

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 867**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06785932 .2**
96 Fecha de presentación: **29.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1902136**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Plantas de girasol resistentes a herbicidas, polinucleótidos que codifican proteínas correspondientes a la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa resistentes a herbicidas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:
01.07.2005 US 695952 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2012

73 Titular/es:
**BASF SE
67056 LUDWIGSHAFEN, DE
NIDERA S.A.**

72 Inventor/es:
**SALA, Carlos, Alberto;
ECHARTE, Adriana, Mariel;
BULOS, Mariano;
WHITT, Sherry, R. y
ASCENZI, Robert**

74 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

ES 2 380 867 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de girasol resistentes a herbicidas, polinucleótidos que codifican proteínas correspondientes a la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa resistentes a herbicidas y procedimientos de uso.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Esta invención se refiere al campo de la biotecnología agrícola, en particular a plantas de girasol resistentes a herbicidas y a nuevas secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas correspondientes a la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa de girasol naturales y resistentes a herbicidas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La acetohidroxiácido-sintasa (AHAS; EC 4.1.3.18, también conocida como acetolactato-sintasa o ALS) es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", en *Plant Amino Acid*, Singh, B. K., ed., Marcel Dekker Inc. Nueva York, Nueva York, EE. UU., págs. 227-247). La AHAS es el sitio de acción de cinco familias de herbicidas estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (Tan y col. (2005) *Pest Manag. Sci.* 61:246-57; Mallory-Smith y Retzinger (2003) *Weed Technology* 17:620-626; LaRossa y Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner y col. (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian y Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines", en *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J. R. y Sonnet, P. E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D. C., págs. 277-288), los pirimidiniloxibenzoatos (Subramanian y col. (1990) *Plant Physiol.* 94:239-244) y las sulfonilaminocarboniltriasolinonas (Tan y col. (2005) *Pest Manag. Sci.* 61:246-57; Mallory-Smith y Retzinger (2003) *Weed Technology* 17:620-626). Los herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea se usan ampliamente en la agricultura moderna debido a su eficacia a dosis de aplicación muy bajas y a su relativa falta de toxicidad para los animales. Al inhibir la actividad de la AHAS, estas familias de herbicidas impiden el crecimiento y desarrollo posterior de las plantas susceptibles, incluidas muchas especies de malas hierbas. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona disponibles comercialmente son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquín) y ARSENAL® (imazapir). Algunos ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorsulfurón, metsulfurón-metilo, sulfometurón-metilo, clorimurón-etilo, tifensulfurón-metilo, tribenurón-metilo, bensulfurón-metilo, nicosulfurón, etametsulfurón-metilo, rimsulfurón, triflusulfurón-metilo, triasulfurón, primisulfurón-metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, flazasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón-etilo y halosulfurón.

- 30 Debido a su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se prefieren para aplicación mediante pulverización por encima de una amplia área de vegetación. La capacidad de pulverizar un herbicida por encima de una amplia área de vegetación disminuye los costes asociados con el establecimiento y mantenimiento del cultivo y disminuye la necesidad de la preparación del sitio antes del uso de estos compuestos químicos. La pulverización por encima de una especie tolerante deseada también resulta en la capacidad de conseguir el máximo potencial de rendimiento de la especie deseada debido a la ausencia de especies competidoras. Sin embargo, la capacidad de usar estas técnicas de pulverización por encima depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada en el área de la pulverización.

- 40 Entre los principales cultivos agrícolas, algunas especies leguminosas como la soja son naturalmente resistentes a los herbicidas de imidazolinona, debido a su capacidad de metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner y Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471). Otros cultivos como el maíz (Newhouse y col. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) y arroz (Barret y col. (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, Nueva York, EE. UU., págs. 195-220) son ligeramente susceptibles a los herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona depende de la naturaleza química del herbicida concreto y del metabolismo diferencial del compuesto desde una forma tóxica a una forma no tóxica en cada planta (Shaner y col. (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546; Brown y col. (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* 27:24-29). Otras diferencias relativas a la fisiología de la planta, como la absorción y la translocación, pueden desempeñar también un papel importante en la sensibilidad (Shaner y Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

- 50 Se han producido con éxito plantas resistentes a imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas y pirimidiniloxibenzoatos mediante mutagénesis de semillas, microsporas, polen y callo en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (es decir, colza), *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y *Oryza sativa* (Sebastian y col. (1989) *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson y col. (1989) *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse y col. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan y col. (1991) *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand y col. (1993) *J. Heredity* 84:91-96; Wright y Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620; patente de los EE. UU. n° 5.545.822). En todos los casos, la resistencia se debió a un único gen nuclear parcialmente dominante. Previamente también se habían aislado cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona después de la mutagénesis de semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse y col. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Los estudios de heredabilidad confirmaron que la resistencia se debía a un único gen parcialmente dominante. Sobre la base de estudios alélicos, los autores concluyeron que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas se localizaban en el mismo locus. Uno de los genes de resistencia del cultivar Fidel se designó FS-4 (Newhouse y col. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886).

- 60 Las poblaciones de plantas de origen natural de las que se ha descubierto que son resistentes a herbicidas de imidazolinona y/o sulfonilurea también se han usado para el desarrollo de líneas de mejora de girasol resistentes a herbicidas. Recientemente se han desarrollado dos líneas de girasol resistentes a un herbicida de sulfonilurea mediante el uso de germoplasma originario de una población silvestre de girasol común (*Helianthus annuus*) como fuente del carácter de resistencia al herbicida (Miller y Al-Khatib (2004) *Crop Sci.* 44:1037-1038). Previamente, White y col. ((2002) *Weed Sci.* 50:432-437) habían descrito que algunos individuos de una población silvestre de girasol común de Dakota del Sur (EE. UU.) presentaban resistencia cruzada a un herbicida de imidazolinona y un herbicida de sulfonilurea. El análisis de una porción de la región codificante de los genes de la subunidad mayor de la

5 acetohidroxiácido-sintasa (AHASL) de individuos de esta población reveló una mutación puntual que resultaba en una sustitución del aminoácido Ala por Val en la proteína AHASL de girasol, que corresponde a Ala₂₀₅ en la proteína AHASL natural de *Arabidopsis thaliana* (White y col. (2003) *Weed Sci.* 51:845-853). Previamente, Al-Khatib y Miller (2000) *Crop Sci.* 40:869) describieron la producción de cuatro líneas de mejora de girasol resistentes a imidazolinona.

10 El modelado por ordenador de la conformación tridimensional del complejo inhibidor de la AHAS predice varios aminoácidos en la cavidad propuesta de unión del inhibidor como sitios en los que la inducción de mutaciones probablemente confiera resistencia selectiva a imidazolinonas (Ott y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368). De hecho, las plantas de tabaco producidas con algunas de estas mutaciones diseñadas racionalmente en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS han mostrado resistencia específica a una única clase de herbicidas (Ott y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368).

15 También se ha descrito la resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona en numerosas patentes. Las patentes de los EE. UU. n^{os} 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 y 6.222.100 describen en general el uso de un gen modificado de AHAS para producir resistencia a herbicidas en plantas y desvelan específicamente ciertas líneas de maíz resistentes a imidazolinona. La patente de los EE. UU. n^o 5.013.659 desvela plantas que muestran resistencia a herbicidas debido a mutaciones en al menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas en ese documento codifican resistencia cruzada para imidazolinonas y sulfonilureas o resistencia específica a sulfonilurea, pero no se describe una resistencia específica a imidazolinona. Las patentes de los EE. UU. n^o 5.731.180 y n^o 5.767.361 discuten un gen aislado que tiene una sustitución de un único aminoácido en una secuencia aminoacídica de una AHAS de monocotiledónea natural que resulta en resistencia específica a imidazolinona. Además, se han desarrollado plantas de arroz que son resistentes a herbicidas que interfieren con la AHAS por mejora por mutación y también por la selección de plantas resistentes a herbicidas de entre un conjunto de plantas de arroz producidas por cultivo de anteras. Véanse las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.545.822, 5.736.629, 5.773.703, 5.773.704, 5.952.553 y 6.274.796. El documento US 2003/0097692 describe plantas con una ALS resistente a imidazolinona y el documento 2005/020673 describe plantas de arroz que presentan un aumento de la tolerancia a herbicidas de imidazolinona.

25 En las plantas, al igual que en todos los demás organismos examinados, la enzima AHAS está formada por dos subunidades: una subunidad mayor (papel catalítico) y una subunidad menor (papel regulador) (Duggleby y Pang (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:1-36). La subunidad mayor de la AHAS (también denominada AHASL en este documento) puede estar codificada por un único gen como en el caso de *Arabidopsis* y remolacha azucarera o por múltiples miembros de una familia génica como en maíz, colza y algodón. Las sustituciones específicas de un único aminoácido en la subunidad mayor confieren a la enzima un grado de insensibilidad a una o más clases de herbicidas (Chang y Duggleby (1998) *Biochem J.* 333:765-777).

30 Por ejemplo, el trigo panadero, *Triticum aestivum* L., contiene tres genes homeólogos de la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa. Cada uno de los genes muestra una expresión significativa, según los datos bioquímicos y de la respuesta a herbicidas de mutantes en cada uno de los tres genes (Ascenzi y col. (2003) Congreso de la *International Society of Plant Molecular Biologists*, Barcelona, España, n^o de ref. S10-17). Las secuencias codificantes de los tres genes presentan gran homología en cuanto a nucleótidos (documento WO 03/014357). Mediante la secuenciación de los genes AHASL de varias variedades de *Triticum aestivum* se encontró que la base molecular de la tolerancia a herbicidas en la mayoría de las líneas tolerantes a IMI (tolerantes a imidazolinona) era la mutación S653(A)N, que indica una sustitución de serina por asparragina en una posición equivalente a la serina del aminoácido 653 en *Arabidopsis thaliana* (documentos WO 03/01436; WO 03/014357). Esta mutación se debe a un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en la secuencia de ADN que codifica la proteína AHASL.

35 También se sabe que hay genes AHASL múltiples en especies de plantas dicotiledóneas. Recientemente, Kolkman y col. ((2004) *Theor. Appl. Genet.* 109:1147-1159) describieron la identificación, clonación y secuenciación de tres genes AHASL (AHASL1, AHASL2 y AHASL3) de genotipos resistentes a herbicidas y naturales de girasol (*Helianthus annuus* L.). Kolkman y col. describieron que la resistencia a herbicidas era debida a la sustitución Pro197Leu (usando la nomenclatura de las posiciones de los aminoácidos de la AHASL de *Arabidopsis*) o a la sustitución Ala205Val en la proteína AHASL1 y que cada una de estas sustituciones proporcionaba resistencia a herbicidas tanto de imidazolinona como de sulfonilurea.

45 Dada su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se prefieren para el uso agrícola. Sin embargo, la posibilidad de usar herbicidas de imidazolinona en un sistema de producción de un cultivo en particular depende de la disponibilidad de variedades resistentes a imidazolinona de la planta cultivada de interés. Para producir tales variedades resistentes a imidazolinona, los mejoradores de plantas necesitan desarrollar líneas de mejora con el carácter de resistencia a imidazolinona. Por lo tanto, se necesitan más líneas y variedades de mejora de plantas de cultivo resistentes a imidazolinona, así como procedimientos y composiciones para la producción y el uso de líneas y variedades de mejora resistentes a imidazolinona.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

60 La presente invención proporciona plantas de girasol que presentan un aumento de la resistencia a herbicidas en comparación con una planta de girasol natural, de acuerdo con las reivindicaciones. En particular, las plantas de girasol de la invención presentan un aumento de la resistencia a herbicidas de imidazolinona en comparación con una planta de girasol natural. Las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la invención comprenden al menos una copia de al menos un gen o polinucleótido endógeno que codifica una subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa (AHASL) resistente a herbicidas. Una proteína AHASL resistente a herbicidas semejante comprende una treonina en la posición del aminoácido 107 o en una posición equivalente. Una planta de girasol resistente a herbicidas de la invención puede contener una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más copias de un gen o polinucleótido que codifica una proteína AHASL resistente a herbicidas de la invención. Las plantas de girasol

de la invención incluyen también las semillas y las plantas de la progenie que comprenden al menos una copia de al menos un gen o polinucleótido endógeno que codifica una proteína AHASL resistente a herbicidas de la invención.

En una realización, la presente invención proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas o una línea de girasol que se denomina S4897 en este documento y la progenie y derivados de esta que comprenden las características de resistencia a herbicidas de S4897. Una línea genética denominada GM40 en este documento se ha derivado de S4897 y presenta las características de resistencia a herbicidas de esta. Una muestra de semillas de la línea GM40 se ha depositado en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) como el depósito de patente ATCC con el número PTA-6716. Por lo tanto, una planta de girasol de la invención que comprende las características de resistencia a herbicidas de GM40 o una planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 también comprenden las características de resistencia a herbicidas de S4897. Las plantas de girasol S4897, las plantas de girasol GM40 y las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 y la progenie y derivados de estas que comprenden las características de resistencia a herbicidas de S4897, GM40 o de una planta de girasol con el número de depósito de patente PTA-6716 comprenden en sus genomas un gen *AHASL1* que comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 1 y que codifica la proteína AHASL1 que comprende la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 2. Al compararla con la secuencia aminoacídica de la proteína AHASL1 (SEQ ID NO: 4) que está codificada por un gen *AHASL1* (SEQ ID NO: 3) de una planta de girasol natural, la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 2 tiene un único aminoácido diferente respecto a la secuencia aminoacídica natural. En la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 2 hay una treonina en la posición del aminoácido 7. Esta posición corresponde a la posición 107 en la proteína AHASL1 de girasol de longitud completa codificada por la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 (número de acceso AY541451). En la secuencia aminoacídica de la AHASL1 natural de la invención (SEQ ID NO: 4), esta posición equivalente presenta una alanina. A menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácidos a las que se hace referencia en este documento para las proteínas AHASL de girasol corresponden a las posiciones de aminoácidos de la secuencia aminoacídica completa expuesta en SEQ ID NO: 12.

En otra realización, la presente invención proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas que son la línea de girasol que se denomina GM1606 en este documento. Una muestra de semillas del material genético de GM1606 se ha depositado en la ATCC como el depósito de patente ATCC con el número PTA-7606. Por lo tanto, la presente invención proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 y la progenie y derivados de estas que comprenden las características de resistencia a herbicidas de las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606. Al igual que las plantas de girasol S4897 y GM40, GM1606 y la progenie y derivados de esta que comprenden las características de resistencia a herbicidas de GM1606 comprenden en sus genomas un gen *AHASL1* que codifica una proteína AHASL1 que comprende una treonina en la posición 107 de la proteína AHASL1 de girasol de longitud completa. De manera similar, las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 y la progenie y derivados de estas que comprenden las características de resistencia a herbicidas las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 comprenden en sus genomas un gen *AHASL1* que codifica una proteína AHASL1 que comprende una treonina en la posición 107 de la proteína AHASL1 de girasol de longitud completa.

La presente memoria descriptiva proporciona además polinucleótidos aislados y polipéptidos aislados para las proteínas AHASL de girasol (*Helianthus annuus*). Los polinucleótidos descritos en este documento abarcan secuencias nucleotídicas que codifican proteínas AHASL resistentes a herbicidas y naturales que incluyen, pero no se limitan a proteínas codificadas por los genes *AHASL1*, *AHASL2* y *AHASL3*. Las proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas que se describen en este documento son proteínas AHASL resistentes a imidazolinona que comprenden un aminoácido distinto de alanina en la posición 107 de una proteína AHASL1 de girasol de longitud completa o en una posición equivalente. Preferentemente, el aminoácido en la posición 107 o en una posición equivalente es treonina. Los polinucleótidos descritos en este documento abarcan las secuencias nucleotídicas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3, las secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias aminoacídicas expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de dichas secuencias nucleotídicas que codifican proteínas con actividad AHAS.

La presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la tolerancia a herbicidas en una planta tolerante a herbicidas. El procedimiento es útil para aumentar la resistencia de una planta que ya es resistente a una concentración de un herbicida que destruiría o lesionaría significativamente a una planta natural. Una planta tolerante a herbicidas semejante es una planta tolerante a herbicidas desarrollada por procedimientos que no implican ADN recombinante como tal, por ejemplo, las plantas de girasol S4897, GM40 y GM1606 de la presente invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para el control de las malas hierbas en la proximidad de las plantas resistentes a herbicidas de la invención, incluidas las plantas de girasol resistentes a herbicidas descritas anteriormente.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas. Un ejemplo de una planta de girasol no transgénica que presenta un aumento de la resistencia a herbicidas de imidazolinona y/o sulfonilurea incluye las plantas de girasol S4897, GM40 o GM1606 y las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o PTA-7606; o un mutante, recombinante o derivado manipulado genéticamente de S4897, GM40 o GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o PTA-7606 o dos o más de S4897, GM40, GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 y la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606; o de cualquier descendiente de S4897, GM40 o GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o PTA-7606 o dos o más de S4897, GM40, GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 y la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606; o una planta de la progenie de cualquiera de estas plantas; o una planta que comprende las características de resistencia a herbicidas de S4897, GM40, GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 y/o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606.

La presente memoria descriptiva proporciona polipéptidos aislados que comprenden proteínas AHASL de girasol resistentes a imidazolinona y naturales. Los polipéptidos aislados comprenden las secuencias aminoacídicas expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y las secuencias aminoacídicas codificadas por las secuencias nucleotídicas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes de dichas secuencias aminoacídicas que codifican proteínas con actividad AHAS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *AHASL1* de girasol resistente a herbicidas (SEQ ID NO: 1), el gen *AHASL1* de girasol natural (SEQ ID NO: 3), el número de acceso de GenBank U16280 (SEQ ID NO: 5), el número de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 11) y el número de acceso de GenBank AY124092 (SEQ ID NO: 13). El sitio de la mutación en SEQ ID NO: 1 se indica por un asterisco. La mutación es una transición de G a A en la posición del nucleótido 21 de SEQ ID NO: 1.

La figura 2 es un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas (SEQ ID NO: 2), la proteína AHASL1 de girasol natural (SEQ ID NO: 4), el número de acceso de GenBank U16280 (SEQ ID NO: 6), el número de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 12) y el número de acceso de GenBank AY124092 (SEQ ID NO: 14). El asterisco indica el sitio de la sustitución de un único aminoácido (Ala por Thr) encontrada en la proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas. Este sitio de la sustitución corresponde a la posición del aminoácido 7 en la secuencia aminoacídica parcial de AHASL1 expuesta en SEQ ID NO: 2. La posición equivalente de esta sustitución en la secuencia aminoacídica completa de AHASL1 de girasol expuesta en SEQ ID NO: 12 es la 107.

La figura 3 es una ilustración fotográfica que demuestra el aumento de la tolerancia a herbicidas de las plantas de girasol S4897 (a la derecha) en comparación con las plantas de girasol tolerantes a herbicidas IMISUN-1 (Al-Khatib y Miller (2000) *Crop Sci.* 40:869-970) en un estudio de invernadero. Las plantas de girasol S4897 e IMISUN-1 se trataron por pulverización con imazamox en una dosis de 200 g p.a./ha. Las plantas de girasol naturales de control no sobrevivieron después del tratamiento por pulverización con imazamox en una dosis de 100 ó 200 g p.a./ha (no se muestra). La fotografía se tomó unos días después del tratamiento de las plantas por pulverización.

La figura 4 es una ilustración gráfica del daño por herbicidas en un estudio de invernadero después del tratamiento por pulverización de plantas de girasol IMISUN-1, de tipo natural y S4897 con imazamox en dosis de 100 (columnas claras) o 200 g p.a./ha (columnas oscuras). Esta figura demuestra que las plantas de girasol resistentes a herbicidas S4897 tienen una resistencia o tolerancia significativamente superior a dos dosis de imazamox en comparación con las plantas resistentes a herbicidas IMISUN-1 y las plantas naturales. El daño por herbicidas se evaluó 17 días después de la aplicación de imazamox. Se sabe que las plantas IMISUN-1 tienen una sustitución de alanina por valina en el aminoácido 190 (Kolkman y col. (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109:1147-1159).

La figura 5 es una ilustración fotográfica que demuestra el aumento de la tolerancia a herbicidas de las plantas de girasol S4897 (lado derecho) en comparación con las plantas de girasol tolerantes a herbicidas IMISUN-1 en el ensayo de invernadero descrito en el ejemplo 4.

La figura 6 es una ilustración fotográfica que demuestra el aumento de la tolerancia a herbicidas de las plantas de girasol S4897 en comparación con las plantas de girasol de la variedad Clearfield® A en el ensayo de invernadero descrito en el ejemplo 5.

La figura 7 es la ilustración gráfica de una comparación de la inhibición de la AHAS por Raptor para plantas de girasol de una variedad distinta de Clearfield, una variedad Clearfield y S4897, según se describe en el ejemplo 5.

La figura 8 es la ilustración gráfica de una comparación de la inhibición de la AHAS por Glean para plantas de girasol de una variedad distinta de Clearfield, una variedad Clearfield y S4897, según se describe en el ejemplo 5.

La figura 9 es una ilustración gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre la altura de la planta a los 14 días después del tratamiento para dos mutantes de girasol. La altura media (% de las parcelas no tratadas) se representa por cuadrados y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 10 es una ilustración gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre el índice de fitotoxicidad (PI) a los 14 días después del tratamiento para dos mutantes de girasol. El PI medio se representa por cuadrados y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 11 es una ilustración gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre la acumulación de biomasa a los 14 días después del tratamiento para dos mutantes de girasol. La biomasa seca media (% de las parcelas no tratadas) se representa por cuadrados y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 12 es una ilustración gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre la biomasa de raíces a los 14 días después del tratamiento para dos mutantes de girasol. La masa seca de raíces media (% de las parcelas no tratadas) se representa por cuadrados y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas indicadas en el listado adjunto se muestran con las abreviaturas estándar de una letra para las bases nucleotídicas y el código de tres letras para los aminoácidos. Las secuencias nucleotídicas satisfacen la convención estándar de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y proceder hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hacia el extremo 3'. Solo se muestra una

hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra representada. Las secuencias aminoacídicas satisfacen la convención de comenzar en el extremo amino de la secuencia y proceder hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hacia el extremo carboxilo.

