.4	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.6	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
ZmAHASL1	GATTGGCACC	GACGCCTTTC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	GTCACCCGCT
ZmAHASL2	GATTGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL2	GATCGGCACC	GACGCGTTCC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	TTCACCCGCT
AtAHASL	GATTGGTACA	GATGCGTTTC	AAGAGACTCC	GATTGTTGAG	GTAACGCGTT

Figura 1 cont.

	1251				1300
SEQ ID NO:1	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.1	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.2	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.4	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.6	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
ZmAHASL1	CCATCACCAA	GCACAACTAC	CTGGTCCTCG	ACGTCGACGA	CATCCCCCGC
ZmAHASL2	CCATCACCAA	GCACAACTAC	CTGGTCCTCG	ACGTCGACGA	CATCCCCCGC
OsAHASL2	CCATCACCAA	GCACAACTAC	CTAATCCTCG	ACGTCGACGA	CATCCCCCGC
AtAHASL	CGATTACGAA	GCATAACTAT	CTTGTGATGG	ATGTTGAAGA	TATCCCTAGG

	1301				1350
SEQ ID NO:1	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.1	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.2	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.4	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.6	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
ZmAHASL1	GTCGTGCAGG	AGGCCTTCTT	CCTCGCATCC	TCTGGTCGCC	CGGGGCCGGT
ZmAHASL2	GTCGTGCAGG	AGGCCTTCTT	CCTCGCCTCC	TCTGGTCGAC	CGGGGCCGGT
OsAHASL2	GTCATCAACG	AGGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	ACGGGTCGCC	CCGGCCCCGT
AtAHASL	ATTATTGAGG	AAGCTTTCTT	TTTAGCTACT	TCTGGTAGAC	CTGGACCTGT

	1351				1400
SEQ ID NO:1	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.1	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.2	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.4	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCC	GTGCCGGTCT
OsAHASL1.6	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCC	GTGCCGGTCT
ZmAHASL1	GCTTGTTGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCG	GTGCCGGCCT
ZmAHASL2	GCTTGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCG	GTGCCTGTCT
OsAHASL2	GCTCGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCC	GTGCCGTCTT
AtAHASL	TTTGGTTGAT	GTTCTTAAAG	ATATTCAACA	ACAGCTTGCG	ATTCTTAATT

	1401				1450
SEQ ID NO:1	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.1	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.2	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.4	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCAGGGTACA	TCGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.6	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCAGGGTACA	TCGCACGCCT	GCCCAAGCCA
ZmAHASL1	GGGACACGCC	CATGAGTCTG	CCTGGGTACA	TCGCGCGCCT	TCCCAAGCCT
ZmAHASL2	GGGACAAGCC	CATGAGTCTG	CCTGGGTACA	TTGCGCGCCT	TCCCAAGCCC
OsAHASL2	GGGACGCGCC	GATGCGCCTC	CCGGGGTACA	TCTCCCGGCT	GCCGAAGCCG
AtAHASL	GGGAACAGGC	TATGAGATTA	CCTGGTTATA	TGTCTAGGAT	GCCTAAACCT

Figura 1 cont.