5 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia nucleotídica parcial que codifica una proteína AHASL1 resistente a herbicidas de la línea de girasol S4897.

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia aminoacídica parcial de la proteína AHASL1 resistente a herbicidas codificada por la secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 1.

10 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia nucleotídica parcial que codifica la proteína AHASL1 natural de la línea de girasol BTK47.

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia aminoacídica parcial de la proteína AHASL1 natural codificada por la secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia nucleotídica de número de acceso de GenBank U16280.

15 SEQ ID NO: 6 es la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica del número de acceso de GenBank U16280.

SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia nucleotídica del cebador HA1U409 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia nucleotídica del cebador HA1L1379 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia nucleotídica del cebador HA1U1313 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia nucleotídica del cebador HA1L2131 descrito en el ejemplo 2.

20 SEQ ID NO: 11 es la secuencia nucleotídica del número de acceso de GenBank AY541451.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica del número de acceso de GenBank AY541451.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia nucleotídica del número de acceso de GenBank AY124092.

25 SEQ ID NO: 14 es la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica del número de acceso de GenBank AY124092.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

30 La presente invención se refiere a plantas de girasol que presentan un aumento de la resistencia a herbicidas en comparación con una planta de girasol natural de acuerdo con las reivindicaciones. Las plantas de girasol resistentes a herbicidas se produjeron según se describe más adelante en este documento exponiendo las plantas de girasol naturales (con respecto a la resistencia a herbicidas) a un mutágeno, dejándolas madurar y reproducirse y seleccionando las plantas de la progenie que mostraban un aumento de la resistencia a un herbicida de imidazolinona, en relación a la resistencia de una planta de girasol natural. La invención proporciona las líneas de girasol resistentes a herbicidas que en este documento se denominan S4897, GM40 y GM1606.

35 A partir de las plantas de girasol resistentes a herbicidas S4897 y de las plantas de girasol naturales BTK47 se aisló la región codificante de un gen de la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa (denominado AHASL1) mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la comparación de las secuencias polinucleotídicas de las plantas de girasol resistentes a herbicidas y naturales se descubrió que la región codificante de la secuencia polinucleotídica de AHASL1 de la planta de girasol resistente a herbicidas difería de la secuencia polinucleotídica de AHASL1 de la planta natural en un único nucleótido, una transición de G a A en el nucleótido 21 (SEQ ID NO: 1). Esta transición de G a A en la secuencia polinucleotídica de AHASL1 resulta en una sustitución de alanina por treonina en el aminoácido 7 (SEQ ID NO: 2) en una región conservada de la secuencia aminoacídica predicha para la proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas (SEQ ID NO: 2), en relación con la posición aminoacídica equivalente de la proteína AHASL1 natural de la línea de girasol BTK47 (es decir, el aminoácido 7 de SEQ ID NO: 4).

45 Dado que la secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 1 no corresponde a la región codificante completa de una proteína AHASL, la secuencia aminoacídica codificada por esta que se expone en SEQ ID NO: 2 tampoco está completa. Para facilitar la comparación con otras secuencias aminoacídicas de AHASL de girasol, las posiciones de aminoácidos de las proteínas AHASL de girasol a las que se hace referencia en este documento corresponden a las posiciones de aminoácidos de la secuencia aminoacídica completa de la proteína AHASL1 de girasol codificada por la secuencia con el número de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 12), a menos que se indique lo contrario o resulte evidente del contexto en que aparecen dichas posiciones. Por consiguiente, la sustitución de alanina por treonina en la posición del aminoácido 7 de SEQ ID NO: 2 corresponde a la posición del aminoácido 107 en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 12.

55 Por lo tanto, la presente invención desvela una sustitución aminoacídica que puede usarse para producir proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas, los polinucleótidos que codifican tales proteínas y plantas, tejidos de plantas, células de plantas y semillas resistentes a herbicidas. Dado que la alanina que se encuentra en la posición del aminoácido 107 en las proteínas AHASL1 naturales de girasol de longitud completa o en una posición equivalente está dentro de una región de aminoácidos que está conservada en diferentes especies de plantas, se

espera que la sustitución con otro aminoácido, preferentemente treonina, en lugar de esta misma alanina conservada en otras proteínas AHASL de girasol (p. ej. AHASL2 y AHASL3) también confiera resistencia a herbicidas. Por lo tanto, un polinucleótido que codifica una proteína AHASL de girasol puede mutarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, como por ejemplo, mutagénesis dirigida, para producir un polinucleótido de girasol que codifique una proteína AHASL con una treonina en la posición 107 o en una posición equivalente. Las secuencias polinucleotídicas y las secuencias aminoacídicas codificadas por estas correspondientes a los genes *AHASL1*, *AHASL2* y *AHASL3* se exponen en los números de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 11 y 12), AY541452, AY541453, AY541454, AY541455, AY541456, AY541457 y AY541458. Por consiguiente, tales polinucleótidos y las proteínas AHASL resistentes a herbicidas codificadas por estos son útiles para la producción de plantas, células de plantas, tejidos de plantas y semillas resistentes a herbicidas por los procedimientos desvelados en este documento.

La presente invención abarca adicionalmente polinucleótidos aislados *AHASL1* y *AHASL2* de girasol que codifican las proteínas AHASL1 y AHASL2 resistentes a herbicidas, respectivamente. Cada una de estas proteínas AHASL1 y AHASL2 resistentes a herbicidas comprende un aminoácido distinto de alanina en la posición 107 o en una posición equivalente. Preferentemente, en tales proteínas AHASL1 y AHASL2 resistentes a herbicidas, el aminoácido en la posición 107 o en una posición equivalente es treonina.

La memoria descriptiva se refiere además a moléculas polinucleotídicas aisladas que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican proteínas correspondientes a la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa (AHASL) y a tales proteínas AHASL. La memoria descriptiva desvela el aislamiento y la secuencia nucleotídica de un polinucleótido que codifica una proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas a partir de una planta de girasol resistente a herbicidas producida por mutagénesis química de plantas de girasol naturales. Las proteínas AHASL1 de girasol resistentes a herbicidas de la invención presentan una sustitución de alanina por treonina en la posición 107 o en una posición equivalente de sus secuencias aminoacídicas respectivas, en comparación con la secuencia aminoacídica natural correspondiente. La memoria descriptiva desvela además el aislamiento y la secuencia nucleotídica de una molécula polinucleotídica que codifica una proteína AHASL1 de girasol natural.

La presente memoria descriptiva proporciona moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican proteínas AHASL de girasol (*Helianthus annuus* L.). Específicamente, la memoria descriptiva proporciona moléculas polinucleotídicas aisladas que comprenden: las secuencias nucleotídicas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3, las secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas AHASL que comprenden las secuencias aminoacídicas expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de tales secuencias nucleotídicas que codifican proteínas AHASL funcionales.

Las moléculas polinucleotídicas AHASL resistentes a herbicidas aisladas de la memoria descriptiva comprenden secuencias nucleotídicas que codifican proteínas AHASL resistentes a herbicidas. Tales moléculas polinucleotídicas pueden usarse en construcciones polinucleotídicas para la transformación de plantas, en particular plantas de cultivo, para aumentar la resistencia de las plantas a herbicidas, en particular a herbicidas de los que se sabe que inhiben la actividad AHAS, más en particular, a herbicidas de imidazolinona. Tales construcciones polinucleotídicas pueden usarse en casetes de expresión, vectores de expresión, vectores de transformación, plásmidos y similares. Las plantas transgénicas obtenidas después de la transformación con tales construcciones polinucleotídicas muestran un aumento de la resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS como, por ejemplo, herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea.

Las composiciones de la memoria descriptiva incluyen secuencias nucleotídicas que codifican proteínas AHASL. En particular, la presente memoria descriptiva proporciona moléculas polinucleotídicas aisladas que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias aminoacídicas mostradas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de estas que codifican polipéptidos que comprenden actividad AHAS. Además se proporcionan polipéptidos con una secuencia aminoacídica codificada por una molécula polinucleotídica descrita en este documento, por ejemplo, aquellas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes de estas que codifican polipéptidos que comprenden actividad AHAS.

La memoria descriptiva abarca composiciones aisladas o sustancialmente purificadas de ácido nucleico o proteína. Una molécula polinucleotídica o proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de esta no contiene sustancialmente o esencialmente componentes que normalmente acompañan o interaccionan con la molécula polinucleotídica o proteína, tal como se encuentran en su entorno natural. Por lo tanto, una molécula polinucleotídica o proteína aislada o purificada no contiene sustancialmente otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes o no contiene sustancialmente precursores químicos ni otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. Preferentemente, un ácido nucleico "aislado" no contiene secuencias (preferentemente secuencias codificantes de proteínas) que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula polinucleotídica aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de las secuencias nucleotídicas que flanquean naturalmente a la molécula polinucleotídica en el ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. Una proteína que no contiene sustancialmente material celular incluye preparaciones de proteína con menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, el 5% o el 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención o una porción biológicamente activa de esta se produce recombinantemente, preferentemente el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, el 5% o el 1% (en peso seco) de precursores químicos o de compuestos químicos distintos de la proteína de interés.

La presente memoria descriptiva proporciona polipéptidos aislados que comprenden proteínas AHASL. Los polipéptidos aislados comprenden una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consta de las secuencias aminoacídicas expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4, las secuencias aminoacídicas codificadas por las secuencias nucleotídicas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes funcionales de dichas secuencias

aminoacídicas que codifican un polipéptido AHASL que comprende actividad AHAS. Con “fragmentos y variantes funcionales” se pretende indicar fragmentos y variantes de los polipéptidos de ejemplo que comprenden actividad AHAS.

5 En ciertas realizaciones de la invención, los procedimientos implican el uso de plantas tolerantes a herbicidas o resistentes a herbicidas. Con una planta “tolerante a herbicidas” o “resistente a herbicidas” se pretende indicar una planta que es tolerante o resistente a al menos un herbicida a una concentración que normalmente destruiría o inhibiría el crecimiento de una planta normal o natural. En una realización de la invención, las plantas tolerantes a herbicidas de la invención comprenden una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Con “proteína AHASL tolerante a herbicidas” o “proteína AHASL resistente a herbicidas” se pretende
10 indicar que una proteína AHASL tal muestra mayor actividad AHAS respecto a la actividad AHAS de una proteína AHASL natural, en presencia de al menos un herbicida del que se sabe que interfiere con la actividad AHAS a una concentración o nivel del herbicida de los que se sabe que inhiben la actividad AHAS de la proteína AHASL natural. Además, la actividad AHAS de una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas semejante puede denominarse en este documento como actividad AHAS “tolerante a herbicidas” o “resistente a herbicidas”.

15 Para la presente invención, los términos “tolerante a herbicidas” y “resistente a herbicidas” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. De manera similar, los términos “tolerancia a herbicidas” y “resistencia a herbicidas” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. Igualmente, los términos “resistente a imidazolinona” y “resistencia a imidazolinona” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un
20 significado equivalente y un alcance equivalente a los términos “tolerante a imidazolinona” y “tolerancia a imidazolinona”, respectivamente.

La memoria descriptiva abarca polinucleótidos AHASL resistentes a herbicidas y proteínas AHASL resistentes a herbicidas. Con “polinucleótido AHASL resistente a herbicidas” se pretende indicar un polinucleótido que codifica una proteína que comprende actividad AHAS resistente a herbicidas. Con “proteína AHASL resistente a herbicidas” se pretende indicar una proteína o polipéptido que comprende actividad AHAS resistente a herbicidas.
25

Además, se reconoce que una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas puede introducirse en una planta mediante la transformación de una planta o de un antecesor de esta con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Tales proteínas AHASL tolerantes a herbicidas o resistentes a herbicidas están codificadas por los polinucleótidos AHASL tolerantes a herbicidas o resistentes a herbicidas. Alternativamente, una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas puede producirse en una planta como resultado de una mutación de origen natural o inducida en un gen AHASL endógeno en el genoma de una planta o de un progenitor de esta.
30

La presente invención proporciona plantas, tejidos de plantas, células de plantas y células huésped que presentan un aumento de la resistencia o la tolerancia a al menos un herbicida, en particular a un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea. La cantidad o concentración preferida del herbicida es una “cantidad eficaz” o una “concentración eficaz”. Con “cantidad eficaz” y “concentración eficaz” se pretende indicar una cantidad y concentración, respectivamente, que es suficiente para destruir o inhibir el crecimiento de una planta, tejido de una planta, célula de una planta o célula huésped natural similar, pero esta cantidad no destruye o inhibe tan intensamente el crecimiento de las plantas, tejidos de plantas, células de plantas y células huésped resistentes a herbicidas de la presente invención. Típicamente, la cantidad eficaz de un herbicida es una cantidad que se usa rutinariamente en los sistemas de producción agrícola para destruir las malas hierbas de interés. Una cantidad tal es conocida por los expertos en la técnica.
35
40

Con “planta, tejido de una planta, célula de una planta o célula huésped natural similar” se pretende indicar una planta, tejido de una planta, célula de una planta o célula huésped, respectivamente, que carece de las características de resistencia a herbicidas y/o de un polinucleótido particular de la invención desvelado en este documento. Por lo tanto, el uso del término “natural” no pretende implicar que una planta, tejido de una planta, célula de una planta u otra célula huésped carece de ADN recombinante en su genoma y/o no tiene características de resistencia a herbicidas diferentes de las desveladas en este documento.
45

Según se usa en este documento, a menos que claramente se indique lo contrario, el término “planta” pretende indicar una planta en cualquiera en cualquier estado de desarrollo, así como cualquier parte o partes de una planta que pueden estar unidas a la planta entera intacta o separadas de esta. Tales partes de una planta incluyen, pero no se limitan a los órganos, tejidos y células de una planta. Algunos ejemplos de partes particulares de una planta incluyen un tallo, una hoja, una raíz, una inflorescencia, una flor, un flósculo, un fruto, un pedículo, un pedúnculo, un estambre, una antera, un estigma, un estilo, un ovario, un pétalo, un sépalo, un carpelo, un extremo de raíz, una cofia de raíz, un pelo radical, un pelo foliar, un pelo seminal, un grano de polen, una microspora, un cotiledón, un hipocotilo, un epicotilo, el xilema, floema, parénquima, endospermo, una célula acompañante, una célula oclusiva y cualquier otro órgano, tejido y célula conocidos de una planta. Además se reconoce que una semilla es una planta.
50
55

Las plantas de la presente invención incluyen tanto plantas no transgénicas como transgénicas. Con “plantas no transgénicas” se pretende indicar una planta que carece de ADN recombinante en su genoma. Con “planta transgénica” se pretende indicar una planta que comprende ADN recombinante en su genoma. Una planta transgénica semejante puede producirse por la introducción de ADN recombinante en el genoma de la planta. Cuando dicho ADN recombinante se incorpora en el genoma de la planta transgénica, la progenie de la planta puede comprender también el ADN recombinante. Una planta de la descendencia que comprende al menos una porción del ADN recombinante de al menos una planta transgénica progenitora también es una planta transgénica.
60
65

La presente invención proporciona la línea de girasol resistente a herbicidas que en este documento se denomina S4897 y la progenie y derivados de esta que comprenden las características de resistencia a herbicidas

de S4897. El 17 de mayo de 2005 se hizo un depósito de semillas de la línea de girasol GM40, que deriva de la línea S4897 de girasol y comprende las características de resistencia de S4897, en el Depósito de patentes de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Mansassas, VA 20110, EE. UU., al que le asignó el número de depósito de patente ATCC PTA-6716. El depósito de la línea GM40 de girasol se hizo por un plazo de al menos 30 años y de al menos cinco años tras la petición más reciente recibida por el ATCC para el suministro de una muestra del depósito. Adicionalmente, los solicitantes han cumplido con todos los requerimientos del Título 37 del C.F.R., 1.801-1.809, incluida la provisión de una indicación de la viabilidad de la muestra.

La presente invención proporciona además la línea de girasol resistente a herbicidas que en este documento se denomina GM1606. El 19 de mayo de 2006 se hizo un depósito de semillas de la línea de girasol GM1606 en el Depósito de patentes de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Mansassas, VA 20110, EE. UU., al que le asignó el número de depósito de patente ATCC PTA-7606. El depósito de la línea GM1606 de girasol se hizo por un plazo de al menos 30 años y de al menos cinco años tras la petición más reciente recibida por el ATCC para el suministro de una muestra del depósito. Adicionalmente, los solicitantes han cumplido con todos los requerimientos del Título 37 del C.F.R., 1.801-1.809, incluida la provisión de una indicación de la viabilidad de la muestra.

La presente invención proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas producidas por mejora genética por mutación. Las plantas de girasol naturales se mutagenizaron mediante exposición de las plantas a un mutágeno, en particular un mutágeno químico, más en particular metanosulfonato de etilo (EMS). Sin embargo, la presente invención no se limita a las plantas de girasol resistentes a herbicidas producidas por un procedimiento de mutagénesis que implica el mutágeno químico EMS. Cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica puede usarse para producir las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la presente invención. Tales procedimientos de mutagénesis pueden implicar, por ejemplo, el uso de uno o más de los mutágenos siguientes: radiación, como rayos X, rayos γ (p. ej., cobalto 60 o cesio 137), neutrones (p. ej., producto de la fisión nuclear de uranio 235 en un reactor atómico), radiación β (p. ej., emitida por radioisótopos como fósforo 32 o carbono 14) y radiación ultravioleta (preferentemente de 2.500 a 2.900 nm) y mutágenos químicos como análogos de bases (p. ej., 5-bromouracilo), compuestos relacionados (p. ej., 8-etoxicafeína), antibióticos (p. ej., estreptonigrina), agentes alquilantes (p. ej., mostazas sulfuradas, mostazas nitrogenadas, epóxidos, etilenaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nítrico o acridinas. Las plantas resistentes a herbicidas también pueden producirse por procedimientos de cultivo de tejidos para seleccionar células de plantas que comprenden mutaciones de resistencia a herbicidas y después regenerar plantas resistentes a herbicidas a partir de estas. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.773.702 y 5.859.348. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la mejora genética por mutación en "Principles of Cultivar Development" Fehr, 1993, Macmillan Publishing Company, cuya descripción se incorpora en este documento por referencia.

El análisis del gene *AHASL1* de las plantas de girasol de las líneas S4897 y GM1606 reveló la mutación que resulta en la sustitución por una treonina de la alanina que se encuentra en la posición del aminoácido 7 en la secuencia aminoacídica de *AHASL1* natural de SEQ ID NO: 4. La posición del aminoácido 7 en SEQ ID NO: 2 y 4 corresponde a la posición del aminoácido 107 en la secuencia aminoacídica completa de una proteína *AHASL1* de girasol expuesta en SEQ ID NO: 12. Por lo tanto, la presente invención desvela que la sustitución de la alanina en la posición del aminoácido 107 o en una posición equivalente de una proteína *AHASL* por otro aminoácido puede hacer que una planta de girasol presente mayor resistencia a un herbicida, en particular a un herbicida de imidazolinona y/o sulfonilurea. Según se desvela en el ejemplo 6 más adelante, la alanina en la posición del aminoácido 107 está dentro de una región conservada de las proteínas *AHASL*. De manera similar, se han desvelado sustituciones de aminoácidos en otras regiones conservadas de las proteínas *AHASL* de las que se sabe que confieren resistencia a herbicidas en una planta que comprende una proteína *AHASL* semejante. Por consiguiente, las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la invención incluyen, pero no se limitan a aquellas plantas de girasol que comprenden en sus genomas al menos una copia de un polinucleótido *AHASL* que codifica una proteína *AHASL* resistente a herbicidas que comprende una treonina en la posición del aminoácido 107 o en una posición equivalente.

Las plantas de girasol de la invención incluyen además plantas que comprenden una treonina u otro aminoácido distinto de alanina en la posición del aminoácido 107 o en una posición equivalente, respecto a la proteína *AHASL* natural, y una o más sustituciones de aminoácidos adicionales en la proteína *AHASL*, respecto a la proteína *AHASL* natural, en que una planta de girasol semejante presenta un aumento de la resistencia a al menos un herbicida en comparación con una planta de girasol natural. Tales plantas de girasol comprenden proteínas *AHASL* que comprenden una treonina u otro aminoácido distinto de alanina en la posición del aminoácido 107 o en una posición equivalente y al menos un miembro seleccionado del grupo que consta de: una alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina o serina en la posición del aminoácido 182 o en una posición equivalente; una isoleucina o un aminoácido distinto de treonina en la posición del aminoácido 188 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición del aminoácido 190 o en una posición equivalente; una leucina en la posición del aminoácido 559 o en una posición equivalente y una asparragina, treonina, fenilalanina o valina en la posición del aminoácido 638 o en una posición equivalente.

La presente invención proporciona proteínas *AHASL* con sustituciones de aminoácidos en posiciones particulares dentro de regiones conservadas de las proteínas *AHASL* de girasol desveladas en este documento. Además, los expertos reconocerán que tales posiciones de aminoácidos pueden variar dependiendo de si se añaden o se eliminan aminoácidos, por ejemplo, del extremo N-terminal de una secuencia aminoacídica. Por lo tanto, la invención abarca las sustituciones de aminoácidos en la posición indicada o en una posición equivalente (p. ej., "la posición del aminoácido 107 o una posición equivalente"). Con "posición equivalente" se pretende indicar una posición que está dentro de la misma región conservada que la posición del aminoácido de ejemplo. Tales regiones conservadas son conocidas en la técnica (véase la tabla 4 más adelante) o pueden determinarse mediante alineamientos de secuencias múltiples según se desvela en este documento o por procedimientos conocidos en la técnica.

Además, la presente invención proporciona polipéptidos *AHASL* que comprenden sustituciones de

aminoácidos de las que se sabe que confieren resistencia a al menos un herbicida, en particular a un herbicida de imidazolinona y/o un herbicida de sulfonilurea. Tales polipéptidos AHASL incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden una treonina en la posición del aminoácido 107 y al menos un miembro seleccionado del grupo que consta de: una alanina, treonina, histidina, leucina, arginina, isoleucina, glutamina o serina en la posición del aminoácido 182 o en una posición equivalente; una isoleucina u otro aminoácido distinto de treonina en la posición del aminoácido 188 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición del aminoácido 190 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición del aminoácido 190 o en una posición equivalente; una leucina en la posición del aminoácido 559 o en una posición equivalente, y una asparragina, treonina, fenilalanina o valina en la posición del aminoácido 638 o en una posición equivalente. La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican tales polipéptidos AHASL, así como casetes de expresión, vectores de transformación, células huésped transformadas, plantas transformadas y procedimientos que comprenden tales polinucleótidos.

La presente invención proporciona procedimientos para aumentar la tolerancia o la resistencia de una planta, un tejido de una planta, una célula de una planta u otra célula huésped a al menos un herbicida que interfiere con la actividad de la enzima AHAS. Preferentemente, tal herbicida es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolpirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, un herbicida de sulfonilaminocarboniltriazolinona o una mezcla de estos. Con mayor preferencia, tal herbicida es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea o una mezcla de estos. Para la presente invención, los herbicidas de imidazolinona incluyen, pero no se limitan a PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente y una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo imazapir/imazamox (ODYSSEY®). Más específicamente, el herbicida de imidazolinona puede seleccionarse de los siguientes, pero sin limitarse a estos: 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-quinolinocarboxílico, 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 y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-*m*-toluato de metilo y de 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-*p*-toluato de metilo. Se prefiere el uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)nicotínico y ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)nicotínico. Se prefiere en particular el uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)nicotínico.

Para la presente invención, los herbicidas de sulfonilurea incluyen, pero no se limitan a closulfurón, metsulfurón-metilo, sulfometurón-metilo, clorimurón-etilo, tifensulfurón-metilo, tribenurón-metilo, bensulfurón-metilo, nicosulfurón, etametsulfurón-metilo, rimsulfurón, triflusulfurón-metilo, triasulfurón, primisulfurón-metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, flazasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón-etilo, halosulfurón azimsulfurón, ciclosulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón-metilo, foramsulfurón, yodosulfurón, oxasulfurón, mesosulfurón, prosulfurón, sulfosulfurón, trifloxisulfurón, tritosulfurón, un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente y una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente. Los herbicidas de triazolpirimidina de la invención incluyen, pero no se limitan a cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam.

La presente memoria descriptiva abarca moléculas polinucleotídicas AHASL y fragmentos y variantes de estas. La presente invención también abarca las moléculas polinucleotídicas que son fragmentos de estas secuencias nucleotídicas. Con "fragmento" se pretende indicar una porción de la secuencia nucleotídica que codifica una proteína AHASL de la invención. Un fragmento de una secuencia nucleotídica AHASL de la memoria descriptiva puede codificar una porción biológicamente activa de una proteína AHASL o puede ser un fragmento que puede usarse como sonda de hibridación o cebador de PCR mediante los procedimientos descritos más adelante. Una porción biológicamente activa de una proteína AHASL puede prepararse mediante el aislamiento de una porción de una de las secuencias nucleotídicas AHASL descritas en este documento, que expresan la porción codificada de la proteína AHASL (p. ej., por expresión recombinante *in vitro*) y la evaluación de la actividad de la porción codificada de la proteína AHASL1. Las moléculas polinucleotídicas que son fragmentos de una secuencia nucleotídica AHASL comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.050 o 1.100 nucleótidos o hasta el número de nucleótidos presente en una secuencia nucleotídica completa desvelada en este documento (por ejemplo, 1.178 nucleótidos para SEQ ID NO: 1 y 3), dependiendo del uso que se pretenda.

Un fragmento de una secuencia nucleotídica AHASL que codifica una porción biológicamente activa de una proteína AHASL de la invención codificará al menos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 ó 350 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína AHASL1 completa de la invención (por ejemplo, 392 aminoácidos para SEQ ID NO: 2 y 4). En general, los fragmentos de una secuencia nucleotídica AHASL1 que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR no necesitan codificar una porción biológicamente activa de una proteína AHASL1.

En este documento también se describen moléculas polinucleotídicas que son variantes de las secuencias nucleotídicas. Las "variantes" de las secuencias nucleotídicas AHASL descritas en este documento incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas AHASL desveladas en este documento pero que difieren de manera conservadora por la degeneración del código genético. Estas variantes alélicas de origen natural pueden identificarse mediante el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación según se ha indicado anteriormente. Las secuencias nucleotídicas variantes incluyen también secuencias nucleotídicas derivadas sintéticamente, generadas, por ejemplo, por mutación dirigida, pero que todavía codifican la proteína AHASL1 desvelada en la presente invención según se discute más adelante. Generalmente, las variantes de las secuencias nucleotídicas de la invención tendrán al menos una identidad de aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% con una secuencia nucleotídica particular desvelada en este documento. Respectivamente, una variante de la secuencia nucleotídica AHASL codificará una proteína AHASL con una secuencia aminoacídica con una identidad

de al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% con la secuencia aminoacídica de una proteína AHASL desvelada en este documento.

Además, el experto apreciará que es posible introducir cambios por mutación en las secuencias nucleotídicas descritas en este documento, lo que conduce a cambios en la secuencia aminoacídica de las proteínas AHASL codificadas sin que se altere la actividad biológica de las proteínas AHASL. Por lo tanto, es posible crear una molécula polinucleotídica aislada que codifique una proteína AHASL con una secuencia diferente de las de SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente, mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la correspondiente secuencia nucleotídica desvelada en este documento, de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediada por PCR. La presente invención también abarca tales secuencias nucleotídicas variantes.

Por ejemplo, preferentemente pueden hacerse sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más restos aminoacídicos predichos, preferentemente no esenciales. Un resto aminoacídico "no esencial" es un resto que puede alterarse en la secuencia natural de una proteína AHASL (p. ej., la secuencia de SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente) sin alterar la actividad biológica, mientras que un resto aminoacídico "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que el resto aminoacídico se sustituye por un resto aminoacídico con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos aminoacídicos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones β (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). No se llevarán a cabo tales sustituciones para restos aminoacídicos conservados ni para restos aminoacídicos dentro de un dominio conservado.

Las proteínas descritas en este documento pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para tales manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencia aminoacídica de las proteínas AHASL por mutaciones en el ADN. Los procedimientos de mutagénesis y de alteración de la secuencia nucleotídica son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; la patente de los EE. UU. n° 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York, EE. UU.) y las referencias citadas en estos documentos. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., EE. UU.), incorporado en este documento por referencia, puede encontrarse una orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés. Pueden ser preferibles las sustituciones conservadoras, como el intercambio de un aminoácido por otro de propiedades similares.

Alternativamente, pueden crearse variantes de las secuencias nucleotídicas AHASL mediante la introducción de mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de AHASL, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden analizarse en cuanto a la actividad AHAS para identificar los mutantes que retienen dicha actividad AHAS, incluida la actividad AHAS resistente a herbicidas. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse mediante las técnicas de ensayo estándar.

Por lo tanto, las secuencias nucleotídicas descritas en este documento incluyen las secuencias desveladas en este documento así como fragmentos y variantes de estas. Las secuencias nucleotídicas AHASL descritas en este documento y los fragmentos y variantes de estas pueden usarse como sondas y/o cebadores para identificar y/o clonar homólogos de AHASL en otras plantas. Estas sondas pueden usarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican la misma proteína o proteínas idénticas.

De este modo, es posible usar procedimientos como PCR, hibridación y similares para identificar las secuencias que tienen una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Por ejemplo, véase Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, EE. UU.) e Innis y col. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY, EE. UU.). La presente invención abarca las secuencias nucleotídicas AHASL aisladas sobre la base de su identidad de secuencia con las secuencias nucleotídicas de AHASL1 expuestas en este documento o con fragmentos y variantes de estas.

En un procedimiento de hibridación puede usarse toda o parte de una secuencia nucleotídica AHASL conocida para el cribado de genotecas de ADNc o genómicas. Los procedimientos de construcción de tales genotecas de ADNc y genómicas son conocidos en la técnica y se desvelan en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, EE. UU.). Las así denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos y pueden marcarse con un grupo detectable como ^{32}P o cualquier otro marcador detectable, como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Las sondas de hibridación pueden prepararse mediante el marcaje de oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia nucleotídica AHASL conocida desvelada en este documento. Adicionalmente pueden usarse cebadores degenerados diseñados sobre la base de nucleótidos o restos aminoacídicos conservados en una secuencia nucleotídica AHASL conocida o una secuencia aminoacídica codificada por esta. Típicamente, la sonda comprende una región de la secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones restrictivas con al menos aproximadamente 12, preferentemente aproximadamente 25, con mayor preferencia aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 ó 1.178 nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleotídica AHASL de la invención o de un fragmento o variante de esta. La preparación de las sondas se conoce

generalmente en la técnica y se desvela en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, EE. UU.).

Por ejemplo, la totalidad de la secuencia *AHASL* desvelada en este documento o una o más porciones de esta pueden usarse como sonda capaz de hibridar específicamente con las secuencias *AHASL* y los ARNm correspondientes. Las técnicas de hibridación incluyen el cribado por hibridación de genotecas de ADN extendidas en placas de cultivo (placas o colonias; por ejemplo, véase Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, EE. UU.).

La hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones restrictivas. Con “condiciones restrictivas” o “condiciones de hibridación restrictivas” se pretende indicar condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (p. ej., al menos doble de la hibridación de fondo). Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes.

Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,5 M del ión Na, típicamente una concentración del ión Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas de poca longitud (p. ej., 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60°C para sondas de mayor longitud (p. ej., mayores de 50 nucleótidos). Unas condiciones restrictivas pueden conseguirse también mediante la adición de agentes desestabilizantes como formamida. Las condiciones poco restrictivas ejemplares incluyen la hibridación con una disolución tampón con el 30 al 35% de formamida, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37°C y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M, citrato de trisodio 0,3 M) a una temperatura de 50 a 55°C. Las condiciones moderadamente restrictivas ejemplares incluyen la hibridación en formamida a una concentración del 40 al 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en SSC 0,5X a 1X a una temperatura de 55 a 60°C. Las condiciones muy restrictivas ejemplares incluyen la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en SSC 0,1X a una temperatura de 60 a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1% de SDS. La duración de la hibridación es generalmente inferior a aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

Típicamente, la especificidad es función de los lavados después de la hibridación, en que los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, la T_m puede aproximarse de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L$; en que M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % form. es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (para una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento incorrecto; por lo tanto, la T_m y las condiciones de hibridación y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con un 90% de identidad, la T_m puede reducirse 10°C. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para quedar aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, unas condiciones muy restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m); unas condiciones moderadamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m); unas condiciones poco restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m). Mediante el uso de la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_m deseada, los expertos entenderán que se describen inherentemente las variaciones en el rigor de las disoluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de apareamiento incorrecto resulta en una T_m inferior a 45°C (disolución acuosa) o 32°C (disolución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC, de modo que pueda usarse una temperatura mayor. Una guía exhaustiva sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2 (Elsevier, Nueva York, EE. UU.) y Ausubel y col., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, EE. UU.). Véase Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, EE. UU.).

Se reconoce que las moléculas polinucleotídicas y las proteínas descritas en este documento abarcan moléculas polinucleotídicas y proteínas que comprenden una secuencia nucleotídica o aminoacídica que es suficientemente idéntica a la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 y/o 3 o a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 y/o 4. El término “suficientemente idéntica” se usa en este documento para referirse a una primera secuencia aminoacídica o nucleotídica que contiene un número suficiente o mínimo de restos aminoacídicos o nucleótidos idénticos o equivalentes (p. ej., con una cadena lateral similar) a los de una segunda secuencia aminoacídica o nucleotídica, de modo que la primera y la segunda secuencia aminoacídica o nucleotídica tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas que contienen un dominio estructural común con al menos una identidad de aproximadamente el 45%, 55% o 65%, preferentemente una identidad del 75%, con mayor preferencia una identidad del 85%, 95% o 98% se definen en este documento como suficientemente idénticas.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias aminoacídicas o de dos secuencias nucleotídicas, las secuencias se alinean con el fin de una comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas en las dos secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (p. ej., posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse mediante técnicas similares a las descritas más adelante, permitiendo huecos o no. Típicamente, al calcular el porcentaje de identidad se cuentan los apareamientos exactos.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado según Karlin y Altschul (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Un algoritmo semejante está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas polinucleotídicas de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias aminoacídicas homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación puede utilizarse el programa Gapped BLAST según se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col. (1997) referencia anterior. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Un algoritmo semejante está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de programas de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias aminoacídicas puede usarse una tabla de peso de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. El alineamiento también puede hacerse manualmente por inspección.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en este documento se refieren al valor obtenido con el uso de las secuencias completas de la invención y un alineamiento múltiple por medio del algoritmo Clustal W (Nucleic Acids Research, 22(22):4673-4680, 1994) usando el programa AlignX incluido en el paquete de software Vector NTI Suite, versión 7 (InforMax, Inc., Bethesda, MD, EE. UU.) con los parámetros por defecto o cualquier programa equivalente de este. Con "programa equivalente" se pretende indicar cualquier programa de comparación de secuencias que genere, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, un alineamiento con idénticos apareamientos de nucleótidos o aminoácidos y un idéntico porcentaje de identidad de secuencia en comparación con el alineamiento correspondiente generado por AlignX en el paquete de software Vector NTI Suite, versión 7.

Las secuencias nucleotídicas AHASL descritas en este documento incluyen tanto las secuencias de origen natural como las formas mutantes, en particular formas mutantes que codifican proteínas AHASL que comprenden actividad AHAS resistente a herbicidas. De manera similar, las proteínas descritas en este documento abarcan tanto proteínas de origen natural como variaciones y formas modificadas de estas. Tales variantes seguirán teniendo la actividad AHAS deseada. Obviamente, las mutaciones que se hagan en el ADN que codifica la variante no deben poner a la secuencia fuera de fase de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructuras secundarias de ARNm. Por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente EP n^o 75.444.

No se esperar que las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias de proteína comprendidas en esta invención produzcan cambios radicales en las características de la proteína. Sin embargo, cuando sea difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción o inserción antes de llevarla a cabo, el experto en la técnica apreciará que el efecto puede evaluarse mediante análisis rutinarios. Es decir, la actividad puede evaluarse mediante ensayos de la actividad AHAS. Por ejemplo, véase Singh y col (1988) *Anal. Biochem.* 171:173-179.

Las secuencias nucleotídicas y proteínas variantes también abarcan secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y de recombinación como el barajado de ADN. Con un procedimiento semejante es posible manipular una o más secuencias codificantes AHASL diferentes para crear una nueva proteína AHASL con las propiedades deseadas. De esta manera se generan colecciones de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que comprenden regiones en la secuencia con una sustancial identidad de secuencia y que pueden experimentar una recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, mediante el uso de esta estrategia pueden barajarse motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre el gen AHASL de la invención y otros genes AHASL conocidos para obtener un nuevo gen que codifique una proteína con una propiedad de interés mejorada, como una K_m mayor, en el caso de una enzima. Las estrategias para tal barajado de ADN son conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase Stemmer (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer y col. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore y col., (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4505-4509; Cramer y col. (1998) *Nature* 391:288-291, y las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.605.793 y 5.837.458.

Las secuencias nucleotídicas descritas en este documento pueden usarse para aislar secuencias correspondientes en otros organismos, en particular en otras plantas, más en particular en otras dicotiledóneas. De esta manera, es posible usar procedimientos como PCR, hibridación y similares para identificar tales secuencias sobre la base de su homología de secuencia con las secuencias expuestas en este documento. La presente invención abarca las secuencias aisladas sobre la base de su identidad de secuencia con las secuencias polinucleotídicas AHASL expuestas en este documento en su totalidad o con fragmentos de estas. Por lo tanto, la presente invención abarca la secuencias polinucleotídicas aisladas que codifican una proteína AHASL y que hibridan en condiciones restrictivas con la secuencia desvelada en este documento o con fragmentos de esta.

En una estrategia de PCR, pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para usar en reacciones de PCR para amplificar las correspondientes secuencias de ADN y partir de ADNc o ADN genómico extraído de cualquier planta de interés. Los procedimientos para el diseño de cebadores de PCR y la clonación por PCR son generalmente conocidos en la técnica y se desvelan en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, EE. UU.). Véase también Innis y col., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York, EE. UU.); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York, EE. UU.), e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York, EE. UU.). Los procedimientos conocidos de PCR incluyen, pero no se limitan a procedimientos que usan cebadores apareados, cebadores anidados, cebadores específicos únicos,

cebadores degenerados, cebadores específicos para el gen, cebadores específicos para el vector, cebadores de apareamiento parcialmente incorrecto y similares.

Según se desvela en este documento, las secuencias nucleotídicas AHASL descritas en este documento son útiles para mejorar la tolerancia a herbicidas de plantas que comprenden en sus genomas un gen que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicidas. Un gen tal es un gen endógeno. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, las secuencias nucleotídicas de la presente invención pueden mezclarse con cualquier combinación de secuencias polinucleotídicas de interés con el fin de crear plantas con un fenotipo deseado. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden mezclarse con otros polinucleótidos cualesquiera que codifiquen polipéptidos con actividad pesticida y/o insecticida como, por ejemplo, las proteínas de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (descrita en las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.366.892, 5.747.450, 5.737.514, 5.723.756, 5.593.881 y en Geiser y col. (1986) *Gene* 48:109). Las combinaciones generadas pueden incluir también múltiples copias de cualquiera de los polinucleótidos de interés.

La invención se refiere a las plantas no transgénicas de girasol y a la progenie y otros descendientes de tales plantas no transgénicas que muestran una mejora o un aumento de la resistencia a herbicidas que interfieren con la enzima AHAS, en particular herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea.

Los polinucleótidos AHASL de la invención, en particular aquellos que codifican proteínas AHASL resistentes a herbicidas, son útiles en procedimientos para mejorar la resistencia de plantas tolerantes a herbicidas. En una realización de la invención, las plantas tolerantes a herbicidas comprenden una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Las plantas tolerantes a herbicidas incluyen plantas que comprenden un gen endógeno en su genoma que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicidas. Las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas AHASL tolerantes a herbicidas y las plantas tolerantes a herbicidas que comprenden un gen endógeno que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicidas incluyen los polinucleótidos y las plantas de la presente invención y aquellos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, véanse las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.013.659, 5.731.180, 5.767.361, 5.545.822, 5.736.629, 5.773.703, 5.773.704, 5.952.553 y 6.274.796.

Se dispone de numerosos vectores de transformación de plantas y procedimientos para la transformación de plantas. Por ejemplo, véanse An, G. y col. (1986) *Plant Physiol.* 81:301-305; Fry, J. y col. (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76:767-774; Hinchee y col. (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203212:203-212; Cousins y col. (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. y Slightom, J. L. (1992) *Gene* 118:255-260; Christou y col. (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; D'Halluin y col. (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir y col. (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas y col. (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29P:119-124; Davies y col. (1993) *Plant Cell Rep.* 12:180-183; Dong, J. A. y Mchughen, A. (1993) *Plant Sci.* 91:139-148; Franklin, C. I. y Trieu, T. N. (1993) *Plant. Physiol.* 102:167; Golovkin y col. (1993) *Plant Sci.* 90:41-52; Guo Chin Sci. Bull. 38:2072-2078; Asano y col. (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. y Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo y col. (1994) *Plant. J.* 5:583-592; Becker y col. (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska y col. (1994) *Acta. Physiol Plant.* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5:17-27; Eapen y col. (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman y col. (1994) *Bio-Technology* 12:919923; Ritala y col. (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24:317-325, y Wan, Y. C. y Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104:3748.

Los procedimientos descritos en este documento implican la introducción de una construcción polinucleotídica en una planta. Con "introducción" se pretende indicar la presentación a la planta de la construcción polinucleotídica de tal manera que la construcción adquiere acceso al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no dependen de un procedimiento particular para la introducción de una construcción polinucleotídica en una planta, solamente de que la construcción polinucleotídica adquiera acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los procedimientos para la introducción de construcciones polinucleotídicas en plantas son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus.

Con "transformación estable" se pretende indicar que la construcción polinucleotídica introducida en una planta se integra en el genoma de la planta y es capaz de heredarse por la progenie de esta. Con "transformación transitoria" se pretende indicar que una construcción polinucleotídica introducida en una planta no se integra en el genoma de la planta.

Para la transformación de plantas y de células de plantas, las secuencias nucleotídicas de la invención se insertan mediante técnicas estándar en cualquier vector conocido en la técnica adecuado para la expresión de las secuencias nucleotídicas en una planta o en una célula de una planta. La selección del vector depende de la técnica de transformación preferida y de la especie de planta diana que ha de transformarse.