	1451				1500
SEQ ID NO:1	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG	CGTCTGGTTG	GCGAGTCACG
OsAHASL1.1	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG	CGTCTGGTTG	GCGAGTCACG
OsAHASL1.2	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG	CGTCTGGTTG	GCGAGTCACG
OsAHASL1.4	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG	CGTCTGGTTG	GCGAGTCACG
OsAHASL1.6	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG	CGTCTGGTTG	GCGAGTCACG
ZmAHASL1	CCCGCGACTG	AATTTCTTGA	GCAGGTGCTG	CGTCTTGTTG	GTGAATCACG
ZmAHASL2	CCTGCGACTG	AGTTGCTTGA	GCAGGTGCTG	CGTCTTGTTG	GTGAATCCCG
OsAHASL2	CCGGCCGCCA	ACCTGCTCGA	CGAAGTCATC	CGCCTCGTCG	GCGACGCCGA
AtAHASL	CCGGAAGATT	CTCATTTGGA	GCAGATTGTT	AGGTTGATTT	CTGAGTCTAA
	1501				1550
SEQ ID NO:1	GCGCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG	CTCTGCATCT	GGTGATGAAT
OsAHASL1.1	GCGCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG	CTCTGCATCT	GGTGATGAAT
OsAHASL1.2	GCGCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG	CTCTGCATCT	GGTGATGAAT
OsAHASL1.4	GCGCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG	CTCTGCATCT	GGTGACGAAT
OsAHASL1.6	GCGCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG	CTCTGCATCT	GGTGACGAAT
ZmAHASL1	GCGCCCTGTT	CTTTATGTTG	GCGGTGGCTG	TGCAGCATCA	GGTGAGGAGT
ZmAHASL2	GCGCCCTGTT	CTTTATGTTG	GCGGTGGCTG	CGCAGCATCT	GGTGAGGAGT
OsAHASL2	GAGGCCCGTC	CTCTACGTCG	GCGGCGGGTG	CTCCGCGTCG	GGCTACGAGC
AtAHASL	GAAGCCTGTG	TTGTATGTTG	GTGGTGGTTG	TTTGAATTCT	AGCGATGAAT
	1551				1600
SEQ ID NO:1	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC	CAGTTACAAC	CACTCTGATG
OsAHASL1.1	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC	CAGTTACAAC	CACTCTGATG
OsAHASL1.2	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC	CAGTTACAAC	CACTCTGATG
OsAHASL1.4	TGCGCTGGTT	TGTTGAGCTG	ACTGGTATCC	CAGTTACAAC	CACTCTGATG
OsAHASL1.6	TGCGCTGGTT	TGTTGAGCTG	ACTGGTATCC	CAGTTACAAC	CACTCTGATG
ZmAHASL1	TGTGCCGCTT	TGTGGAGTTG	ACTGGAATCC	CAGTCACAAC	TACTCTTATG
ZmAHASL2	TGCGACGCTT	TGTGGAGCTG	ACTGGAATCC	CGGTCAACAAC	TACTCTTATG
OsAHASL2	TGCGGCGCTT	CGTGGAGCTG	ACGGGCATCC	CGGTGACGAC	CACCCTCATG
AtAHASL	TGGGTAGGTT	TGTTGAGCTT	ACGGGGATCC	CTGTTGCGAG	TACGTTGATG
	1601				1650
SEQ ID NO:1	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG	TTGTCCCTGC	GCATGCTTGG
OsAHASL1.1	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG	TTGTCCCTGC	GCATGCTTGG
OsAHASL1.2	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG	TTGTCCCTGC	GCATGCTTGG
OsAHASL1.4	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGACGACCCG	TTGTCCCTGC	GCATGCTTGG
OsAHASL1.6	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGACGACCCG	TTGTCCCTGC	GCATGCTTGG
ZmAHASL1	GGCCTTGGCA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCA	CTGTCACTGC	GCATGCTTGG
ZmAHASL2	GGCCTCGGCA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCA	CTGTCTCTGC	GCATGCTAGG
OsAHASL2	GGCATCGGGA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCG	CTCTCGCTGC	GGATGCTCGG
AtAHASL	GGGCTGGGAT	CTTATCCTTG	TGATGATGAG	TTGTCGTTAC	ATATGCTTGG

Figura 1 cont.

	1651				1700
SEQ ID NO:1	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.1	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.2	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.4	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	CGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.6	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	CGTGGATAAG	GCTGACCTGT
ZmAHASL1	TATGCATGGC	ACAGTGTATG	CAAATTATGC	AGTGGATAAG	GCCGATCTGT
ZmAHASL2	TATGCATGGC	ACGGTGTATG	CAAATTATGC	AGTGGATAAG	GCCGATCTGT
OsAHASL2	GATGCATGGC	ACTGTGTACG	CCAACCTACG	CGTCGACAAC	GCCGACCTCC
AtAHASL	AATGCATGGG	ACGGTGTATG	CGAATTACG	TGTGGAGCAT	AGTGATTTGT
	1701				1750
SEQ ID NO:1	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.1	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.2	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.4	TGCTTGCGTT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.6	TGCTTGCGTT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
ZmAHASL1	TGCTTGCAAT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
ZmAHASL2	TGCTTGCACT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAGATTGAG
OsAHASL2	TCCTCGCGCT	CGGCGTGCGC	TTTCGACGACC	GCGTCACCGG	CAAAGTCGAG
AtAHASL	TGTTGGCGTT	TGGGGTGAGG	TTTGATGATC	GCGTCACGGG	TAAGCTTGAG
	1751				1800
SEQ ID NO:1	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.1	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.2	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.4	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCAGA
OsAHASL1.6	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCAGA
ZmAHASL1	GCTTTTGCAAG	GCAGAGCTAA	GATTGTGCAC	ATTGATATTG	ATCCTGCTGA
ZmAHASL2	GCTTTTGCAA	GCAGGGCTAA	GATTGTGCAC	GTTGATATTG	ATCCGGCTGA
OsAHASL2	GCGTTCGCGA	GCAGGGCCAA	GATCGTGCAC	GTCGACATCG	ACCCGTCGGA
AtAHASL	GCTTTTGCTA	GTAGGGCTAA	GATTGTTTAT	ATTGATATTG	ACTCTGCTGA
	1801				1850
SEQ ID NO:1	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.1	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.2	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.4	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.6	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
ZmAHASL1	GATTGGCAAG	AACAAGCAGC	CACATGTGTC	CATCTGTGCA	GATGTTAAGC
ZmAHASL2	GATTGGCAAG	AACAAGCAGC	CACATGTGTC	CATCTGTGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL2	GCTCGGGAAG	AACAAGCAGC	CGCACGTCTC	CATCTGCGCC	GACGTCAAGC
AtAHASL	GATTGGGAAG	AATAAGACTC	CTCATGTGTC	TGTGTGTGGT	GATGTCAAGC

Figura 1 cont.

	1851				1900
SEQ ID NO:1	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.1	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.2	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.4	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAC	AACA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.6	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAC	AACA...GAG	CACAACAAAG
ZmAHASL1	TTGCTTTGCA	GGGCATGAAT	ACTCTTCTGG	AAGG...AAG	CACATCAAAG
ZmAHASL2	TTGCTTTGCA	GGGCATGAAT	GCTCTTCTTG	AAGG...AAG	CACATCAAAG
OsAHASL2	TCGCCCTGCA	GGGCATGAAC	GCGATGCTGG	AAGAACAGAG	CGCCGCCGCC
AtAHASL	TGGCTTTGCA	AGGGATGAAT	AAGGTTCTTG	AGAA.CCGAG	CTGAGGAGC.
	1901				1950
SEQ ID NO:1	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCGTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.1	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCGTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.2	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCGTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.4	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCGTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.6	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCGTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
ZmAHASL1	AAGAGCT...	..TTG.ACTT	CGGCTCATGG	CATGATGAAT	TGGATCAGCA
ZmAHASL2	AAGAGCT...	..TTG.ACTT	TGGCTCATGG	AACGATGAGT	TGGATCAGCA
OsAHASL2	GCGCGCAAGA	ACCTCGATTT	CAGCGCGTGG	CGCTCGGAGC	TGGAGAAGAA
AtAHASL	TTAAGCT...	...TG.ATTT	TGGAGTTTGG	AGGAATGAGT	TGAACGTACA
	1951				2000
SEQ ID NO:1	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCAC
OsAHASL1.1	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCAC
OsAHASL1.2	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCAC
OsAHASL1.4	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAAAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCAC
OsAHASL1.6	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAAAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCAC
ZmAHASL1	AAAGAGGGAG	TTTCCCCTTG	GATATAAAAT	CTTCAATGAG	GAAATCCAGC
ZmAHASL2	GAAGAGGGAA	TTCCCCTTG	GGTATAAAAC	ATCTAATGAG	GAGATCCAGC
OsAHASL2	GAAGGTCGAG	TTCCCACTGG	GCTACAGAAC	GTTTCGGCGAG	GAGATCCCGC
AtAHASL	GAAACAGAAG	TTTCCGTTGA	GCTTTAAGAC	GTTTGGGGAA	GCTATTCCCTC
	2001				2050
SEQ ID NO:1	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.1	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.2	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.4	CGCAATATGC	CATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	TGAGGCAATC
OsAHASL1.6	CGCAATATGC	CATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	TGAGGCAATC
ZmAHASL1	CACAATATGC	TATTCAGGTT	CTTGATGAGT	TGACGAAGGG	GGAGGCCATC
ZmAHASL2	CACAATATGC	TATTCAGGTT	CTTGATGAGC	TGACGAAGGG	CGAGGCCATC
OsAHASL2	CGCAGTACGC	CATCCAGGTG	CTCGACGAGG	TCACCAACGG	GGAGGCCATC
AtAHASL	CACAGTATGC	GATTAAGGTC	CTTGATGAGT	TGACTGATGG	AAAAGCCATA