Las metodologías para la construcción de casetes de expresión en plantas y para la introducción de ácidos nucleicos extraños en plantas son generalmente conocidas en la técnica y se han descrito previamente. Por ejemplo, el ADN extraño puede introducirse en las plantas por medio de vectores del plásmido inductor de tumores (Ti). Otros procedimientos para la introducción de ADN extraño implican el uso de la transformación de protoplastos mediada por PEG, electroporación, microinyección, fibras y biolística o bombardeo de microproyectiles para la absorción directa de ADN. Estos procedimientos son conocidos en la técnica (patente de los EE. UU. n^o 5.405.765 a Vasil y col.; Bilang y col. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid y col., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:104-112; Guerche y col. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhause y col. (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36; Klein y col. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell y col. (1980) *Science* 208:1265; Horsch y col. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock y col. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach y Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988) y *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds.) Academic Press, Inc. (1989)). El procedimiento de transformación depende de la célula de la planta que ha de transformarse, la estabilidad de los vectores usados, el nivel de expresión de los productos génicos y de otros parámetros.

Otros procedimientos adecuados para la introducción de secuencias nucleotídicas en células de plantas y para la subsiguiente inserción en el genoma de la planta incluyen la microinyección según Crossway y col. (1986) *Biotechniques* 4:320-334, la electroporación según se describe en Riggs y col. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, la transformación mediada por *Agrobacterium* según se describe en Townsend y col., patente de los EE. UU. n° 5.563.055, Zhao y col., patente de los EE. UU. n° 5.981.840, la transferencia génica directa según se describe en Paszkowski y col. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722 y la aceleración balística de partículas según se describe, por ejemplo, en Sanford y col., patente de los EE. UU. n° 4.945.050; Tomes y col., patente de los EE. UU. n° 5.879.918; Tomes y col., patente de los EE. UU. n° 5.886.244; Bidney y col., patente de los EE. UU. n° 5.932.782; Tomes y col. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment" en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg y Phillips (Springer-Verlag, Berlín, Alemania); McCabe y col. (1988) *Biotechnology* 6:923-926; y la transformación de Lec1 (documento WO 00/28058). Véase también Weissinger y col. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford y col. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou y col. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe y col. (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh y col. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta y col. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein y col. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); Tomes, patente de los EE. UU. n° 5.240.855; Buising y col., patentes de los EE. UU. n°s 5.322.783 y 5.324.646; Tomes y col. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlín, Alemania) (maíz); Klein y col. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm y col. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slooteren y col. (1984) *Nature (London)* 311:763-764; Bowen y col., patente de los EE. UU. n° 5.736.369 (cereales); Bytebier y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (liliáceas); De Wet y col. (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman y col. (Longman, Nueva York, EE. UU.) págs. 197-209 (polen); Kaeppeler y col. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppeler y col. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por fibras); D'Halluin y col. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li y col. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda y col. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maíz por medio de *Agrobacterium tumefaciens*).

Los polinucleótidos pueden introducirse en las plantas poniendo estas en contacto con un virus o con ácidos nucleicos víricos. Generalmente, tales procedimientos implican la incorporación de una construcción polinucleotídica de la invención dentro de una de una molécula de ADN o ARN vírico. Se reconoce que una proteína AHASL de la invención puede sintetizarse inicialmente como parte de una poliproteína vírica, que después puede procesarse por proteólisis *in vivo* o *in vitro* para producir la proteína recombinante deseada. Además, se reconoce que los promotores de la invención también abarcan promotores utilizados para la transcripción por polimerasas de ARN víricas. Los procedimientos para la introducción de construcciones polinucleotídicas en plantas y la expresión de una proteína codificada en estas que implican moléculas de ADN o ARN vírico son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véanse las patentes de los EE. UU. n°s 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 y 5.316.931.

Las células que han sido transformadas pueden dejarse crecer hasta obtener plantas de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, véase McCormick y col. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden dejarse crecer y después polinizarse con la misma estirpe transformada o con estirpes diferentes para identificar el híbrido resultante con expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada. Puede ser necesario el crecimiento de dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda de manera estable y después las semillas se recogen para asegurar que se ha conseguido la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta manera, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominadas "semillas transgénicas") que tienen una construcción polinucleotídica de la invención, por ejemplo, una casete de expresión de la invención, incorporada de manera estable en el genoma.

Las plantas resistentes a herbicidas de la invención tienen utilidad en procedimientos para el control de malas hierbas. Por lo tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento para el control de las malas hierbas en la proximidad de una planta resistente a herbicidas de la invención. El procedimiento comprende la aplicación de una cantidad eficaz de un herbicida a las malas hierbas y a la planta resistente a herbicidas, en que la planta presenta un aumento de la resistencia a al menos un herbicida, en particular un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea, en comparación con una planta natural. En un procedimiento semejante para el control de las malas hierbas, las plantas resistentes a herbicidas de la invención son plantas de girasol.

Al proporcionar plantas que presentan un aumento de la resistencia a herbicidas, en particular a herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea, es posible emplear una amplia diversidad de formulaciones para proteger las plantas de las malas hierbas, con el fin de mejorar el crecimiento de dichas plantas y reducir la competencia por los nutrientes. Un herbicida puede usarse por sí mismo para el control de malas hierbas en preemergencia, postemergencia, antes de plantar o al plantar en áreas que rodean a las plantas descritas en este documento o puede usarse una formulación de un herbicida de imidazolinona que contiene otros aditivos. El herbicida puede usarse también como tratamiento de las semillas. Los aditivos que se encuentran en una formulación de un herbicida de imidazolinona o sulfonilurea incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de esparcido, adherentes, estabilizantes o similares. La formulación del herbicida puede ser una preparación húmeda o seca y puede incluir, pero sin limitarse a polvos fluidos, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida y las formulaciones de herbicidas pueden aplicarse de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, por pulverización, riego, espolvoreo o similares.

La presente invención proporciona semillas transgénicas y no transgénicas que presentan un aumento de la tolerancia a al menos un herbicida, en particular un herbicida inhibidor de la AHAS, más en particular, herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea. Tales semillas incluyen, por ejemplo, semillas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 y semillas transgénicas que comprenden una molécula polinucleotídica endógena de la invención que codifica una proteína AHASL resistente a herbicidas.

La presente invención proporciona procedimientos para la producción de una planta de girasol resistente a herbicidas mediante mejora genética de plantas convencional que implica la reproducción sexual. Los procedimientos comprenden el cruzamiento de una primera planta que es resistente a un herbicida con una segunda planta que no es resistente al herbicida. La primera planta puede ser cualquiera de las plantas resistentes a herbicidas de la presente invención, incluidas plantas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606. La segunda planta puede ser cualquier planta que es capaz de producir una progenie de plantas viables (es decir, semillas) al cruzarla con la primera planta. Típicamente, pero no necesariamente, la primera y la segunda planta son de la misma especie. Los procedimientos de la invención pueden implicar además una o más generaciones de retrocruzamiento de las plantas de la progenie del primer cruzamiento con una planta de la misma línea o genotipo que la primera o la segunda planta. Alternativamente, la progenie del primer cruzamiento o de cualquier cruzamiento subsiguiente puede cruzarse con una tercera planta de una línea o genotipo diferente que la primera o la segunda planta. Los procedimientos de la invención pueden implicar adicionalmente la selección de plantas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la primera planta.

La presente invención proporciona además procedimientos para aumentar la resistencia a herbicidas de una planta, en particular una planta de girasol resistente a herbicidas, mediante mejora genética de plantas convencional que implica la reproducción sexual. Los procedimientos comprenden el cruzamiento de una primera planta que es resistente a un herbicida con una segunda planta que puede ser o no resistente al herbicida o que puede ser resistente a un herbicida o herbicidas diferentes de los de la primera planta. La primera planta puede ser cualquiera de las plantas resistentes a herbicidas de la presente invención, incluidas, por ejemplo, plantas de girasol transgénicas que comprenden al menos una de las moléculas polinucleotídicas de la presente invención que codifican una proteína AHASL resistente a herbicidas y plantas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606. La segunda planta puede ser cualquier planta que es capaz de producir una progenie de plantas viables (es decir, semillas) al cruzarla con la primera planta. Típicamente, pero no necesariamente, la primera y la segunda planta son de la misma especie. Las plantas de la progenie producidas por este procedimiento de la presente invención presentan un aumento de la resistencia a un herbicida en comparación con la primera o la segunda planta o con las dos. Cuando la primera y la segunda plantas son resistentes a diferentes herbicidas las plantas de la progenie tendrán características de tolerancia a herbicidas combinadas de la primera y la segunda plantas. Los procedimientos de la invención pueden implicar además una o más generaciones de retrocruzamiento de las plantas de la progenie del primer cruzamiento con una planta de la misma línea o genotipo que la primera o la segunda planta. Alternativamente, la progenie del primer cruzamiento o de cualquier cruzamiento subsiguiente puede cruzarse con una tercera planta de una línea o genotipo diferente que la primera o la segunda planta. Los procedimientos de la invención pueden implicar adicionalmente la selección de plantas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la primera planta, de la segunda planta o de las dos plantas, primera y segunda.

Las plantas de la presente invención pueden ser transgénicas o no transgénicas. Un ejemplo de una planta de girasol no transgénica que presenta un aumento de la resistencia a imidazolinona es la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606; o un mutante, recombinante o derivado genéticamente manipulado de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606; o de cualquier progenie de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606; o una planta de la progenie de cualquiera de estas plantas; o una planta que comprende las características de tolerancia a herbicidas de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 o la planta de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606.

La presente invención proporciona procedimientos que implican el uso de al menos un herbicida inhibidor de la AHAS seleccionado del grupo que consta de herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de triazolpirimidina y mezclas de estos. En estos procedimientos, el herbicida inhibidor de la AHAS puede aplicarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos, pero sin limitarse al tratamiento de semillas, el tratamiento del suelo y el tratamiento foliar.

Antes de su aplicación, el herbicida inhibidor de la AHAS puede transformarse en las formulaciones acostumbradas, por ejemplo, disoluciones, emulsiones, suspensiones, polvo, polvos, pastas y gránulos. La forma de uso depende del propósito particular que se pretenda; en cada caso deberá asegurarse una distribución fina y uniforme del compuesto de acuerdo con la invención.

Las formulaciones se preparan de manera conocida (p. ej., véanse como revisión la patente de los EE. UU. 3.060.084, el documento EP-A 707445 (para concentrados líquidos), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, 4 de diciembre de 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4ª edición, McGraw-Hill, Nueva York, (EE. UU.), 1963, páginas 8-57 y siguientes, los documentos WO 91/13546, US 4.172.714, US 4.144.050, US 3.920.442, US 5.180.587, US 5.232.701, US 5.208.030, GB 2.095.558, US 3.299.566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, (EE. UU.), 1961, Hance y col., Weed Control Handbook, 8ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford (Gran Bretaña), 1989 y Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania), 2001, 2. D. A. Knowles, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Países Bajos), 1998 (ISBN 0-7514-0443-8)), por ejemplo mediante mezcla del principio activo con sustancias auxiliares adecuadas para la

formulación de productos agroquímicos como disolventes y/o vehículos, si se desean, emulsionantes, tensioactivos y dispersantes, conservantes, antiespumantes, anticongelantes, para formulaciones para tratamiento de semillas opcionalmente también colorantes y/o aglutinantes y/o gelificantes.

5 Algunos ejemplos de disolventes adecuados son agua, disolventes aromáticos (por ejemplo productos Solvesso, xileno), parafinas (por ejemplo fracciones de aceite mineral), alcoholes (por ejemplo metanol, butanol, pentanol, alcohol bencílico), cetonas (por ejemplo ciclohexanona, -butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP), acetatos (diacetato de glicol), glicoles, dimetilamidas de ácidos grasos, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. En principio, también pueden usarse mezclas de disolventes.

10 Algunos ejemplos de vehículos adecuados son minerales naturales molidos (por ejemplo caolines, arcillas, talco, creta y minerales sintéticos molidos (por ejemplo, sílice de alta dispersión, silicatos).

Los emulsionantes adecuados son emulsionantes no iónicos y aniónicos (por ejemplo, éteres de alcoholes grasos y polioxietileno, sulfonatos de alquilo y sulfonatos de arilo).

Algunos ejemplos de dispersantes son las lejiás sulfíticas de lignina y metilcelulosa.

15 Los tensioactivos adecuados usados son sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de amonio, sales de ácido lignosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalenosulfónico, sulfonatos de alquilarilo, sulfatos de alquilo, sulfonatos de alquilo, sulfatos de alcohol graso, ácidos grasos y éteres glicólicos de alcoholes grasos sulfatados, además condensados de naftaleno sulfonado y derivados de naftaleno con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácido naftalenosulfónico con fenol y formaldehído, éter octilfenólico de polioxietileno, isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, éteres poliglicólicos de alquilfenol, éter poliglicólico de tributilfenilo, éter poliglicólico de triestearilfenilo, alcoholes de poliéter de alquilarilo, condensados de alcohol y alcohol graso y óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, éteres alquílicos de polioxietileno, polioxipropileno etoxilado, acetal de éter poliglicólico de alcohol laurílico, ésteres de sorbitol, lejiás sulfíticas de lignina y metilcelulosa.

20

25 Las sustancias que son adecuadas para la preparación de disoluciones directamente pulverizables, emulsiones, pastas o dispersiones oleosas son fracciones de aceites minerales de punto de ebullición medio a alto, como queroseno o gasóleo, además aceites de alquitrán de carbón y aceites de origen vegetal o animal, hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, por ejemplo tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftaleno alquilados o sus derivados, metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, disolventes muy polares, por ejemplo dimetilsulfóxido, *N*-metilpirrolidona o agua.

30 También pueden añadirse a la formulación anticongelantes como glicerina, etilenglicol, propilenglicol y bactericidas.

Los antiespumantes adecuados son, por ejemplo, agentes antiespumantes a base de silicio o estearato de magnesio.

Los conservantes adecuados son, por ejemplo, diclorofeno y hemiformal de alcohol bencílico.

35 Las formulaciones para el tratamiento de semillas pueden comprender adicionalmente aglutinantes y opcionalmente colorantes.

40 Los aglutinantes pueden añadirse para mejorar la adhesión de los materiales activos a las semillas después del tratamiento. Los aglutinantes adecuados son tensioactivos de copolímeros de bloques EO/PO, pero también alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenaminas, polietilenamidas, polietileniminas (Lupasol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, acetato de polivinilo, tilosa y copolímeros derivados de estos polímeros.

45 Opcionalmente también pueden incluirse colorantes en la formulación. Los colorantes o tintes adecuados para las formulaciones para el tratamiento de semillas son rodamina B, pigmento rojo C.I. 112, disolvente rojo C.I. 1, pigmento azul 15:4, pigmento azul 15:3, pigmento azul 15:2, pigmento azul 15:1, pigmento azul 80, pigmento amarillo 1, pigmento Amarillo 13, pigmento rojo 112, pigmento rojo 48:2, pigmento rojo 48:1, pigmento rojo 57:1, pigmento rojo 53:1, pigmento naranja 43, pigmento naranja 34, pigmento naranja 5, pigmento verde 36, pigmento verde 7, pigmento blanco 6, pigmento marrón 25, violeta básico 10, violeta básico 49, rojo ácido 51, rojo ácido 52, rojo ácido 14, azul ácido 9, amarillo ácido 23, rojo básico 10, rojo básico 108.

Un ejemplo de un gelificante adecuado es carrageno (Satiagel®).

50 Los polvos, los materiales para esparcido y los productos espolvoreables pueden prepararse por mezcla o molienda simultánea de los principios activos con un vehículo sólido.

55 Los gránulos, por ejemplo, gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, pueden prepararse mediante la unión de los principios activos a vehículos sólidos. Algunos ejemplos de vehículos sólidos son tierras minerales como geles de sílice, silicatos, talco, caolín, ataclay, piedra caliza, cal, creta, bol, loess, arcilla, dolomita, tierra de diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos molidos, fertilizantes como, por ejemplo, sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, ureas y productos de origen vegetal como harina de cereales, harina de corteza de árboles, serrín y harina de cáscaras de nuez, polvos de celulosa y otros vehículos sólidos.

60 En general, las formulaciones comprenden del 0,01 al 95% en peso, preferentemente del 0,1 al 90% en peso del herbicida inhibidor de la AHAS. En este caso, los herbicidas inhibidores de la AHAS se emplean con una pureza del 90% al 100% en peso, preferentemente, del 95% al 100% en peso (de acuerdo con el espectro de RMN).

Para el tratamiento de semillas, las formulaciones respectivas pueden diluirse de 2 a 10 veces, lo que conduce a concentraciones en las preparaciones listas para usar del 0,01 al 60% en peso del principio activo, preferentemente del 0,1 al 40% en peso.

5 El herbicida inhibidor de la AHAS puede usarse como tal, en forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de estas, por ejemplo, en forma de disoluciones directamente pulverizables, polvos, suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones oleosas, pastas, productos espolvoreables, materiales para esparcir o gránulos, por medio de pulverización, atomización, espolvoreo, esparcido o vertido. Las formas de uso dependen enteramente de la finalidad que se pretenda; en cada caso se pretende asegurar la distribución más fina posible del herbicida inhibidor de la AHAS de acuerdo con la invención.

10 Las formas de uso acuosas pueden prepararse a partir de concentrados de emulsión, pastas o polvos mojables (polvos pulverizables, dispersiones oleosas) mediante la adición de agua. Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones oleosas, las sustancias, como tales o disueltas en un aceite o disolvente, pueden homogeneizarse en agua por medio de un humectante, un taquificante, un dispersante o un emulsionante. Sin embargo, también es posible preparar concentrados compuestos del principio activo, humectante, taquificante, dispersante o emulsionante y, en caso apropiado, el disolvente o aceite y tales concentrados son adecuados para su dilución con agua.

15 Las concentraciones del principio activo en las preparaciones listas para usar puede variar en intervalos relativamente amplios. En general, son del 0,0001 al 10%, preferentemente del 0,01 al 1% en peso.

20 El herbicida inhibidor de la AHAS puede usarse también satisfactoriamente en el procedimiento de ultra bajo volumen (ULV), en el que es posible aplicar formulaciones que comprenden más del 95% en peso del principio activo o incluso aplicar el principio activo sin aditivos.

A continuación se incluyen ejemplos de formulaciones:

1. Productos para diluir con agua para aplicaciones foliares. Para el tratamiento de semillas, tales productos pueden aplicarse a la semilla diluidos o sin diluir.

25 A) Concentrados solubles en agua (SL, LS)

Se disuelven 10 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS en 90 partes en peso de agua o de un disolvente soluble en agua. Como alternativa se añaden humectantes u otros agentes auxiliares. El herbicida inhibidor de la AHAS se disuelve al diluirlo con agua, por lo que se obtiene una formulación con el 10% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

30 B) Concentrados dispersables (DC)

Se disuelven 20 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS en 70 partes en peso de ciclohexanona con la adición de 10 partes en peso de un dispersante, por ejemplo, polivinilpirrolidona. La dilución con agua da lugar a una dispersión, por lo que se obtiene una formulación con el 20% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

C) Concentrados emulsionables (EC)

35 Se disuelven 15 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS en 7 partes en peso de xileno con la adición de dodecibencenosulfonato de calcio y aceite de ricino etoxilado (en cada caso 5 partes en peso). La dilución con agua da lugar a una emulsión, por lo que se obtiene una formulación con el 15% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

D) Emulsiones (EW, EO, ES)

40 Se disuelven 25 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS en 35 partes en peso de xileno con la adición de dodecibencenosulfonato de calcio y aceite de ricino etoxilado (en cada caso 5 partes en peso). Esta mezcla se introduce en 30 partes en peso de agua por medio de una máquina emulsionadora (p. ej., Ultraturax) y se transforma en una emulsión homogénea. La dilución con agua da lugar a una emulsión, por lo que se obtiene una formulación con el 25% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

45 E) Suspensiones (SC, OD, FS)

En un molino de bolas con agitación se trituran 20 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS con la adición de 10 partes en peso de dispersantes, humectantes y 70 partes en peso de agua o de un disolvente orgánico para dar una fina suspensión del herbicida inhibidor de la AHAS. La dilución con agua da lugar a una suspensión estable del herbicida inhibidor de la AHAS, por lo que se obtiene una formulación con el 20% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

50 F) Gránulos dispersables en agua y gránulos solubles en agua (WG, SG)

Se muelen finamente 50 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS con la adición de 50 partes en peso de dispersantes y humectantes y se preparan como gránulos dispersables en agua o gránulos solubles en agua por medio de dispositivos técnicos (por ejemplo, extrusión, torre de pulverización, lecho fluidizado). La dilución con agua da lugar a una dispersión o disolución estable del herbicida inhibidor de la AHAS, por lo que se obtiene una formulación con el 50% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

55

G) Polvos dispersables en agua y polvos solubles en agua (WP, SP, SS, WS)

En un molino de rotor y estator se muelen 75 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS con la adición de 25 partes en peso de dispersantes, humectantes y gel de sílice. La dilución con agua da lugar a una dispersión o disolución estable del herbicida inhibidor de la AHAS, por lo que se obtiene una formulación con el 75% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

5 I) Formulación en gel (GF)

En un molino de bolas con agitación se trituran 20 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS con la adición de 10 partes en peso de dispersantes, 1 parte en peso de un gelificante y 70 partes en peso de agua o de un disolvente orgánico para dar una fina suspensión del herbicida inhibidor de la AHAS. La dilución con agua da lugar a una suspensión estable del herbicida inhibidor de la AHAS, por lo que se obtiene una formulación con el 20% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS. Esta formulación en gel es adecuada para el uso como tratamiento de semillas.

10

2. Productos para aplicar sin diluir para aplicaciones foliares. Para el tratamiento de semillas, tales productos pueden aplicarse a la semilla diluidos.

A) Polvos espolvoreables (DP, DS)

15 Se muelen finamente 5 partes en peso del herbicida inhibidor de la AHAS y se mezclan íntimamente con 95 partes en peso de caolín finamente dividido. Esto da lugar a un producto espolvoreable con el 5% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS.

B) Gránulos (GR, FG, GG, MG)

20 Se muele finamente media parte en peso del herbicida inhibidor de la AHAS y se asocia con 95,5 partes en peso de vehículos, por lo que se obtiene una formulación con el 0,5% (p/p) del herbicida inhibidor de la AHAS. Los procedimientos actuales son extrusión, secado por pulverización o el lecho fluidizado. Esto da lugar a gránulos para aplicar sin diluir para uso foliar.

20

25 Las formulaciones convencionales para el tratamiento de semillas incluyen, por ejemplo, concentrados fluidos FS, disoluciones LS, polvos para tratamiento en seco DS, polvos dispersables en agua para el tratamiento de lechada WS, polvos solubles en agua SS y emulsiones ES y EC y la formulación en gel GF. Estas formulaciones pueden aplicarse a las semillas diluidas o sin diluir. La aplicación a las semillas se lleva a cabo antes de la siembra, directamente sobre las semillas.

25

30 En una realización preferida, se usa una formulación FS para el tratamiento de semillas. Típicamente, una formulación FS puede comprender de 1 a 800 g/l del principio activo, de 1 a 200 g/l de tensioactivo, de 0 a 200 g/l de anticongelante, de 0 a 400 g/l de aglutinante, de 0 a 200 g/l de un pigmento y hasta 1 litro de un disolvente, preferentemente agua.

30

35 La presente invención abarca semillas transgénicas y no transgénicas de las plantas resistentes a herbicidas de la presente invención. Tales semillas incluyen, por ejemplo, semillas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la planta con el número de acceso de la colección NCIMB 41262 y semillas transgénicas que comprenden una molécula polinucleotídica de la invención que codifica una proteína IMI.

35

40 Para el tratamiento de las semillas, las semillas de las plantas resistentes a herbicidas de acuerdo con la presente invención se tratan con herbicidas, preferentemente herbicidas seleccionados del grupo que consta de los herbicidas inhibidores de la AHAS como amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, pirazosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, yodosulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribaco, piriminobaco, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, pirifitalida, piritiobaco y mezclas de estos o con una formulación que comprende un herbicida inhibidor de la AHAS.

45

El término tratamiento de semillas comprende todas las técnicas de tratamiento de semillas adecuadas conocidas en la técnica, como el revestimiento de semillas, el recubrimiento de semillas, el espolvoreo de semillas, la inmersión de semillas y la peletización de semillas.

50

De acuerdo con una variante de la presente invención, otro objeto de la invención es un procedimiento para el tratamiento del suelo mediante la aplicación, en particular en la sembradora, de una formulación granular que contiene el herbicida inhibidor de la AHAS como una composición/formulación (p. ej., una formulación granular, opcionalmente con uno o más vehículos sólidos o líquidos aceptables desde el punto de vista agrícola y/o opcionalmente con uno o más tensioactivos aceptables desde el punto de vista agrícola. Este procedimiento se emplea ventajosamente, por ejemplo, en los lechos de siembra de cereales, maíz, algodón y girasol.

55

60 La presente invención también comprende semillas recubiertas o que contienen una formulación de tratamiento de semillas que comprende al menos un herbicida inhibidor de la AHAS seleccionado del grupo que consta de amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, pirazosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, yodosulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam,

60

flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribaco, piriminobaco, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, piritalida y piritiobaco.

5 El término semilla abarca semillas y propágulos de plantas de todo tipo e incluye, pero no se limita a semillas verdaderas, fragmentos de semillas, renuevos, cormos, bulbos, frutos, tubérculos, granos, esquejes, tallos cortados y similares y en una realización preferida significa semillas verdaderas.

El término “recubierto y/o que contiene” significa generalmente que el principio activo, en su mayoría se encuentra en la superficie del producto de propagación en el momento de la aplicación, aunque una mayor o menor parte del principio activo puede penetrar en el producto de propagación, dependiendo del procedimiento de aplicación. Cuando dicho producto de propagación se (re)planta, puede absorber el principio activo.

10 La aplicación del tratamiento de semillas con el herbicida inhibidor de la AHAS o con una formulación que comprende el herbicida inhibidor de la AHAS se lleva a cabo por pulverización o por espolvoreo de las semillas antes de sembrar las plantas y antes de la emergencia de las plantas.

15 En el tratamiento de semillas, las formulaciones correspondientes se aplican mediante el tratamiento de las semillas con una cantidad eficaz del herbicida inhibidor de la AHAS o una formulación que comprende el herbicida inhibidor de la AHAS. En este documento, las dosis de aplicación son generalmente de 0,1 g a 10 kg del principio activo (o de la mezcla de principios activos o de la formulación) por 100 kg de semilla, preferentemente de 1 g a 5 kg por 100 kg de semilla, en particular de 1 g a 2,5 kg por 100 kg de semilla. Para cultivos específicos como lechuga la dosis puede ser mayor.

20 La presente invención proporciona un procedimiento para combatir la vegetación no deseada o controlar las malas hierbas que comprende la puesta en contacto de las semillas de las plantas resistentes de acuerdo con la invención antes de la siembra y/o después de la pregerminación con un herbicida inhibidor de la AHAS. El procedimiento puede comprender además la siembra de las semillas, por ejemplo en el suelo en un campo o en un medio para macetas en el invernadero. El procedimiento es particularmente útil para combatir la vegetación no deseada o controlar las malas hierbas en la inmediata proximidad de la semilla.

25 Se entiende que el control de la vegetación no deseada significa la destrucción de las malas hierbas y/o, aparte de esto, el retraso o la inhibición del crecimiento normal de las malas hierbas. Se entiende que las malas hierbas, en el sentido más amplio, significan todas aquellas plantas que crecen en lugares donde no se desean.

30 Las malas hierbas de la presente invención incluyen, por ejemplo, malas hierbas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Las malas hierbas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a malas hierbas de los géneros: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* y *Taraxacum*. Las malas hierbas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a malas hierbas de los géneros: *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* y *Apera*.

35 Además, las malas hierbas de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, plantas de cultivo que crecen en un lugar no deseado. Por ejemplo, una planta de maíz espontánea en un campo que predominantemente comprende plantas de soja puede considerarse una mala hierba si la planta de maíz no es deseada en el campo de las plantas de soja.

40 Los artículos “un” y “uno” se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

45 Según se usa en este documento, se entiende que la palabra “comprender” o variaciones como “comprende” o “comprendiendo” implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa dado, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Los ejemplos siguientes se ofrecen como ilustración y no como limitación.

EJEMPLO 1: Mutagénesis de la línea BTK47 de *Helianthus annuus* y selección de plantas resistentes a imidazolinona

50 La línea de mejora BTK47 de *Helianthus annuus* L. se sometió a mutagénesis química de la manera siguiente. Se trataron 60.000 semillas de la línea BTK47 con una disolución de metanosulfonato de etilo (EMS) durante 15 horas. Después, las semillas tratadas se sembraron en condiciones de campo el 16 de diciembre de 2002 en la estación experimental de Nidera en Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina. Aproximadamente 30.000 plantas M₁ florecieron y se cubrieron con bolsas para la autopolinización de cada planta. Todas las plantas se recolectaron y trillaron a mano. El 10 de mayo de 2003 se sembraron 20 M₂ semillas de cada cabeza de girasol en condiciones de invernadero en la estación experimental de Nidera en Formosa. Aproximadamente 590.000 plantas se pulverizaron en el estadio V2-V4 con imazapir a una dosis de 80 g p.a./ha. Ocho plantas sobrevivieron al tratamiento de herbicida y se autopolinizaron y recolectaron. Las semillas M₃ de cada una de estas ocho plantas se evaluaron en cuanto a su resistencia a imazapir. De estas ocho familias M₃, una familia (S4897) mostró segregación de la resistencia a herbicidas en una relación de 1 resistente (es decir, que confiere tolerancia a las dosis comerciales de los herbicidas de imidazolinona) : 2 intermedias (es decir, parcialmente resistentes) : 1 susceptible. Las plantas totalmente fértiles se autopolinizaron y recolectaron para propagar la línea S4897.

El tejido de las hojas de las plantas M₃ S4897 de las clases resistente e intermedia se usó como fuente de

ADN para el análisis de la secuencia del gen *AHASL1* según se describe en el ejemplo 2.

EJEMPLO 2: Amplificación por PCR y secuenciación de polinucleótidos de girasol que codifican proteínas *AHASL1* resistentes a imidazolinona y naturales.

El gen *AHASL1* se amplificó por PCR a partir de ADN aislado de plantas de girasol M₃ S4897 y BTK47 (naturales) como dos fragmentos solapantes. La amplificación por PCR se llevó a cabo con la polimerasa de ADN Hotstart Taq y los reactivos asociados (Quiagen Inc, Valencia, California, EE. UU.; n° de catálogo 203205) por los procedimientos estándar. Los cebadores de PCR para los dos fragmentos se exponen en la tabla 1 y en el listado de secuencias. HA1U409 (SEQ ID NO: 7) es el cebador directo para el primer fragmento y corresponde al par de bases 409 del número de acceso de GenBank AY124092. HA1L1379 (SEQ ID NO: 8) es el cebador inverso para el primer fragmento y corresponde al par de bases 1.379 del número de acceso de GenBank AY124092. HA1U1313 (SEQ ID NO: 9) es el cebador directo para el segundo fragmento y corresponde al par de bases 1.313 del número de acceso de GenBank AY124092. HA1L2131 (SEQ ID NO: 10) es el cebador inverso para el segundo fragmento y corresponde al par de bases 2.131 del número de acceso de GenBank AY124092. El primer par HA1U409-HA1L1379 produjo un fragmento de 970 pares de bases. El segundo par HA1U1313-HA1L2131 produjo un fragmento de 818 pares de bases.

Los productos de PCR resultantes se secuenciaron para producir las secuencias *AHASL1* de S4897 y BTK47. Un alineamiento de estas secuencias nucleotídicas y la secuencia nucleotídica del gen *ALS* de *Xanthium sp.* (número de acceso de GenBank U16280; SEQ ID NO: 5) se muestra en la figura 1. El alineamiento reveló que el gen *AHASL1* de S4897 tenía una única mutación respecto al *AHASL1* de BTK47. El sitio de la mutación se indica por un asterisco en la figura 1. Esta mutación es una transición de G a A que corresponde al nucleótido 21 de SEQ ID NO: 1.

En la figura 2 se muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas predichas para las secuencias nucleotídicas *AHASL1* de S4897, BTK47 y *Xanthium sp.* En comparación con la secuencia aminoacídica de *AHASL1* de BTK47, la secuencia aminoacídica de S4897 tiene una sustitución de alanina por treonina en la posición del aminoácido 7 (SEQ ID NO: 2). Esta posición aminoacídica en SEQ ID NO: 2 corresponde a la posición del aminoácido 107 en la secuencia aminoacídica completa codificada por la secuencia nucleotídica *AHASL1* de girasol del número de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 4) y a la posición del aminoácido 122 en la secuencia aminoacídica completa codificada por la secuencia nucleotídica *AHASL* de *Arabidopsis thaliana* del número de acceso de GenBank X51514.

Tabla 1. Cebadores de PCR para amplificar la región codificante del gen *AHASL1* de girasol

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
HA1U409	CAGACGTGTTGGTGGGAAGC (SEQ ID NO: 7)
HA1L1379	CTGTAACGCGACCTTAATATC (SEQ ID NO: 8)
HA1U1313	TGCTGAAATTGGGAAGAATAAG (SEQ ID NO: 9)
HA1L2131	TTTCGTTCTGCCATCACCC (SEQ ID NO: 10)

EJEMPLO 3: Producción de una línea de girasol homogótica para las características de resistencia a herbicidas de S4897

Se produjo una línea de girasol homogótica para el carácter de resistencia a herbicidas a partir de S4897 por autofecundación y análisis de la resistencia a imazapir. Esta línea de girasol y las plantas de la misma se designaron GM40. Después de confirmar la homogeneidad de la progenie para la resistencia a herbicidas, las plantas de la línea GM40 de girasol se trasplantaron en condiciones de invernadero y se autopolinizaron para la producción de semillas.

EJEMPLO 4: Resistencia de S4897 a imazapic

En ensayos de campo en Argentina se analizaron plantas S4897 en cuanto a la resistencia a imazapic. La resistencia a imazapic fue claramente superior a la de IMISUM-1 (mutación Ala₁₉₀ a Val; la posición equivalente en *Arabidopsis thaliana* es la 205; véase la tabla 4 más adelante). Este ensayo tenía parcelas de una sola hilera y el tratamiento se llevó a cabo en un día de viento, con lo que la dosis real de herbicida que alcanzó las plantas fue menor que la aplicada. No obstante, S4897 mostró una tolerancia a imazapic superior a la de la sustitución de Ala₁₉₀ por Val. No presentamos datos de este ensayo de campo.

Las plantas de S4897 e IMISUN-1 se sometieron también a un tratamiento de imazapic en condiciones de invernadero. La fotografía de la figura 5 muestra esta comparación cuando las plantas se trataron con 100 g p.a./ha de imazapic.

EJEMPLO 5: Resumen de tolerancia y actividad AHAS para la línea de girasol S4897 y otras variedades Clearfield® de girasol resistentes a herbicidas

Procedimientos: La línea de girasol S4897, las variedades de girasol Clearfield® A, B, C y una variedad convencional distinta de Clearfield se pulverizaron con tres dosis de imazamox (Raptor™), 100, 200 y 300 g p.a./ha más el 0,5% de Sun It II y dos dosis de imazapir (Arsenal™), 160 y 360 g p.a./ha más el 0,5% de Sun It II cuando las plantas estaban en el estadio de dos a tres hojas. El daño se evaluó a los 14 días después del tratamiento (DDT). Se usó una escala de 0 a 9 para el daño en que 0 = sin daño y 9 = planta muerta. Se pulverizaron 12 plantas por cada tratamiento de herbicida/dosis. El análisis estadístico se llevó a cabo con STATGRAPHICS Plus 5.0 mediante el uso de los procedimientos ANOVA y LSD.

El análisis de la actividad AHAS también se realizó mediante la selección de hojas jóvenes en crecimiento activo de plantas que no habían sido pulverizadas con el herbicida a aproximadamente cuatro semanas después de la siembra.

Resultados: Después de pulverizar las plantas, se observó que una diferencia de altura entre S4897 y las otras variedades de girasol podría haber afectado a la dosis real de herbicida aplicada. La altura del brazo de pulverización se había calibrado frente a S4897 y dado que las otras variedades eran más altas y estaban más próximas al brazo habrían recibido una dosis mayor del herbicida. Las dosis se recalibraron para las otras variedades para determinar la dosis aproximada que habrían recibido. La evaluación se realizó según se presenta en la tabla 2, dado que no fue posible hacer una comparación directa de las dosis por el efecto de la altura. Por ejemplo, la puntuación del daño se comparó para S4897 tratada con una dosis de imazamox de 100 g p.a./ha y las otras variedades tratadas con 75 g p.a./ha. La dosis de tratamiento de 300 g p.a./ha para la línea S4897 fue equivalente al tratamiento con 200 g p.a./ha para las otras variedades, que fue aproximadamente de 300 g p.a./ha.

Tabla 2. Ajuste debido a la dosis de herbicida recibida

Herbicida	Dosis real recibida (g p.a./ha)		Comparación efectuada (g p.a./ha)	
	S4897	Otras variedades	S4897	Otras variedades
Imazamox	50	75		
	100	150	100	75
	200	300	200	150
	300	450	300	300
Imazapir	160	240		
	360	540	360	240

La línea S4897 presentó significativamente menos daño en todos los tratamientos de herbicida (tabla 3). De hecho se observó muy poco daño con las dosis mayores de imazamox o de imazapir. Las otras variedades mostraron un aumento del daño con la dosis de herbicida según lo esperado. La figura 6 muestra una comparación del daño para 200/150 g p.a./ha para la líneas S4897, la variedad Clearfield® A y el control distinto de Clearfield. El meristemo apical de S4897 mostró muy poco o ningún daño, mientras que la variedad Clearfield® A estaba significativamente dañada y había dejado de crecer.

Tabla 3. Datos de daño a los 14 después del tratamiento para tres líneas IMISUN1 y S4897 pulverizadas con imazamox o imazapir

Líneas	Imazamox (g pa/ha)			Imazapir (g pa/ha)
	100/75	200/150	300	360/240
S4897	0,5 a	0,8 a	0,8 a	0,8 a
Girasol Clearfield variedad A	4,3 c	4,6 c	6,5 d	5,0 c
Girasol Clearfield variedad B	1,9 b	4,8 c	5,3 c	4,3 b
Girasol Clearfield variedad C	1,8 b	2,9 b	4,6 b	4,9 c
Variedad convencional distinta de Clearfield	7,2 d	8,2 d	8,7 e	8,2 d
	LSD = 0,7	LSD = 0,7	LSD = 0,6	LSD = 0,7

El análisis estadístico se realizó con STATGRAPHICS Plus 5.0.

Cada valor es la media de aproximadamente 12 observaciones.

Los resultados de la actividad AHAS mostraron también menor inhibición a la concentración más alta de imazamox en comparación con una variedad de girasol Clearfield® y una variedad convencional distinta de Clearfield (figura 7). La inhibición por Glean™ fue similar para las tres variedades de girasol (figura 8). No se presentó una respuesta ya que no se disponía de los antecesores de la línea S4897. Dado que las dos mutaciones se encuentran en el mismo locus de AHASL1 y todas las variedades ensayadas eran homocigóticas, existe una diferencia cualitativa en la tolerancia conferida por la sustitución aminoacídica en la proteína AHASL1 de S4897. Por lo tanto, la misma cantidad de la enzima AHAS con esta nueva sustitución (es decir, Ala₁₀₇ por Thr) es capaz de catalizar la formación de más producto en presencia de herbicida que la enzima AHAS con la sustitución Ala₁₉₀ por Val. Esto indica que la enzima AHAS con la sustitución Ala₁₀₇ por Thr tiene mayor tolerancia a herbicidas de imidazolinona que la enzima AHAS con la sustitución Ala₁₉₀ por Val.

EJEMPLO 6: Proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas

La presente invención desvela las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de polipéptidos AHASL de girasol naturales y resistentes a herbicidas. Las plantas que comprenden polipéptidos AHASL resistentes a herbicidas se han identificado previamente y en estos polipéptidos AHASL se han descrito una serie de regiones conservadas que son los sitios de sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a herbicidas. Véase Devine y Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". En: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe y col. (eds.), págs. 159-185, IOS Press, Amsterdam, Países Bajos; Devine y Shukla (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

Mediante el uso de las secuencias AHASL de la invención y de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, es posible producir polinucleótidos adicionales que codifican polipéptidos AHASL resistentes a herbicidas con una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos en los sitios identificados en estas regiones conservadas. La tabla 4 proporciona las regiones conservadas de las proteínas AHASL, las sustituciones de aminoácidos de las que se sabe que confieren resistencia a herbicidas dentro de estas regiones conservadas y los correspondientes aminoácidos en la proteína AHASL1 expuesta en SEQ ID NO: 4.

Tabla 4. Mutaciones en regiones conservadas de los polipéptidos AHASL1 de las que se sabe que confieren resistencia a herbicidas y su posición equivalente en la proteína AHASL1 de girasol

Región conservada ¹	Mutación ²	Referencia	Posición del aminoácido en girasol
VFAYPGG <u>AS</u> MEIHQALTRS ³	Ala ₁₂₂ a Thr	Bernasconi y col. ⁶	Ala ₁₀₇
		Wright y Penner ¹⁴	
AITGQV <u>PR</u> RMIGT ⁴	Pro ₁₉₇ a Ala	Boutsalis y col. ⁷	Pro ₁₈₂
	Pro ₁₉₇ a Thr	Guttieri y col. ⁸	
	Pro ₁₉₇ a His	Guttieri y col. ⁹	
	Pro ₁₉₇ a Leu	Guttieri y col. ⁸ Kolkman y col. ¹⁵	
	Pro ₁₉₇ a Arg	Guttieri y col. ⁸	
	Pro ₁₉₇ a Ile	Boutsalis y col. ⁷	
	Pro ₁₉₇ a Ser	Guttieri y col. ⁸	
<u>AF</u> QETP ⁴	Ala ₂₀₅ a Asp	Harnett y col. ¹⁰	Ala ₁₉₀
	Ala ₂₀₅ a Val	Simpson ¹¹ Kolkman y col. ¹⁵ White y col. ¹⁶	
<u>QW</u> ED ⁴ □	Trp ₅₇₄ a Leu	Boutsalis y col. ⁷	Trp ₅₅₉
IP <u>S</u> GG ⁵	Ser ₆₅₃ a Asn	Devine y Eberlein ¹³	Ala ₆₃₈
	Ser ₆₅₃ a Thr	Chang y Duggleby ¹⁷	
	Ser ₆₅₃ a Phe		

¹Regiones conservadas según Devine y Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". En: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe y col. (eds.), págs. 159-185, IOS Press, Amsterdam, Países Bajos y Devine y Shukla, (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

²La numeración de aminoácidos corresponde a la secuencia aminoácida del polipéptido AHASL1 de *Arabidopsis thaliana*.

³Las secuencias aminoácidas de AHASL1 de girasol expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 no tienen la longitud completa y comienzan con las secuencias aminoácidas FAYPGGASMEIHQALTRS y FAYPGGTSMEIHQALTRS, respectivamente.

⁴Las secuencias aminoácidas de AHASL de girasol expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 tienen esta región conservada.

⁵La región de AHASL1 de girasol (número de acceso de GenBank AY541451) correspondiente a esta región conservada tiene la secuencia IPAGG.

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

⁷Boutsalis y col. (1999) *Pestic. Sci.* 55:507-516.

⁸Guttieri y col. (1995) *Weed Sci.* 43:143-178.

⁹Guttieri y col. (1992) *Weed Sci.* 40:670-678.

¹⁰Hartnett y col. (1990) "Herbicide-resistant plants carrying mutated acetolactate synthase genes", en: *Managing Resistance to Agrochemicals: Fundamental Research to Practical Strategies*, Green y col. (eds.), American Chemical Soc. Symp., número de serie 421, Washington, DC, EE. UU.