Figura 1 cont.

	2051				2100
SEQ ID NO:1	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.1	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.2	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.4	ATCGCTACTG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.6	ATCGCTACTG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
ZmAHASL1	ATTGCCACAG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AGTATTACAC
ZmAHASL2	ATCGGCACAG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AGTACTACAC
OsAHASL2	GTCGCCACGG	GCGTCGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGACGC	AGCACTACAC
AtAHASL	ATAAGTACTG	GTGTCGGGCA	ACATCAAATG	TGGGCGGCGC	AGTTCTACAA
	2101				2150
SEQ ID NO:1	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.1	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.2	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.4	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.6	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
ZmAHASL1	TTACAAGCGG	CCAAGGCAGT	GGCTGTCTTC	AGCTGGTCTT	GGGGCTATGG
ZmAHASL2	TTACAAGCGG	CCAAGGCAGT	GCTTGTCTTC	AGCTGGTCTT	GGGGCTATGG
OsAHASL2	CTACAGGAGG	CCCAGGCAGT	GGCTCTCGTC	CGCCGGGCTG	GGCGCCATGG
AtAHASL	TTACAAGAAG	CCAAGGCAGT	GGCTATCATC	AGGAGGCCTT	GGAGCTATGG
	2151				2200
SEQ ID NO:1	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.1	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.2	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.4	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.6	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
ZmAHASL1	GATTTGGTTT	GCCGGCTGCT	GCTGGTGCTG	CTGTGGCCAA	CCCAGGTGTC
ZmAHASL2	GATTTGGTTT	GCCGGCTGCT	GCTGGTGCTT	CTGTGGCCAA	CCCAGGTGTT
OsAHASL2	GCTTCGGCCT	GCCTGCCGCC	GCCGGCGCCG	CGGTGGCCAA	CCCGGGCGCC
AtAHASL	GTTTTGGACT	TCCTGCTGCC	ATTGGAGCGT	CTGTTGCTAA	CCCTGATGCA
	2201				2250
SEQ ID NO:1	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.1	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.2	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.4	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.6	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
ZmAHASL1	ACTGTTGTTG	ACATCGACGG	AGATGGTAGC	TTCTCATGA	ACATTCAGGA
ZmAHASL2	ACTGTTGTTG	ACATCGATGG	AGATGGTAGC	TTTCTCATGA	ACGTTTCAGGA
OsAHASL2	ACCGTGTCG	ACATCGACGG	CGACGGCAGC	CTCCTGATGA	ACATCCAGGA
AtAHASL	ATAGTTGTGG	ATATTGACGG	AGATGGAAGC	TTTATAATGA	ATGTGCAAGA

Figura 1 cont.

	2251				2300
SEQ ID NO:1	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.1	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.2	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.4	GCTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCTCCC	TGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.6	GCTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCTCCC	TGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
ZmAHASL1	GCTAGCTATG	ATCCGTATTG	AGAACCTCCC	AGTCAAGGTC	TTTGTGCTAA
ZmAHASL2	GCTAGCTATG	ATCCGAATTG	AGAACCTCCC	GGTGAAGGTC	TTTGTGCTAA
OsAHASL2	GCTCGCCATG	GTCCGCGTCG	AGGACCTGCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGCTGA
AtAHASL	GCTGGCCACA	ATCCGTGTAG	AGCAACTTCC	AGTGAAGATA	CTCTTATTAA
	2301				2350
SEQ ID NO:1	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.1	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.2	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.4	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.6	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTGGTGCAAT	TGGAGGATAG	GTTTTACAAG
ZmAHASL1	ACAACCAGCA	CCTCGGGATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTATAAG
ZmAHASL2	ACAACCAGCA	CCTGGGGATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTATAAG
OsAHASL2	ACAACCAGCA	CCTGGGCATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTACGAC
AtAHASL	ACAACCAGCA	TCTTGGCATG	GTTATGCAAT	GGGAAGATCG	GTTCTACAAG
	2351				2400
SEQ ID NO:1	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.1	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.2	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.4	GCGAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCGG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.6	GCGAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCGG.....	AATGTGAGAG
ZmAHASL1	GCCAATAGAG	CACACACATT	CTTGGGAAAC	CCAG.....	AGAACGAAAAG
ZmAHASL2	GCCAACAGAG	CGCACACATA	CTTGGGAAAC	CCAG.....	AGAATGAAAAG
OsAHASL2	GCCAACAGGG	CGCACACCTA	CCTCGGCAAC	CCGGCGGCGA	ACGGCGGCGG
AtAHASL	GCTAACCGAG	CTCACACATT	TCTCGGGGAT	CCGG.....	CTCAGGAGGA
	2401				2450
SEQ ID NO:1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.2	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.4	CGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAGGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.6	CGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAGGGGTTC	AATATTCCTG
ZmAHASL1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGGCAATTGC	TAAAGGGTTC	AACATTCCAG
ZmAHASL2	TGAGATATAT	CCAGATTTTC	TGACGATCGC	CAAAGGGTTC	AACATTCCAG
OsAHASL2	CGAGGTGTAC	CCGGACTTCG	TGACGATCGC	CGGAGGCTTC	GGCATCCCGG
AtAHASL	CGAGATATTC	CCGAACATGT	TGCTGTTTGC	AGCAGCTTGC	GGGATTCCAG

Figura 1 cont.

	2451				2500
SEQ ID NO:1	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.1	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.2	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.4	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.6	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
ZmAHASL1	CAGTCCGTGT	GACAAAGAAG	AGCGAAGTCC	ATGCAGCAAT	CAAGAAGATG
ZmAHASL2	CGGTCCGTGT	GACAAAGAAG	AACGAAGTCC	GCGCAGCGAT	AAAGAAGATG
OsAHASL2	CGGCCCGCGT	GACGAGGAAG	GGCGAGGTCC	GCGCCCGCGT	CGAGGAGATG
AtAHASL	CGGCGAGGGT	GACAAAGAAA	GCAGATCTCC	GAGAAGCTAT	TCAGACAATG
	2501				2550
SEQ ID NO:1	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.1	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.2	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.4	CTCGAGACTC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CGCACCAGGA
OsAHASL1.6	CTCGAGACTC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CGCACCAGGA
ZmAHASL1	CTTGAGGCTC	CAGGGCCGTA	CCTCTTGGAT	ATAATCGTCC	CGCACCAGGA
ZmAHASL2	CTCGAGACTC	CAGGGCCGTA	CCTCTTGGAT	ATAATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL2	ATGGCGGCGC	CGGGGCCGTA	CCTGCTGGAC	GTCGTCGTGC	CTCACCAGGA
AtAHASL	CTGGATACAC	CAGGACCTTA	CCTGTTGGAT	GTGATTTGTC	CGCACCAAGA
	2551				2600
SEQ ID NO:1	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.1	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.2	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.4	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.6	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAATTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
ZmAHASL1	GCATGTGTTG	CCTATGATCC	CTAGTGGTGG	GGCTTTCAAG	GATATGATCC
ZmAHASL2	GCATGTGTTG	CCTATGATCC	CTAGTGGTGG	GGCTTTCAAG	GATATGATCC
OsAHASL2	GCACGTGCTG	CCGATGATCC	CCAGCAATGG	CGCTTTCAAG	GACATTATCG
AtAHASL	ACATGTGTTG	CCGATGATCC	CGAGTGGTGG	CAC'TTTCAAC	GATGTCATAA
	2601				2650
SEQ ID NO:1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.2	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.4	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.6	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
ZmAHASL1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTGAT	CCGTTGA.CT	GCAGGTGCGAC
ZmAHASL2	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTACTGAT	CTAAAATCCA	GCAAGCAACT
OsAHASL2	TCGACGGTGA	TGGCCGGAGT	TCGTATTAG.		
AtAHASL	CGGAAGGAGA	TGGCCGGATT	AAATACTGA.		