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

5 ¹²Bruniard (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Tesis doctoral, Universidad del Estado de Dakota del Norte, Fargo, ND, EE. UU., págs. 1-78.

10 ¹³Devine y Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". En: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe y col. (eds.), págs. 159-185, IOS Press, Amsterdam, Países Bajos.

¹⁴Wright y Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620.

¹⁵Kolkman y col. (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159.

¹⁶White y col. (2003) *Weed Sci.* 51:845-853.

¹⁷Chang y Duggleby (1998) *Biochem J.* 333:765-777.

15 EJEMPLO 7: Producción de una línea de girasol GM1606

20 Se produjo una segunda línea de girasol resistente a herbicidas por mutagénesis de semillas que eran de tipo natural en cuanto a la resistencia a herbicidas por un procedimiento esencialmente según se describe en el ejemplo 1. La nueva línea y las plantas de esta línea se denominan GM1606 en este documento. La línea GM1606 de girasol comprende la misma mutación en el gen de AHASL1 que la línea S4897. En GM1606, esta mutación es una transición de G a A que corresponde al nucleótido 21 de SEQ ID NO: 1. Una mutación tal da lugar a una sustitución de alanina por treonina en la posición del aminoácido 7 (SEQ ID NO: 2). Esta posición aminoacídica en SEQ ID NO: 2 corresponde a la posición del aminoácido 107 en la secuencia aminoacídica completa codificada por la secuencia nucleotídica de AHASL1 de girasol del número de acceso de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 4) y a la posición del aminoácido 122 en la secuencia aminoacídica completa codificada por la secuencia nucleotídica de AHASL de *Arabidopsis thaliana* del número de acceso de GenBank X51514.

EJEMPLO 8: Respuesta de las mutaciones A122T y A205V a imazapir

30 Se llevó a cabo un estudio de invernadero para cuantificar y contrastar la sensibilidad a imazapir de los mutantes A122T y A205V en diferentes fondos genéticos a nivel de toda la planta en girasol. Las semillas de las diferentes líneas de girasol usadas en este estudio se obtuvieron en condiciones de campo. Las líneas usadas en este estudio se listan en la tabla 5.

Tabla 5. Materiales de girasol

Código del híbrido/línea	Tipo de material	Mutación
TH1	híbrido	A205V
TH9	híbrido	A205V
TH10	línea restauradora	A205V
GIM 5-7	línea de mantenimiento	A205V
IB920	línea de mantenimiento	A205V
IR79	línea restauradora	A205V
TH6	híbrido	A122T
TH11	híbrido	A122T
TH12	línea restauradora	A122T
GM40	línea de mantenimiento	A122T
GM1606	línea de mantenimiento	A122T
GIM 5-6	línea restauradora	A122T
TH13	línea de mantenimiento	natural

Procedimientos

35 Las semillas se sembraron en placas de Petri y después de la germinación las plántulas se trasplantaron a macetas de 10 cm de diámetro en un medio de macetas compuesto por partes iguales de vermiculita, suelo y arena. Las plantas se dejaron crecer en un invernadero en condiciones de luz natural suplementadas con lámparas de haluro de sodio de 400 W para proporcionar un día de 16 horas de duración. Las temperaturas día/noche fueron de 25 y 20°C, respectivamente. En el estadio V2, diez plantas de cada genotipo se asignaron al azar a cada tratamiento, que constaba de siete dosis de imazapir (0, 40, 80, 160, 240, 320, 400 y 480 g p.a./ha) y una determinación de biomasa en el tiempo cero. El experimento se organizó con un diseño de bloques al azar y una disposición totalmente factorial (línea de girasol x tratamiento) de los tratamientos y diez réplicas.

En el día de la aplicación del herbicida se cortaron diez plantas de cada genotipo por el nudo cotiledonar y se secaron a 60°C durante 48 horas, el tiempo 0 para la determinación del peso seco. El resto de las plantas se mantuvo durante diez días después del tratamiento con imazapir (DDT) y se registró su altura y la biomasa seca de las raíces y de la parte aérea. La altura se determinó como la distancia entre el nudo cotiledonar y el ápice de cada planta. Para la determinación de la biomasa de raíces, las plantas se extrajeron de la maceta y el medio se lavó de las raíces. La biomasa de la parte aérea de cada línea se transformó en acumulación de biomasa después de la aplicación por sustracción de la biomasa media en el tiempo cero apropiada para cada muestra. Los datos de biomasa seca se transformaron en porcentajes respecto a las plantas control sin tratar dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos.

Resultados

1. Altura

La altura de las líneas de girasol con la mutación A205V no difirió de la de los controles sin tratar al aplicar una dosis de imazapir de 0,5X o 1X. De 2X a 6X, estas líneas mostraron una reducción significativa de la altura que alcanzó el 68,9% +/- 3,1 de los controles sin tratar (tabla 6 y figura 9). En contraste, las líneas de girasol con la mutación A122T mostraron una menor reducción de la altura (del 0,6 al 15,8% de los controles sin tratar para dosis de imazapir de 0,5X y 6X, respectivamente). Ambos grupos de líneas mostraron una diferencia significativa entre sí para su respuesta a un aumento de la dosis de herbicida de 2X a 6X (tabla 6 y figura 9).

2. Índice de fitotoxicidad

Ambos mutantes mostraron grandes diferencias en su respuesta al aumento de la dosis de herbicida de 0,5X a 6X (figura 10). Las líneas de girasol con la mutación A122T mostraron una ligera reducción del tamaño de la hoja y un color verde más claro que las plantas de control a medida que aumentó la dosis de herbicida (tabla 7). En contraste, las plantas con la mutación A205V no mostraron ningún daño para una dosis de herbicida de 0,5X o 1X, pero el nivel de daño (amarilleo, deformación de las hojas y necrosis de las hojas) aumentó rápidamente de 2X a 6X (tabla 7). Ambos mutantes difirieron entre sí significativamente en cuanto al índice de fitotoxicidad de 2X a 6X (tabla 7).

3. Peso seco de biomasa de la parte aérea

Las curvas de respuesta a la dosis para el peso seco de los mutantes A122T y A205V se muestran en la figura 11. El peso de biomasa de la mutación A122T se redujo con respecto a las plantas de control para las dosis 4X, 5X y 6X y esta reducción alcanzó en 25% para la dosis mayor. Entretanto, el peso seco de la mutación A205V se redujo con respecto a las plantas de control de 0,5X (40 g p.a./ha) a 6X. Ambos mutantes mostraron diferencias significativas entre sí con respecto a esta variable de 0,5X a 6X (tabla 8). Las mismas tendencias se obtuvieron para la acumulación de materia seca (no se muestra), pero sin los efectos confusos de las diferencias iniciales entre genotipos por su peso seco en el tiempo cero.

4. Biomasa de raíces

A medida que aumentaron las dosis de imazapir, la biomasa seca de raíces de ambos mutantes se redujo con respecto a las plantas de control, pero la tasa de reducción fue muy diferente entre A122T y A205V (figura 12). De hecho, A205V mostró una reducción significativa del peso seco de biomasa de raíces del 12,8% para 0,5X (40 g p.a./ha) al 75,6% para 6X (tabla 9). En contraste, las plantas con A122T mostraron una disminución significativa en el peso de biomasa de raíces de 3X a 6X, y a la dosis más alta, la reducción alcanzó el 38,3% (tabla 9). Ambos mutantes mostraron diferencias significativas entre sí en su peso seco de raíces en respuesta a dosis de herbicida de 0,5X a 6X (tabla 9 y figura 12).

Tabla 6. Efecto de diferentes dosis de imazapir en la altura de las plantas a los 14 días después del tratamiento para seis genotipos de girasol con la mutación A205V y seis genotipos con la mutación A122T

Dosis	A205V										A122T										Dif. A122T - A205V
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	SD	Dif. con control	Valor P	TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	SD	Dif. con control	Valor P	
0	100	100	100	100	100	100	100	0,0	-	-	100	100	100	100	100	100	100	0	-	-	-
0,5	99,5	100,0	99,2	79,1	96,2	92,8	94,4	8,0	5,6	0,15070	99,2	100,4	100,0	99,6	100,0	97,0	99,4	1,2	0,6	0,25170	4,9
1	99,5	100,0	98,1	76,7	80,0	80,9	89,2	11,1	10,8	0,06194	98,6	99,9	100,0	97,4	100,0	95,7	98,6	1,8	1,4	0,10824	9,4
2	78,6	78,9	63,6	57,7	61,5	74,9	69,2	9,4	30,8	0,00048	100,3	92,0	101,8	95,2	99,1	95,2	97,3	3,7	2,7	0,13184	28,0
3	48,4	50,0	51,9	55,3	40,9	55,7	50,4	5,5	49,6	0,00000	99,6	90,5	97,0	93,0	98,1	95,7	95,6	3,4	4,4	0,02466	45,3
4	28,9	38,1	27,5	27,3	27,9	52,8	33,7	10,2	68,3	0,00002	101,0	90,8	92,1	93,0	91,0	94,1	93,7	3,8	6,3	0,00970	59,9
5	25,3	31,8	26,0	37,2	30,0	41,7	32,0	6,4	66,0	0,00000	87,0	84,4	84,8	93,9	94,3	94,3	89,8	4,9	10,2	0,00371	57,8
6	27,1	34,7	29,3	30,0	27,1	33,2	30,2	3,1	69,6	0,00000	79,6	84,4	79,8	84,3	85,8	91,4	84,2	4,4	15,8	0,00031	54,0

Tabla 7. Efecto de diferentes dosis de imazapir en el índice de fitotoxidad a los 14 días después del tratamiento para tres genotipos de girasol con la mutación A205V y tres genotipos con la mutación A122T

Dosis	A205V										A122T					Dif. A205V-A122T	Valor P
	TH1	TH9	TH10	Media	SD	Valor P	TH6	TH11	TH12	Media	SD	Valor P					
0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0						
0,5	0	0	0	0	0	ns	0,5	0,4	0,0	0,3	0,3	0,19171	-0,29	0,19171			
1	0	0	0	0	0	ns	0,5	0,4	0,0	0,3	0,3	0,19461	-0,29	0,19461			
2	1,8	1,6	3,1	2,2	0,8	0,04648	0,5	0,4	0,0	0,3	0,3	0,18981	1,87	0,05030			
3	6,4	5,1	3,9	5,1	1,2	0,01793	0,5	0,5	0,0	0,3	0,3	0,18350	4,81	0,01622			
4	8,0	6,4	5,9	7,4	1,3	0,01084	0,5	1,0	0,0	0,5	0,5	0,22540	6,92	0,00657			
5	8,9	8,9	6,9	8,2	1,1	0,00601	0,5	2,0	0,0	1,0	1,0	0,29986	7,38	0,00111			
6	9,0	8,9	6,7	8,2	1,3	0,00799	0,5	2,5	0,5	1,2	1,2	0,22222	7,03	0,00219			

Tabla 8. Efecto de diferentes dosis de imazapir en la acumulación de biomasa a los 14 días después del tratamiento para seis genotipos de girasol con la mutación A205V y seis genotipos con la mutación A122T

Dosis	A205V										A122T										Dif. con control	Valor P	Dif. A122T-A205V	Valor P									
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	SD	Valor P	TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	SD																
0,0	100	100	100	100	100	100	100	0,0	-	100	100	100	100	100	100	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	95,0	91,7	99,2	92,9	93,9	94,4	94,5	2,6	5,5	100	96,6	100,0	96,5	100,0	100,0	98,9	1,8	1,1	0,00338	100	96,6	100,0	96,5	100,0	100,0	100,0	100,0	98,9	1,8	1,1	0,18453	4,3	0,00823
1,0	89,6	81,7	85,0	75,1	87,9	74,0	82,2	6,5	17,8	97,2	93,9	99,1	94,1	98,4	100,0	96,8	2,5	3,2	0,00116	97,2	93,9	99,1	94,1	98,4	100,0	97,6	94,9	96,8	2,5	3,2	0,02634	14,5	0,00182
2,0	75,5	54,7	58,1	55,1	58,8	67,7	61,6	8,2	38,4	97,9	81,6	97,0	97,6	97,7	97,6	94,9	6,5	5,1	0,00039	97,9	81,6	97,0	97,6	97,7	97,6	92,8	87,8	94,9	6,5	5,1	0,11375	33,2	0,00002
3,0	60,4	35,7	48,1	45,6	46,4	49,1	47,6	7,9	52,4	98,2	75,8	96,1	95,8	95,8	95,4	92,8	8,4	7,2	0,00002	98,2	75,8	96,1	95,8	95,8	95,4	92,8	87,8	94,9	6,5	5,1	0,09241	45,3	0,00000
4,0	46,5	25,3	28,8	31,8	35,5	44,5	35,4	8,5	64,6	97,8	75,0	84,3	88,3	90,8	90,5	87,8	7,6	12,2	0,00001	97,8	75,0	84,3	88,3	90,8	90,5	92,8	87,8	94,9	6,5	5,1	0,01127	52,4	0,00000
5,0	38,9	19,8	27,4	34,2	33,9	40,1	32,4	7,6	67,6	85,1	60,1	77,5	85,6	81,9	85,3	79,3	9,9	20,7	0,00000	85,1	60,1	77,5	85,6	81,9	85,3	92,8	87,8	94,9	6,5	5,1	0,00362	46,9	0,00001
6,0	33,9	19,5	24,9	36,8	29,4	35,3	30,0	6,7	70,0	79,5	59,6	70,7	78,8	78,0	83,0	74,6	8,4	25,4	0,00000	79,5	59,6	70,7	78,8	78,0	83,0	92,8	87,8	94,9	6,5	5,1	0,00070	44,6	0,00000

Tabla 9. Efecto de diferentes dosis de imazapir en el peso seco de raíces a los 14 días después del tratamiento para seis genotipos de girasol con la mutación A205V y seis genotipos con la mutación A122T

Dosis	A205V										A122T										Dif. A122T-A205V	Valor P	Dif. con control	Valor P			
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	SD	Dif. con control	Valor P	TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	SD									
0	100	100	100	100	100	100	100	0,0	-	100	100	100	100	100	100	100	100	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
0,5	79,4	81,5	90,3	79,2	94,0	96,6	87,2	12,6	0,01281	100	100	99,4	100	100	100	100	99,9	0,2	0,36322	12,7	0,36322	12,7	0,36322	12,7	0,36322	12,7	0,01314
1	70,7	84,9	69,9	56,3	89,6	53,4	70,8	29,2	0,00447	98,1	99,0	100	100	88,0	100,0	100,0	97,5	4,7	0,25371	26,7	0,25371	26,7	0,25371	26,7	0,00520	0,00006	
2	69,6	58,8	41,3	40,6	50,7	42,5	50,6	49,4	0,00014	96,2	86,1	100	100	90,0	92,5	92,5	94,1	5,6	0,05070	43,6	0,05070	43,6	0,05070	43,6	0,00001	0,00000	
3	42,3	34,1	42,6	40,2	37,3	38,4	39,2	60,8	0,00000	79,3	81,5	100,0	92,2	98,0	85,2	85,2	89,4	8,7	0,02997	50,2	0,02997	50,2	0,02997	50,2	0,00001	0,00000	
4	38,6	27,3	22,3	34,0	32,8	31,5	31,1	68,9	0,00000	78,4	72,6	74,5	96,1	80,0	87,0	87,0	81,4	8,7	0,00346	50,3	0,00346	50,3	0,00346	50,3	0,00000	0,00000	
5	34,7	29,9	22,7	48,5	25,4	23,3	30,7	69,3	0,00001	85,8	68,9	65,0	84,2	80,0	88,1	88,1	78,7	9,5	0,00273	47,9	0,00273	47,9	0,00273	47,9	0,00001	0,00001	
6	23,1	22,1	16,4	43,1	19,4	21,9	24,4	75,6	0,00001	57,3	45,3	57,8	74,3	65,8	69,5	69,5	61,7	10,4	0,00028	37,3	0,00028	37,3	0,00028	37,3	0,00007	0,00007	

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a los que concierne esta invención.

Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle por medio de ilustraciones y ejemplos con fines de claridad y entendimiento, será obvio que es posible practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

- 5 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Sala, Carlos
Echarte, Mariel
Bulos, Mariano
- 10 Whitt, Sherry R.
Ascenzi, Robert
- <120> PLANTAS DE GIRASOL RESISTENTES A HERBICIDAS, POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES A LA SUBUNIDAD MAYOR DE LA ACETOHIDROXIÁCIDO-SINTASA RESISTENTES A HERBICIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE USO
- 15 <130> 038867/310344
<150> US 60/695.952
<151> 01-07-2005
<160> 14
<170> FastSEQ para Windows, versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 1.178
<212> ADN
<213> *Helianthus annuus*
<220>
- 25 <221> Secuencia codificante
<222> (3)...(1.178)
<400> 1

ES 2 380 867 T3

tc	ttc	gcc	tac	ccc	ggc	ggc	acg	tca	atg	gag	atc	cac	caa	gct	ctc	47
	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	
	1				5					10					15	
acg	cgc	tca	agc	act	atc	cgc	aat	gtg	ctc	ccc	cgt	cac	gaa	cag	ggc	95
Thr	Arg	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His	Glu	Gln	Gly	
				20					25					30		
ggc	gtg	ttc	gcc	gcc	gaa	ggc	tac	gcg	cgc	gcc	tcc	ggt	ctt	ccc	ggc	143
Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Pro	Gly	
			35					40					45			
gtg	tgt	atc	gcc	act	tcc	ggt	ccc	gga	gct	acg	aac	cta	gtt	agt	ggt	191
Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	
		50					55					60				
ctt	gct	gac	gcg	ctg	tta	gac	agt	gtc	ccc	atg	gtg	gca	atc	acc	ggt	239
Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	
	65					70					75					
caa	gtt	ccc	cgg	aga	atg	atc	gga	acc	gat	gcg	ttt	caa	gaa	acc	cca	287
Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	
	80				85					90					95	
att	gtt	gag	gta	aca	cgT	tcg	atc	act	aaa	cat	aat	tat	ctt	gtg	ttg	335
Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	
				100					105					110		
gat	gtt	gag	gat	att	ccc	aga	att	gtt	cgT	gag	gct	ttt	tat	ctt	gcg	383
Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ala	
			115					120					125			
agt	tcg	ggt	cga	ccc	ggc	ccg	gtt	ttg	ata	gat	gta	ccg	aaa	gat	ata	431
Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	
		130					135					140				

ES 2 380 867 T3

cag Gln	caa Gln 145	cag Gln	tta Leu	gtg Val	gtg Val	ccg Pro 150	aaa Lys	tgg Trp	gat Asp	gaa Glu	ccg Pro 155	atg Met	agg Arg	tta Leu	ccg Pro	479
ggt Gly 160	tat Tyr	ttg Leu	tct Ser	aga Arg	atg Met 165	ccg Pro	aag Lys	cct Pro	caa Gln	tat Tyr 170	gat Asp	ggg Gly	cat His	ttg Leu	gaa Glu 175	527
cag Gln	att Ile	ggt Val	agg Arg	ttg Leu 180	gtg Val	ggg Gly	gaa Glu	gcg Ala	aag Lys 185	agg Arg	ccg Pro	ggt Val	ttg Leu	tat Tyr 190	gtg Val	575
ggt Gly	ggt Gly	ggg Gly	tgt Cys 195	ttg Leu	aat Asn	tcg Ser	gat Asp	gat Asp 200	gag Glu	ttg Leu	agg Arg	cgg Arg	ttt Phe 205	gtg Val	gag Glu	623
ctt Leu	acg Thr	ggg Gly 210	att Ile	ccg Pro	ggt Val	gcg Ala	agt Ser 215	act Thr	ttg Leu	atg Met	ggg Gly	ctc Leu 220	gga Gly	gcg Ala	tac Tyr	671
cct Pro	gct Ala 225	tcg Ser	agt Ser	gat Asp	ttg Leu	tcg Ser 230	ctt Leu	cat His	atg Met	ctt Leu	ggg Gly 235	atg Met	cat His	ggt Gly	acg Thr	719
ggt Val 240	tat Tyr	gcg Ala	aat Asn	tat Tyr	gcg Ala 245	ggt Val	gat Asp	aag Lys	agt Ser	gat Asp 250	ttg Leu	ttg Leu	ctt Leu	gcg Ala	ttt Phe 255	767
ggg Gly	gtg Val	cgg Arg	ttt Phe	gat Asp 260	gat Asp	cgt Arg	gtg Val	acg Thr	ggg Gly 265	aag Lys	ctt Leu	gag Glu	gcg Ala	ttt Phe 270	gct Ala	815
agt Ser	agg Arg	gcg Ala	aag Lys 275	att Ile	ggt Val	cat His	att Ile	gat Asp 280	att Ile	gat Asp	cct Pro	gct Ala	gaa Glu 285	att Ile	ggg Gly	863
aag Lys	aat Asn	aag Lys 290	cag Gln	cct Pro	cat His	gtg Val	tcg Ser 295	att Ile	tgt Cys	ggt Gly	gat Asp	att Ile	aag Lys	gtc Val	gcg Ala	911
tta Leu	cag Gln 305	ggt Gly	ttg Leu	aac Asn	aag Lys	att Ile 310	ttg Leu	gag Glu	gaa Glu	aag Lys	aat Asn 315	tcg Ser	gtg Val	act Thr	aat Asn	959
ctt Leu 320	gat Asp	ttt Phe	tcg Ser	acc Thr	tgg Trp 325	aga Arg	aag Lys	gaa Glu	ttg Leu	gat Asp 330	gaa Glu	caa Gln	aaa Lys	atg Met	aag Lys 335	1007
ttc Phe	ccg Pro	ttg Leu	agc Ser	ttt Phe 340	aaa Lys	acg Thr	ttt Phe	ggc Gly	gaa Glu 345	gcg Ala	att Ile	cct Pro	cca Pro	cag Gln 350	tat Tyr	1055
gct Ala	att Ile	caa Gln 355	ggt Val	ctt Leu	gat Asp	gag Glu	tta Leu 360	acg Thr	ggc Gly	ggg Gly	aat Asn	gca Ala	att Ile 365	att Ile	agc Ser	1103
acc Thr	ggt Gly	gtc Val 370	ggg Gly	caa Gln	cat His	cag Gln	atg Met 375	tgg Trp	gct Ala	gct Ala	cag Gln	ttt Phe 380	tac Tyr	aaa Lys	tac Tyr	1151
aac Asn	aaa Lys 385	cct Pro	aga Arg	caa Gln	tgg Trp	ctg Leu 390	acg Thr	tcg Ser								1178