Figura 2

	1				50
SEQ ID NO:2		MATTAA	AAAATLSAAA	TAKTGRKNHQ	RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.1		MATTAA	AAAATLSAAA	TAKTGRKNHQ	RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.2		MATTAA	AAAATLSAAA	TAKTGRKNHQ	RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.4		MATTAA	AAAAALSAAA	TAKTGRKNHQ	RHHVLPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.6		MATTAA	AAAAALSAAA	TAKTGRKNHQ	RHHVLPARGR VGAAA.....
ZmAHASL1		MATAAT	AAAALT	GATTATPKSR	RAHHLATRR ALAAP.....
ZmAHASL2		MATAAA	ASTALT	GATTAAPKAR	RAHLLATRR ALAAP.....
OsAHASL2		MAAAAA	AASLSVSDAA	AKLPKPGGQV	QRRDRDRPR VDAAACTRDS
AtAHASL		MAAATT	TTTTSSSISF	STKPSPPSSK	SPLPISRFSL PFSLNPKNSS
	51				100
SEQ ID NO:2				.VRCSAVSPV	TPPSPAPPAT PLRPWGPAEP
OsAHASL1.1				.VRCSAVSPV	TPPSPAPPAT PLRPWGPAEP
OsAHASL1.2				.VRCSAVSPV	TPPSPAPPAT PLRPWGPAEP
OsAHASL1.4				.VRCSAVSPV	TPPSPAPPAT PLRPWGPAEP
OsAHASL1.6				.VRCSAVSPV	TPPSPAPPAT PLRPWGPAEP
ZmAHASL1				.IRCSALSRA	TPT..APPAT PLRPWGPNEP
ZmAHASL2				.IRCSAASPA	MPM..APPAT PLRPWGPNDP
OsAHASL2	RRPTRERC..			STTVSLAATA	TATTATPVRA PVRTRAPMGQ
AtAHASL	SSSRRRGIKS	SSPSSISAVL	NTTTNVTTTP	SPTKPTKPT	FISRFAPDQ
	101				150
SEQ ID NO:2	RKGADILVEA	LERCGVSDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	TNHLFRHEQG
OsAHASL1.1	RKGADILVEA	LERCGVSDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	TNHLFRHEQG
OsAHASL1.2	RKGADILVEA	LERCGVSDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	TNHLFRHEQG
OsAHASL1.4	RKGADILVEA	LERCGVSDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	TNHLFRHEQG
OsAHASL1.6	RKGADILVEA	LERCGVSDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	TNHLFRHEQG
ZmAHASL1	RKGSIDILVEA	LERCGVRDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	ANHLFRHEQG
ZmAHASL2	RKGADILVES	LERCGVRDVF	AYPGGASMEI	HQALTRSPVI	ANHLFRHEQG
OsAHASL2	RKGADIVVEA	LERCGVRDVF	EYPGGASMEI	HQALTRSPVI	RNHLFRHEQG
AtAHASL	RKGADILVEA	LERQGVETVF	AYPGGASMEI	HQALTRSSI	RNVLPFRHEQG
	151				200
SEQ ID NO:2	EAFASGYAR	ASGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
OsAHASL1.1	EAFASGYAR	ASGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
OsAHASL1.2	EAFASGYAR	ASGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
OsAHASL1.4	EAFASGYAR	ASGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
OsAHASL1.6	EAFASGYAR	ASGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
ZmAHASL1	EAFASAYAR	SSGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
ZmAHASL2	EAFASGYAR	SSGRVGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPMVAITGQV
OsAHASL2	EAFASGYAR	SSGRPGVCA	TSGPGATNLV	SALADALLDS	VPLVAITGQA
AtAHASL	GVFAAEGYAR	SSGKPGICIA	TSGPGATNLV	SGLADALLDS	VPLVAITGQV

Figura 2 cont.

	201				250
SEQ ID NO:2	PRRMIGTDVVF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.1	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.2	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.4	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.6	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
ZmAHASL1	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVDDIPRVVQ	EAFFLASSGR
ZmAHASL2	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVDDIPRVVQ	EAFFLASSGR
OsAHASL2	PRRMIGTDAF	QETPIVEFTR	SITKHNYLIL	DVDDIPRVIN	EAFFLASTGR
AtAHASL	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVM	DVEDIPRIIE	EAFFLATSGR
	251				300
SEQ ID NO:2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
OsAHASL1.1	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
OsAHASL1.2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
OsAHASL1.4	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
OsAHASL1.6	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
ZmAHASL1	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPA	WDTPMSLPGY	IARLPKPPAT	EFLEQVLRLLV
ZmAHASL2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDKPMSLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRLLV
OsAHASL2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPS	WDAPMRLPGY	ISRLPKPPAA	NLLDEVIRLLV
AtAHASL	PGPVLVDVPK	DIQQQLAIPN	WEQAMRLPGY	MSRMPKPPED	SHLEQIVRLI
	301				350
SEQ ID NO:2	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.1	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.2	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.4	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRWFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.6	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRWFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
ZmAHASL1	GESRRPVLYV	GGGCAASGEE	LCRFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
ZmAHASL2	GESRRPVLYV	GGGCAASGEE	LRRFVELTGI	PVTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL2	GDAERPVLVY	GGGCSASGYE	LRRFVELTGI	PVTTTLMGIG	NFPSDDPLSL
AtAHASL	SESKKPVLYV	GGGCLNSSDE	LGRFVELTGI	PVASTLMGLG	SYPCDDELSL
	351				400
SEQ ID NO:2	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.1	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.2	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.4	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.6	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
ZmAHASL1	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	GRAKIVHIDI
ZmAHASL2	RMLGMHGTVY	ANYAVDKADL	LLALGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHVDI
OsAHASL2	RMLGMHGTVY	ANYAVDNADL	LLALGVRFDD	RVTGKVEAFA	SRAKIVHVDI
AtAHASL	HMLGMHGTVY	ANYAVEHSDL	LLAFGVRFDD	RVTGKLEAFA	SRAKIVHIDI