<210> 2

<211> 392

<212> Proteína

5 <213> *Helianthus annuus*

<400> 2

Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly
 20 25 30
 Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val
 35 40 45
 Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu
 50 55 60
 Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln
 65 70 75 80
 Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile
 85 90 95
 Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp
 100 105 110
 Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser
 115 120 125
 Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln
 130 135 140
 Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His Leu Glu Gln
 165 170 175
 Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly
 180 185 190
 Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu
 195 200 205
 Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro
 210 215 220
 Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly
 245 250 255
 Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser
 260 265 270
 Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys
 275 280 285
 Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu
 290 295 300
 Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu
 305 310 315 320
 Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Met Lys Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala
 340 345 350
 Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr
 355 360 365
 Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn
 370 375 380
 Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser
 385 390

<210> 3

<211> 1.178

<212> ADN

5 <213> *Helianthus annuus*

<220>

<221> Secuencia codificante

<222> (3)...(1.178)

<400> 3

10

tc ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac caa gct ctc 47
 Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu

ES 2 380 867 T3

1			5			10			15							
acg	cgc	tca	agc	act	atc	cgc	aat	gtg	ctc	ccc	cgt	cac	gaa	cag	ggc	95
Thr	Arg	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His	Glu	Gln	Gly	
				20					25					30		
ggc	gtg	ttc	gcc	gcc	gaa	ggc	tac	gcg	cgc	gcc	tcc	ggt	ctt	ccc	ggc	143
Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Pro	Gly	
			35				40						45			
gtg	tgt	atc	gcc	act	tcc	ggt	ccc	gga	gct	acg	aac	cta	gtt	agt	ggt	191
Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	
		50					55					60				
ctt	gct	gac	gcg	ctg	tta	gac	agt	gtc	ccc	atg	gtg	gca	atc	acc	ggt	239
Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	
	65					70					75					
caa	gtt	ccc	cgg	aga	atg	atc	gga	acc	gat	gcg	ttt	caa	gaa	acc	cca	287
Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	
	80				85				90						95	
att	gtt	gag	gta	aca	cgt	tcg	atc	act	aaa	cat	aat	tat	ctt	gtg	ttg	335
Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	
				100					105					110		
gat	gtt	gag	gat	att	ccc	aga	att	gtt	cgt	gag	gct	ttt	tat	ctt	gcg	383
Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ala	
			115					120					125			
agt	tcg	ggt	cga	ccc	ggc	ccg	gtt	ttg	ata	gat	gta	ccg	aaa	gat	ata	431
Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	
		130					135					140				
cag	caa	cag	tta	gtg	gtg	ccg	aaa	tgg	gat	gaa	ccg	atg	agg	tta	ccg	479
Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Lys	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	Arg	Leu	Pro	
	145					150					155					
ggt	tat	ttg	tct	aga	atg	ccg	aag	cct	caa	tat	gat	ggg	cat	ttg	gaa	527
Gly	Tyr	Leu	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Asp	Gly	His	Leu	Glu	
	160				165					170					175	
cag	att	gtt	agg	ttg	gtg	ggg	gaa	gcg	aag	agg	ccg	gtt	ttg	tat	gtg	575
Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	
				180					185					190		
ggt	ggt	ggg	tgt	ttg	aat	tcg	gat	gat	gag	ttg	agg	ccg	ttt	gtg	gag	623
Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	
			195					200					205			
ctt	acg	ggg	att	ccg	gtt	gcg	agt	act	ttg	atg	ggg	ctc	gga	gcg	tac	671
Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ala	Tyr	
		210					215					220				
cct	gct	tcg	agt	gat	ttg	tcg	ctt	cat	atg	ctt	ggg	atg	cat	ggt	acg	719
Pro	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	
	225					230					235					
gtt	tat	gcg	aat	tat	gcg	gtt	gat	aag	agt	gat	ttg	ttg	ctt	gcg	ttt	767
Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	
	240				245					250					255	
ggg	gtg	cgg	ttt	gat	gat	cgt	gtg	acg	ggg	aag	ctt	gag	gcg	ttt	gct	815
Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	
				260					265					270		
agt	agg	gcg	aag	att	gtt	cat	att	gat	att	gat	cct	gct	gaa	att	ggg	863
Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	

ES 2 380 867 T3

275				280				285								
aag	aat	aag	cag	cct	cat	gtg	tcg	att	tgt	ggt	gat	att	aag	gtc	gcg	911
Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	
		290					295					300				
tta	cag	ggt	ttg	aac	aag	att	ttg	gag	gaa	aag	aat	tcg	gtg	act	aat	959
Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Asn	
	305					310					315					
ctt	gat	ttt	tcg	acc	tgg	aga	aag	gaa	ttg	gat	gaa	caa	aaa	atg	aag	1007
Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Lys	Met	Lys	
	320				325					330					335	
ttc	ccg	ttg	agc	ttt	aaa	acg	ttt	ggc	gaa	gcg	att	cct	cca	cag	tat	1055
Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	
					340				345					350		
gct	att	caa	gtt	ctt	gat	gag	tta	acg	ggc	ggg	aat	gca	att	att	agc	1103
Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	
			355						360				365			
acc	ggt	gtc	ggg	caa	cat	cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	tac	aaa	tac	1151
Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr	
		370					375						380			
aac	aaa	cct	aga	caa	tgg	ctg	acg	tcg								1178
Asn	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser								
	385					390										

<210> 4

<211> 392

<212> Proteína

5 <213> *Helianthus annuus*

<400> 4

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

Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser
 245 250 255
 260 265 270
 Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys
 275 280 285
 Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu
 290 295 300
 Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu
 305 310 315 320
 Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Met Lys Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala
 340 345 350
 Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr
 355 360 365
 Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn
 370 375 380
 Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser
 385 390

<210> 5

<211> 2.156

5 <212> ADN

<213> *Xanthium sp.*

<220>

<221> Secuencia codificante

<222> (111)...(2.057)

10 <221> Elemento mixto

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

ES 2 380 867 T3

<223> Número de acceso de GenBank U16280

<400> 5

```

gaacaacagc cacatgtttc tggaccatcg tcgttcacac ctattttaat cagataaaca 60
aagtacaaac ataacataac ataaccctag tacataaacac acattcaaca atg gcg 116
                                     Met Ala
                                     1

gcc atc cct cat aca aac cct tcc atc acc acc aaa cca ccc tca tct 164
Ala Ile Pro His Thr Asn Pro Ser Ile Thr Thr Lys Pro Pro Ser Ser
      5                                10                                15

cca cca cgt ccc acc ttc ctc gcc cgt ttc aca ttc cca ata acc tcc 212
Pro Pro Arg Pro Thr Phe Leu Ala Arg Phe Thr Phe Pro Ile Thr Ser
      20                                25                                30

act tcc cat aaa cga cac cgt ctc cac atc tcc aac gtc ctc tcc gac 260
Thr Ser His Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn Val Leu Ser Asp
      35                                40                                45

tcc aaa ccc acc atc acc cat tca cca tta cca acc aaa tca ttt atc 308
Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Lys Ser Phe Ile
      55                                60                                65

tcc cgt tac gct cca gac caa cca aga aaa ggc gct gat gtt ctc gtc 356
Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val
      70                                75                                80

gaa gct ctg gaa cgt gaa ggc gtt aca gac gtc ttc gct tac cca ggt 404
Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly
      85                                90                                95

ggt gcc tcc atg gag atc cac caa gct ctc acg cgc tca acc acc atc 452
Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr Thr Ile
      100                                105                                110

```

ES 2 380 867 T3

cgc Arg 115	aac Asn	ggt Val	ctc Leu	cca Pro	cgt Arg 120	cac His	gaa Glu	cag Gln	ggc Gly 125	ggc Gly 125	gtc Val	ttt Phe	gct Ala	gcc Ala	gaa Glu 130	500
ggc Gly	tac Tyr	gca Ala	cgt Arg	gcc Ala 135	tcc Ser	ggt Gly	ctt Leu	ccc Pro	ggc Gly 140	gtc Val	tgt Cys	att Ile	gca Ala	acc Thr 145	tct Ser	548
ggt Gly	cct Pro	gga Gly	gct Ala 150	acg Thr	aac Asn	cta Leu	gta Val	agt Ser 155	ggt Gly	ctt Leu	gct Ala	gat Asp	gct Ala 160	tta Leu	tta Leu	596
gac Asp	agt Ser	ggt Val 165	cca Pro	atg Met	ggt Val	gct Ala	att Ile 170	act Thr	ggt Gly	caa Gln	ggt Val	ccc Pro 175	agg Arg	aga Arg	atg Met	644
att Ile	gga Gly 180	aca Thr	gat Asp	gcg Ala	ttt Phe	caa Gln 185	gaa Glu	acc Thr	cct Pro	att Ile	ggt Val 190	gag Glu	gta Val	aca Thr	cgt Arg	692
tcc Ser 195	att Ile	act Thr	aag Lys	cat His	aat Asn 200	tat Tyr	tta Leu	ggt Val	ttg Leu	gat Asp 205	gtc Val	gag Glu	gat Asp	att Ile	ccc Pro 210	740
agg Arg	att Ile	ggt Val	agg Arg	gaa Glu 215	gct Ala	ttt Phe	tat Tyr	ctt Leu	gcg Ala 220	tct Ser	tct Ser	ggt Gly	cga Arg	ccc Pro 225	gga Gly	788
ccg Pro	ggt Val	tta Leu	att Ile 230	gat Asp	gta Val	cct Pro	aag Lys	gat Asp 235	ata Ile	cag Gln	cag Gln	cag Gln	ttg Leu 240	gta Val	gtg Val	836
cct Pro	aaa Lys	tgg Trp 245	gat Asp	gag Glu	cct Pro	att Ile	agg Arg 250	tta Leu	cct Pro	ggg Gly	tat Tyr	ttg Leu 255	tct Ser	agg Arg	ttc Phe	884
cct Pro	aaa Lys 260	acg Thr	gag Glu	aat Asn	aat Asn	ggg Gly 265	cag Gln	ttg Leu	gaa Glu	cag Gln	att Ile 270	ggt Val	agg Arg	ttg Leu	gtg Val	932
agt Ser 275	gag Glu	gcc Ala	aag Lys	agg Arg	ccg Pro 280	ggt Val	ttg Leu	tat Tyr	gtg Val	ggg Gly 285	ggt Gly	ggg Gly	tgt Cys	ttg Leu	aat Asn 290	980
tcg Ser	gga Gly	gat Asp	gag Glu	ttg Leu 295	agg Arg	cgg Arg	ttt Phe	gtg Val	gag Glu 300	ctt Leu	acg Thr	ggg Gly	ata Ile	ccg Pro 305	ggt Val	1028
gcg Ala	agt Ser	acg Thr	ttg Leu 310	atg Met	ggg Gly	ctt Leu	gga Gly	gcg Ala 315	tac Tyr	cct Pro	gct Ala	tct Ser	agt Ser 320	gat Asp	ttg Leu	1076
tcg Ser	ctg Leu	cat His 325	atg Met	ctt Leu	ggg Gly	atg Met	cat His 330	ggg Gly	acc Thr	ggt Val	tat Tyr	gcg Ala 335	aat Asn	tat Tyr	gcg Ala	1124
ggt Val	gat Asp 340	aag Lys	agt Ser	gat Asp	ttg Leu 345	ttg Leu	ctt Leu	gcg Ala	ttt Phe	ggg Gly	gta Val 350	agg Arg	ttt Phe	gat Asp	gac Asp	1172
cgt Arg 355	gtg Val	acg Thr	ggg Gly	aag Lys	ctt Leu 360	gag Glu	gct Ala	ttt Phe	gct Ala	agc Ser 365	aga Arg	gct Ala	aag Lys	att Ile	ggt Val 370	1220
cat His	att Ile	gat Asp	att Ile	gat Asp 375	tct Ser	gcg Ala	gaa Glu	att Ile	ggg Gly 380	aag Lys	aat Asn	aag Lys	cag Gln	cct Pro 385	cat His	1268

ES 2 380 867 T3

gtg	tcg	att	tgt	ggt	gat	att	aag	gtc	gcg	tta	cag	ggt	ctg	aac	aag	1316
Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	
			390					395					400			
att	ttg	gag	gta	aag	aat	tcg	gtg	act	aat	ctt	gat	ttc	tcg	aac	tgg	1364
Ile	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe	Ser	Asn	Trp	
		405					410					415				
agg	aag	gaa	ttg	gat	gag	caa	aag	ggt	aag	tat	ccg	ttg	agt	ttt	aaa	1412
Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Lys	Val	Lys	Tyr	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	
	420					425					430					
aca	ttt	ggc	gaa	gct	att	cct	ccg	cag	tat	gcc	att	caa	gtg	ctt	gat	1460
Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	
	435				440					445					450	
gag	tta	acg	ggt	ggg	aat	gcg	att	att	agc	act	ggg	gtc	ggg	cag	cat	1508
Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	
				455					460					465		
cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	tac	aaa	tac	aac	aag	cct	aga	caa	tgg	1556
Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	
			470					475					480			
ctg	acg	tca	ggt	gga	cta	ggg	gcg	atg	ggt	ttt	ggg	ttg	ccc	gct	gct	1604
Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	
		485					490					495				
atc	ggg	gcc	gct	ggt	gca	aga	cct	gat	gcg	gta	gta	ggt	gat	atc	gat	1652
Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val	Asp	Ile	Asp	
	500					505						510				
ggt	gat	gga	agc	ttt	ata	atg	aac	ggt	caa	gag	tta	gcc	aca	atc	cgt	1700
Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	
	515				520					525					530	
ggt	gaa	aat	ctt	cct	ggt	aag	att	ttg	tta	ctt	aac	aat	cag	cat	ttg	1748
Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	
				535				540						545		
ggt	atg	gtg	ggt	cag	tgg	gag	gat	cgg	ttt	tac	aag	gcg	aat	cgg	gct	1796
Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	
			550					555					560			
cat	acc	tac	tta	gga	aat	ccg	tca	aaa	gag	tct	gaa	ata	ttc	cct	aac	1844
His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	
		565					570					575				
atg	ttg	aag	ttt	gct	gaa	gcg	tgt	gat	atc	cca	gct	gcc	cga	gtg	acc	1892
Met	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Thr	
		580				585					590					
cgg	aag	gca	gat	cta	cga	gca	gct	att	cag	aag	atg	ttg	gat	aca	ccg	1940
Arg	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	
	595				600					605					610	
ggg	cct	tac	ttg	ttg	gat	gtg	atc	gtg	ccc	cat	caa	gaa	cat	gtg	ttg	1988
Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	
				615					620					625		
ccc	atg	atc	ccg	gct	ggt	gga	ggt	ttc	atg	gat	gtg	atc	acc	gaa	ggc	2036
Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Met	Asp	Val	Ile	Thr	Glu	Gly	
			630					635					640			
gac	ggc	aga	atg	aaa	tat	tga	gcttcaatgt	cacatatagt	gtgttctgta							2087
Asp	Gly	Arg	Met	Lys	Tyr	*										
		645														
agcagtttgt	cggttatgaa	gttaaattgtt	ttgtttgtgta	atcttcgttcc	tggttaaaaa											2147
atcaagctt																2156

<210> 6

<211> 648

<212> Proteína

<213> *Xanthium sp.*

5 <400> 6

Met Ala Ala Ile Pro His Thr Asn Pro Ser Ile Thr Thr Lys Pro Pro
1 5 10 15
Ser Ser Pro Pro Arg Pro Thr Phe Leu Ala Arg Phe Thr Phe Pro Ile
20 25 30
Thr Ser Thr Ser His Lys Arg His Arg Leu His Ile Ser Asn Val Leu
35 40 45
Ser Asp Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Lys Ser
50 55 60
Phe Ile Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val
65 70 75 80
Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr
85 90 95
Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr
100 105 110
Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala
115 120 125
Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala
130 135 140
Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala
145 150 155 160
Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg
165 170 175
Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val
180 185 190
Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp
195 200 205
Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg
210 215 220
Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu
225 230 235 240
Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Ile Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser
245 250 255
Arg Phe Pro Lys Thr Glu Asn Asn Gly Gln Leu Glu Gln Ile Val Arg
260 265 270
Leu Val Ser Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys
275 280 285
Leu Asn Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile
290 295 300
Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser
305 310 315 320
Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn
325 330 335
Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
340 345 350
Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
355 360 365
Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
370 375 380
Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu
385 390 395 400
Asn Lys Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser
405 410 415
Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser
420 425 430
Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
435 440 445
Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
450 455 460
Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg

465	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro
					485	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val
					500					505						
	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr
					515					520						
	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln
					530					535						
	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn
					545					550						
	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ile	Phe
					565					570						
	Pro	Asn	Met	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg
					580					585						
	Val	Thr	Arg	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys	Met	Leu	Asp
					595					600						
	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His
					610					615						
	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Met	Asp	Val	Ile	Thr
					625											
	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Met	Lys	Tyr			635					640
					645											

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador HA1U409

<400> 7

cagacgtggt ggtggaagc

19

10 <210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Cebador HA1L1379

<400> 8

ctgtaacgcg accttaatat c

21

<210> 9

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador HA1U1313

<400> 9

25 tgctgaaatt gggaagaata ag

22

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> Cebador HA1L2131

<400> 10

tttcgttctg ccatcaccc

19

<210> 11

<211> 1.968

10 <212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

<220>

<221> Secuencia codificante

<222> (1)...(1.965)

15 <221> Elemento mixto

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

<223> Número de acceso de GenBank AY541451

<400> 11

ES 2 380 867 T3

atg	gcg	gct	cct	ccc	aac	cct	tcc	atc	tcc	ttc	aaa	cca	ccg	tca	ccc	48
Met	Ala	Ala	Pro	Pro	Asn	Pro	Ser	Ile	Ser	Phe	Lys	Pro	Pro	Ser	Pro	
1				5					10					15		
gcc	gcc	gca	ctg	cca	cca	cgc	tcc	gcc	ttc	ctc	ccc	cgT	ttc	gca	tta	96
Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro	Arg	Phe	Ala	Leu	
			20					25					30			
ccc	atc	act	tcc	act	acc	caa	aaa	cga	cac	cgT	ctt	cac	atc	tcc	aat	144
Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr	Gln	Lys	Arg	His	Arg	Leu	His	Ile	Ser	Asn	
		35					40					45				
gtt	ctc	tcc	gac	tcc	aaa	tcc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	act	caa	192
Val	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	
	50					55					60					
cga	ccg	tta	ccg	gtg	cag	cct	ttt	gtc	tcc	cgT	tac	gcg	cca	gat	caa	240
Arg	Pro	Leu	Pro	Val	Gln	Pro	Phe	Val	Ser	Arg	Tyr	Ala	Pro	Asp	Gln	
65					70					75					80	
ccg	aga	aaa	ggc	gca	gac	gtg	ttg	gtg	gaa	gct	ctg	gaa	cgG	gaa	ggt	288
Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	
				85					90					95		
gtc	acc	gac	gtc	ttc	gcc	tac	ccc	ggc	ggc	gcg	tca	atg	gag	atc	cac	336
Val	Thr	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His	
			100					105					110			
caa	gct	ctc	acg	cgC	tca	agc	act	atc	cgC	aat	gtg	ctc	ccc	cgT	cac	384
Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His	
		115					120					125				
gaa	cag	ggc	ggc	gtg	ttc	gcc	gcc	gaa	ggc	tac	gcg	cgC	gcc	tcc	ggt	432
Glu	Gln	Gly	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	
	130					135					140					
ctt	ccc	ggc	gtg	tgt	atc	gcc	act	tcc	ggt	ccc	gga	gct	acg	aac	cta	480
Leu	Pro	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	
145					150					155					160	
gtt	agt	ggt	ctt	gct	gac	gcg	ctg	tta	gac	agt	gtc	ccc	atg	gtg	gca	528
Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	
				165					170					175		
atc	acc	ggt	caa	gtt	ccc	cgG	aga	atg	atc	gga	acc	gat	gcg	ttt	caa	576
Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	
			180					185					190			
gaa	acc	cca	att	gtt	gag	gta	aca	cgT	tcg	atc	act	aaa	cat	aat	tat	624
Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	
		195					200					205				
ctt	gtg	ttg	gat	gtt	gag	gat	att	ccc	aga	att	gtt	cgT	gag	gct	ttt	672