Figura 2 cont.

```

401
SEQ ID NO:2 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGLNALL D...QSTTKT SSDFSAWHNE 450
OsAHASL1.1 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGLNALL D...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.2 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGLNALL D...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.4 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGLNALL Q...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.6 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGLNALL Q...QSTTKT SSDFSAWHNE
ZmAHASL1 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGMNTLL E...GSTSKK SFDGFSWHDE
ZmAHASL2 DPAEIGKNKQ PHVSICADV LALQGMNALL E...GSTSKK SFDGFSWNDE
OsAHASL2 DPSELGKNKQ PHVSICADV LALQGMNAML EEQSAAAARK NLDFSARWSE
AtAHASL DSAEIGKNKT PHVSVCGDV LALQGMNKVL E...NRAEEL KLDFGVWRNE

451
SEQ ID NO:2 LDQQKREFPL GYKTFGEEIP PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA 500
OsAHASL1.1 LDQQKREFPL GYKTFGEEIP PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
OsAHASL1.2 LDQQKREFPL GYKTFGEEIP PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
OsAHASL1.4 LDQQKREFPL GYKTFGEEIP PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
OsAHASL1.6 LDQQKREFPL GYKTFGEEIP PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
ZmAHASL1 LDQQKREFPL GYKIFNEEIQ PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
ZmAHASL2 LDQQKREFPL GYKTSNEEIQ PQYAIQVLDE LTKGEAIIAT GVGQHQMWWAA
OsAHASL2 LEKKKVEFPL GYRTFGEEIP PQYAIQVLDE VTNGEAIVAT GVGQHQMWWAT
AtAHASL LNVQKQKFPL SFKTFGEAIP PQYAIKVLDE LTDGKAIIST GVGQHQMWWAA

501
SEQ ID NO:2 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM 550
OsAHASL1.1 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.2 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.4 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.6 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
ZmAHASL1 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA AVANPGVTVV DIDGDGSFLM
ZmAHASL2 QYYTYKRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL2 QHYTYRRPRQ WLSSAGLGAM GFGLPAAAGA AVANPGATVV DIDGDGSLLM
AtAHASL QFYNYKKPRQ WLSSGGLGAM GFGLPAAIGA SVANPDAIVV DIDGDGSFIM

551
SEQ ID NO:2 NIQELALIRI ENLPVKVMVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNP.. 600
OsAHASL1.1 NIQELALIRI ENLPVKVMVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.2 NIQELALIRI ENLPVKVMVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.4 NIQELALIRI ENLPVKVMVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.6 NIQELALIRI ENLPVKVMVL NNQHLGMVVQ LEDRFYKANR AHTYLGNP..
ZmAHASL1 NIQELAMIRI ENLPVKVFVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTFLGNP..
ZmAHASL2 NVQELAMIRI ENLPVKVFVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL2 NIQELAMVRV EDLPVKVMVL NNQHLGMVVQ WEDRFYKANR AHTYLGNPAA
AtAHASL NVQELATIRV ENLPVKVLLL NNQHLGMVMQ WEDRFYKANR AHTFLGDP..

```

Figura 2 cont.

	601		650
SEQ ID NO:2	ECSESIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.1	ECSESIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.2	ECSESIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.4	ECSESIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.6	ECSESIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
ZmAHASL1	ENESEIYPDF	VAIAKGFNIP	AVRVTKKSEV HAAIKKMLET PGPYLLDIIV
ZmAHASL2	ENESEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLET PGPYLLDIIV
OsAHASL2	NGGGEVYPDF	VTIAGGFGIP	AARVTRKGEV RAAVEEMMAA PGPYLLDVVV
AtAHASL	AQEDEIFPNM	LLFAAACGIP	AARVTKKADL REAIQTMLDT PGPYLLDVIC
	651		700
SEQ ID NO:2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.1	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.4	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.6	PHQEHVLPMI	PIGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
ZmAHASL1	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
ZmAHASL2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL2	PHQEHVLPMI	PSNGAFKDII	VDGDGRSSY.
AtAHASL	PHQEHVLPMI	PSGGTFNDVI	TEGDGRIKY.

RESUMO

“PLANTA, SEMENTE DA PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR
ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA,
MOLÉCULA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, CASSETE DE
5 EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA NÃO HUMANA, VETOR DE
TRANSFORMAÇÃO, SEMENTE TRANSFORMADA, CÉLULA
VEGETAL TRANSFORMADA, MÉTODOS PARA AUMENTAR
ATIVIDADE DE AHAS RESISTENTE A HERBICIDA EM UMA
PLANTA, PARA PRODUZIR UMA PLANTA RESISTENTE A
10 HERBICIDA, PARA AUMENTAR TOLERÂNCIA A HERBICIDA EM
UMA PLANTA, E PARA SELECIONAR PARA UMA CÉLULA
VEGETAL TRANSFORMADA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, E,
MÉTODOS PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA A HERBICIDA DE
UMA PLANTA, E PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA”

15 Plantas de arroz resistentes a herbicida, polinucleotídeos
isolados que codificam polipeptídeos de subunidade grande 1 de
acetohidroxiácido sintase (AHASL1), e as seqüências de aminoácidos destes
polipeptídeos, são descritos. Cassetes de expressão e vetores de transformação
compreendendo os polinucleotídeos da invenção, assim como plantas e
20 células hospedeiras transformadas com os polinucleotídeos, são descritas.
Métodos de usar os polinucleotídeo para aumentar a resistência de plantas a
herbicidas de imidazolinona, e métodos para controlar ervas daninhas na
vizinhança de plantas resistentes a herbicida também são descritos.