ES 2 380 867 T3

Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Phe		
210						215				220							
tat	ctt	gcg	agt	tcg	ggt	cga	ccc	ggc	ccg	ggt	ttg	ata	gat	gta	ccg	720	
Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	225	230
225					230					235					240		
aaa	gat	ata	cag	caa	cag	tta	gtg	gtg	ccg	aaa	tgg	gat	gaa	ccg	atg	768	
Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Lys	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	245	250
245									250					255			
agg	tta	ccg	ggt	tat	ttg	tct	aga	atg	ccg	aag	cct	caa	tat	gat	ggg	816	
Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr	Leu	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Asp	Gly	260	265
260									265				270				
cat	ttg	gaa	cag	att	ggt	agg	ttg	gtg	ggg	gaa	gcg	aag	agg	ccg	ggt	864	
His	Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	Val	275	280
275							280					285					
ttg	tat	gtg	ggt	ggt	ggg	tgt	ttg	aat	tcg	gat	gat	gag	ttg	agg	cgg	912	
Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	290	295
290						295				300							
ttt	gtg	gag	ctt	acg	ggg	att	ccg	ggt	gcg	agt	act	ttg	atg	ggg	ctc	960	
Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	305	310
305					310					315					320		
gga	gcg	tac	cct	gct	tcg	agt	gat	ttg	tcg	ctt	cat	atg	ctt	ggg	atg	1008	
Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	325	330
325									330					335			
cat	ggt	acg	ggt	tat	gcg	aat	tat	gcg	ggt	gat	aag	agt	gat	ttg	ttg	1056	
His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	340	345
340								345					350				
ctt	gcg	ttt	ggg	gtg	cgg	ttt	gat	gat	cgt	gtg	acg	ggg	aag	ctt	gag	1104	
Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	355	360
355							360					365					
gcg	ttt	gct	agt	agg	gcg	aag	att	ggt	cat	att	gat	att	gat	cct	gct	1152	
Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	370	375
370						375					380						
gaa	att	ggg	aag	aat	aag	cag	cct	cat	gtg	tcg	att	tgt	ggt	gat	att	1200	
Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	385	390
385					390					395				400			
aag	gtc	gcg	tta	cag	ggt	ttg	aac	aag	att	ttg	gag	gaa	aag	aat	tcg	1248	
Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	405	410
405									410					415			
gtg	act	aat	ctt	gat	ttt	tcg	acc	tgg	aga	aag	gaa	ttg	gat	gaa	caa	1296	
Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	420	425
420								425					430				
aaa	atg	aag	ttc	ccg	ttg	agc	ttt	aaa	acg	ttt	ggc	gaa	gcg	att	cct	1344	
Lys	Met	Lys	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	435	440
435							440				445						
cca	cag	tat	gct	att	caa	ggt	ctt	gat	gag	tta	acg	ggc	ggg	aat	gca	1392	
Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	450	455
450						455					460						
att	att	agc	acc	ggt	gtc	ggg	caa	cat	cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	1440	
Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	465	470
465					470					475					480		
tac	aaa	tac	aac	aaa	cct	aga	caa	tgg	ctg	acg	tcg	ggc	ggg	cta	ggg	1488	

ES 2 380 867 T3

Tyr	Lys	Tyr	Asn	Lys 485	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu 490	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu 495	Gly		
gca	atg	ggt	ttc	ggc	ctg	ccc	gct	gct	atc	ggg	gcg	gcc	gtt	gca	aga		1536
Ala	Met	Gly	Phe 500	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala 505	Ile	Gly	Ala	Ala	Val 510	Ala	Arg		
cct	gat	gcg	gta	gta	gtt	gac	atc	gac	ggt	gac	gga	agc	ttt	atg	atg		1584
Pro	Asp	Ala 515	Val	Val	Val	Asp	Ile 520	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser 525	Phe	Met	Met		
aat	gtt	caa	gag	tta	gcc	aca	atc	cgt	ggt	gaa	aat	ctg	ccg	gtt	aag		1632
Asn	Val 530	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr 535	Ile	Arg	Val	Glu	Asn 540	Leu	Pro	Val	Lys		
att	tta	tta	ctt	aac	aac	cag	cat	ttg	ggt	atg	gtg	gtt	cag	tgg	gag		1680
Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn 550	Gln	His	Leu	Gly	Met 555	Val	Val	Gln	Trp	Glu 560		
gat	cgg	ttt	tac	aag	gcg	aat	cgg	gct	cat	acc	tac	tta	gga	aac	ccg		1728
Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys 565	Ala	Asn	Arg	Ala	His 570	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn 575	Pro		
tca	aaa	gag	tcg	gaa	ata	ttc	cct	aac	atg	gtg	aag	ttt	gct	gaa	gcc		1776
Ser	Lys	Glu	Ser 580	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn 585	Met	Val	Lys	Phe	Ala 590	Glu	Ala		
tgt	gat	atc	ccg	gct	gct	cga	gtg	acc	caa	aag	gcg	gat	cta	cga	gca		1824
Cys	Asp	Ile 595	Pro	Ala	Ala	Arg	Val 600	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp 605	Leu	Arg	Ala		
gct	att	cag	aag	atg	ttg	gat	aca	ccc	ggg	cct	tac	ttg	ttg	gat	gtg		1872
Ala	Ile 610	Gln	Lys	Met	Leu	Asp 615	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr 620	Leu	Leu	Asp	Val		
att	gtg	ccg	cat	caa	gaa	cac	gtg	ttg	ccc	atg	atc	ccg	gct	ggc	gga		1920
Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu 630	His	Val	Leu	Pro	Met 635	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly 640		
ggt	ttc	tcg	gat	gtg	atc	acc	gag	ggt	gat	ggc	aga	acg	aaa	tat			1965
Gly	Phe	Ser	Asp	Val 645	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp 650	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr 655			
tga																	1968

<210> 12

<211> 655

<212> Proteína

5 <213> *Helianthus annuus*

<400> 12

ES 2 380 867 T3

Met	Ala	Ala	Pro	Pro	Asn	Pro	Ser	Ile	Ser	Phe	Lys	Pro	Pro	Ser	Pro
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro	Arg	Phe	Ala	Leu
			20					25					30		
Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr	Gln	Lys	Arg	His	Arg	Leu	His	Ile	Ser	Asn
		35					40					45			
Val	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln
	50					55					60				
Arg	Pro	Leu	Pro	Val	Gln	Pro	Phe	Val	Ser	Arg	Tyr	Ala	Pro	Asp	Gln
65					70					75					80
Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly
				85					90					95	
Val	Thr	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His
			100					105					110		
Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His
		115					120					125			
Glu	Gln	Gly	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly

130 135 140
 Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu
 145 Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala
 Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln
 180 185 190
 Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe
 210 215 220
 Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro
 225 230 235
 Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met
 245 250 255
 Arg Leu Pro Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly
 260 265 270
 His Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val
 275 280 285
 Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg
 290 295 300
 Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu
 305 310 315
 Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met
 320 325 330 335
 His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu
 340 345 350
 Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu
 355 360 365
 Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala
 370 375 380
 Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile
 385 390 395 400
 Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser
 405 410 415 415
 Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln
 420 425 430 430
 Lys Met Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro
 435 440 445 445
 Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala
 450 455 460 460
 Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe
 465 470 475 475 480
 Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly
 485 490 495 495
 Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg
 500 505 510 510
 Pro Asp Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met
 515 520 525 525
 Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys
 530 535 540 540
 Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu
 545 550 555 555 560
 Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro
 565 570 575 575
 Ser Lys Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Val Lys Phe Ala Glu Ala
 580 585 590 590
 Cys Asp Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala
 595 600 605 605
 Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val
 610 615 620 620
 Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly
 625 630 635 635 640
 Gly Phe Ser Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
 645 650 655 655

<210> 13

<211> 2.013

ES 2 380 867 T3

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> Secuencia codificante

5 <222> (1)...(2.013)

<400> 13

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

ES 2 380 867 T3

tta	gct	act	tct	ggt	aga	cct	gga	cct	ggt	ttg	ggt	gat	ggt	cct	aaa	768
Leu	Ala	Thr	Ser	Gly 245	Arg	Pro	Gly	Pro	Val 250	Leu	Val	Asp	Val	Pro 255	Lys	
gat	att	caa	caa	cag	ctt	gcg	att	cct	aat	tgg	gaa	cag	gct	atg	aga	816
Asp	Ile	Gln	Gln 260	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro 265	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala 270	Met	Arg	
tta	cct	ggt	tat	atg	tct	agg	atg	cct	aaa	cct	ccg	gaa	gat	tct	cat	864
Leu	Pro	Gly 275	Tyr	Met	Ser	Arg	Met 280	Pro	Lys	Pro	Pro	Glu 285	Asp	Ser	His	
ttg	gag	cag	att	ggt	agg	ttg	att	tct	gag	tct	aag	aag	cct	gtg	ttg	912
Leu	Glu 290	Gln	Ile	Val	Arg	Leu 295	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys 300	Lys	Pro	Val	Leu	
tat	ggt	ggt	ggt	ggt	tgt	ttg	aat	tct	agc	gat	gaa	ttg	ggt	agg	ttt	960
Tyr 305	Val	Gly	Gly	Gly	Cys 310	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp 315	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe 320	
ggt	gag	ctt	acg	ggg	atc	cct	ggt	gcg	agt	acg	ttg	atg	ggg	ctg	gga	1008
Val	Glu	Leu	Thr	Gly 325	Ile	Pro	Val	Ala	Ser 330	Thr	Leu	Met	Gly	Leu 335	Gly	
tct	tat	cct	tgt	gat	gat	gag	ttg	tcg	tta	cat	atg	ctt	gga	atg	cat	1056
Ser	Tyr	Pro	Cys 340	Asp	Asp	Glu	Leu	Ser 345	Leu	His	Met	Leu	Gly 350	Met	His	
ggg	acg	gtg	tat	gcg	aat	tac	gct	gtg	gag	cat	agt	gat	ttg	ttg	ttg	1104
Gly	Thr	Val 355	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala 360	Val	Glu	His	Ser	Asp 365	Leu	Leu	Leu	
gcg	ttt	ggg	gtg	agg	ttt	gat	gat	cgc	gtc	acg	ggt	aag	ctt	gag	gct	1152
Ala	Phe 370	Gly	Val	Arg	Phe	Asp 375	Asp	Arg	Val	Thr	Gly 380	Lys	Leu	Glu	Ala	
ttt	gct	agt	agg	gct	aag	att	ggt	cat	att	gat	att	gac	tct	gct	gag	1200
Phe 385	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys 390	Ile	Val	His	Ile	Asp 395	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu 400	
att	ggg	aag	aat	aag	act	cct	cat	gtg	tct	gtg	tgt	ggt	gat	gtc	aag	1248
Ile	Gly	Lys	Asn	Lys 405	Thr	Pro	His	Val	Ser 410	Val	Cys	Gly	Asp	Val 415	Lys	
ctg	gct	ttg	caa	ggg	atg	aat	aag	ggt	ctt	gag	aac	cga	gct	gag	gag	1296
Leu	Ala	Leu	Gln 420	Gly	Met	Asn	Lys	Val 425	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala 430	Glu	Glu	
ctt	aag	ctt	gat	ttt	gga	ggt	tgg	agg	aat	gag	ttg	aac	gta	cag	aaa	1344
Leu	Lys	Leu	Asp	Phe	Gly	Val	Trp 440	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn 445	Val	Gln	Lys	
cag	aag	ttt	ccg	ttg	agc	ttt	aag	acg	ttt	ggg	gaa	gct	att	cct	cca	1392
Gln	Lys 450	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe 455	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu 460	Ala	Ile	Pro	Pro	
cag	tat	gcg	att	aag	gtc	ctt	gat	gag	ttg	act	gat	gga	aaa	gcc	ata	1440
Gln	Tyr	Ala	Ile	Lys	Val 470	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr 475	Asp	Gly	Lys	Ala	Ile 480	
ata	agt	act	ggt	gtc	ggg	caa	cat	caa	atg	tgg	gcg	gcg	cag	ttc	tac	1488
Ile	Ser	Thr	Gly	Val 485	Gly	Gln	His	Gln	Met 490	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe 495	Tyr	
aat	tac	aag	aag	cca	agg	cag	tgg	cta	tca	tca	gga	ggc	ctt	gga	gct	1536
Asn	Tyr	Lys	Lys 500	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu 505	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu 510	Gly	Ala	

ES 2 380 867 T3

atg ggt ttt gga ctt cct gct gcc att gga gcg tct gtt gct aac cct 1584
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 515 520 525

gat gca ata gtt gtg gat att gac gga gat gga agc ttt ata atg aat 1632
 Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
 530 535 540

gtg caa gag ctg gcc aca atc cgt gta gag caa ctt cca gtg aag ata 1680
 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Gln Leu Pro Val Lys Ile
 545 550 555

ctc tta tta aac aac cag cat ctt ggc atg gtt atg caa tgg gaa gat 1728
 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
 565 570 575

cgg ttc tac aag gct aac cga gct cac aca ttt ctc ggg gat ccg gct 1776
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
 580 585 590

cag gag gac gag ata ttc ccg aac atg ttg ctg ttt gca gca gct tgc 1824
 Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
 595 600 605

ggg att cca gcg gcg agg gtg aca aag aaa gca gat ctc cga gaa gct 1872
 Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
 610 615 620

att cag aca atg ctg gat aca cca gga cct tac ctg ttg gat gtg att 1920
 Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
 625 630 635 640

tgt ccg cac caa gaa cat gtg ttg ccg atg atc ccg agt ggt ggc act 1968
 Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr
 645 650 655

ttc aac gat gtc ata acg gaa gga gat ggc cgg att aaa tac tga 2013
 Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr *
 660 665 670

<210> 14

<211> 670

<212> Proteína

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 14

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
 20 25 30
 Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ile Ser Ala
 50 55 60
 Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
 65 70 75 80
 Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
 85 90 95
 Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
 100 105 110
 Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 115 120 125
 Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
 130 135 140
 Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys

145 Pro Gly Ile Cys Ile 150 Ala Thr Ser Gly Pro 155 Gly Ala Thr Asn Leu Val
 Val 165 Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
 180 Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 195 Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
 210 Val Met Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
 225 Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys
 245 Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg
 260 Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
 275 Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu
 290 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe
 305 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
 325 Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
 340 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu
 355 Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
 370 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
 385 Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys
 405 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
 420 Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys
 435 Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
 450 Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
 465 Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
 485 Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala
 500 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 515 Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
 530 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Gln Leu Pro Val Lys Ile
 545 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
 565 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
 580 Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
 595 Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
 610 Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
 625 Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr
 645 Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
 660 665 670

REIVINDICACIONES

1. Una planta de girasol que comprende en su genoma al menos una copia de al menos un gen endógeno que comprende un polinucleótido correspondiente a la subunidad mayor de la acetohidroxiácido-sintasa (AHASL), en que dicho polinucleótido AHASL codifica una proteína AHASL1 resistente al herbicida imidazolinona que comprende la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 2 o una planta de girasol de la progenie de esta y en que dicha planta o la progenie de esta presentan un aumento de la resistencia a al menos un herbicida de imidazolinona en comparación con una planta de girasol natural.
2. La planta de girasol de la reivindicación 1, en que dicha planta presenta un aumento de la resistencia a al menos un herbicida seleccionado del grupo que consta de los herbicidas de sulfonilurea y los herbicidas de triazolopirimidina.
3. La planta de girasol de la reivindicación 1 ó 2, en que dicho polinucleótido AHASL resistente a herbicidas comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 1.
4. La planta de girasol de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que dicha proteína AHASL resistente a herbicidas comprende además al menos un miembro seleccionado del grupo que consta de: (a) una leucina en la posición del aminoácido 559 o en una posición equivalente respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 12 y (b) uno cualquiera de asparragina, treonina, fenilalanina o valina en la posición del aminoácido 638 o en una posición equivalente respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 12.
5. Una semilla de la planta de girasol de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en que dicha semilla comprende en su genoma al menos una copia de dicho polinucleótido AHASL.
6. Una planta de girasol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende las características de resistencia a herbicidas de imidazolinona de la línea GM40 o GM1606, en que una muestra de semilla de cada línea se ha depositado, respectivamente, con el número de depósito de patente ATCC PTA-6716 y el número de depósito de patente PTA-7606, en que dicha planta (a) es de la progenie de la línea GM40 o GM1606; (b) es un mutante, recombinante o derivado manipulado genéticamente de la línea GM40 o GM1606 o (c) es una planta de la progenie de al menos una cualquiera de las plantas de (a) o (b).
7. Una semilla de la planta de girasol de la reivindicación 6, en que dicha semilla comprende las características de resistencia a herbicidas de imidazolinona de la línea GM40 o GM1606.
8. Un procedimiento para el control de las malas hierbas en la proximidad de una planta de girasol, en que dicho procedimiento comprende la aplicación de una cantidad eficaz de un herbicida de imidazolinona o una mezcla de un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea y/o un herbicida de triazolopirimidina a las malas hierbas y a la planta de girasol, en que dicha planta de girasol es una planta de girasol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en que dicho herbicida de imidazolinona se selecciona del grupo que consta 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-quinolinocarboxílico, 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 y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-*m*-toluato de metilo y de 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-*p*-toluato de metilo y mezclas de estos.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en que dicho herbicida de sulfonilurea se selecciona del grupo que consta de: clorsulfurón, metsulfurón-metilo, sulfometurón-metilo, clorimurón-etilo, tifensulfurón-metilo, tribenurón-metilo, bensulfurón-metilo, nicosulfurón, etametsulfurón-metilo, rimsulfurón, triflusulfurón-metilo, triasulfurón, primisulfurón-metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, flazasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón-etilo, halosulfurón y mezclas de estos.
11. Una semilla de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6, en que dicha semilla se trata con un herbicida de imidazolinona inhibidor de la AHAS o una mezcla de un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea y/o un herbicida de triazolopirimidina.
12. Un procedimiento para combatir la vegetación no deseada que comprende la puesta en contacto de una semilla de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6 antes de la siembra y/o después de la pregerminación con un herbicida de imidazolinona inhibidor de la AHAS o una mezcla de un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea y/o un herbicida de triazolopirimidina.

FIGURA 1
(Hoja 1 de 6)

	1				50
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11
SEQ_ID_NO: __5	GAACAACAGC	CACATGTTTC	TGGACCATCG	TCGTTCACAC	CTATTTTAAT
SEQ_ID_NO: __13
	51				100
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11
SEQ_ID_NO: __5	CAGATAAACA	AAGTACAAAC	ATAACATAAC	ATAACCCTAG	TACATAACAC
SEQ_ID_NO: __13	ATGGCGGGG	CAACAACAAC
	101				150
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	ATGGCGGCTC	CTCCCAACCC	T.TCCATC.T
SEQ_ID_NO: __5	ACATTCAACA	ATGGCGGCCA	TCCC...TC	ATACAAACCC	T.TCCATC.A
SEQ_ID_NO: __13	AACAACAACA	TCTTCTTCGA	TCTCCTTCTC	CACCAAACCA	TCTCCTTCT
	151				200
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CCTTCAAACC	ACCGTCACCC	GCCGCCGCAC	TGCCACCACG	CTCCGCCTTC
SEQ_ID_NO: __5	CCACCAAACC	ACCCTCATCTCCACCACG	TCCCACCTTC
SEQ_ID_NO: __13	CCTCCAAATC	ACCATTACCA	ATCTCCAGA.	..TTCTCCCT	CCCATTCTCC
	201				250
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CTCCCCGTT	TCGCATTACC	CATCACTTCC	A..CTACCCA	AAAACGACAC
SEQ_ID_NO: __5	CTCGCCGTT	TACATTCCC	AATAACCTCC	A..CTTCCA	TAAACGACAC
SEQ_ID_NO: __13	CTAAACCCA	ACAAATCATC	CTCCTCTCC	CGCCGCCGG	GTATCAAATC
	251				300
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CGTCTCACA	TCTCCAATGT	TCTCTCCGA.	CTCCAAATCC	ACCACCACCA
SEQ_ID_NO: __5	CGTCTCACA	TCTCCAACGT	CCTCTCCGA.	CTCCAAACCC	ACCATCACC.
SEQ_ID_NO: __13	CAGCTCTCCC	TCTCCATCT	CCGCCGTGCT	CAACACAACC	ACCAATGTCA
	301				350
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CCACCACCAC	CACT.CAACG	ACCGTTACCG	G..TGCAGCC	TTTTGTCTCC
SEQ_ID_NO: __5CATT	ACCATTACCA	A..CCAAATC	ATTTATCTCC
SEQ_ID_NO: __13	CAACCACTCC	CTCTCAACC	AAACCTACCA	AACCCGAAAC	ATTATCTCC
	351				400
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CGTTACGCGC	CAGATCAACC	GAGAAAAGGC	GCAGACGTGT	TGGTGAAGC
SEQ_ID_NO: __5	CGTTACGCTC	CAGACCAACC	AAGAAAAGGC	GCTGATGTTC	TCGTCGAAGC
SEQ_ID_NO: __13	CGATTGCTC	CAGATCAACC	CCGAAAAGGC	GCTGATATCC	TCGTCGAAGC

FIGURA 1
(Hoja 2 de 6)

	401				*450
SEQ_ID_NO: 1TCTT	CGCCTACCCC	GGCGGCACGT
SEQ_ID_NO: 3TCTT	CGCCTACCCC	GGCGGCACGT
SEQ_ID_NO: 11	TCTGGAACGG	GAAGGTGTCA	CCGACGTCTT	CGCCTACCCC	GGCGGCACGT
SEQ_ID_NO: 5	TCTGGAACGT	GAAGGCGTTA	CAGACGTCTT	CGCTTACCCA	GGTGGTGCCT
SEQ_ID_NO: 13	TTTAGAACGT	CAAGGCGTAG	AAACCGTATT	CGCTTACCCT	GGAGGTGCAT
	451				500
SEQ_ID_NO: 1	CAATGGAGAT	CCACCAAGCT	CTCACGCGCT	CAAGCACTAT	CCGCAATGTG
SEQ_ID_NO: 3	CAATGGAGAT	CCACCAAGCT	CTCACGCGCT	CAAGCACTAT	CCGCAATGTG
SEQ_ID_NO: 11	CAATGGAGAT	CCACCAAGCT	CTCACGCGCT	CAAGCACTAT	CCGCAATGTG
SEQ_ID_NO: 5	CAATGGAGAT	CCACCAAGCT	CTCACGCGCT	CAACCAACT	CCGCAACGTT
SEQ_ID_NO: 13	CAATGGAGAT	TCACCAAGCC	TTAACCCGCT	CTTCTCAAT	CCGTAACGTC
	501				550
SEQ_ID_NO: 1	CTCCCCCGTC	ACGAACAGGG	CGGCGTGTTC	GCCGCCGAAG	GCTACGCGCG
SEQ_ID_NO: 3	CTCCCCCGTC	ACGAACAGGG	CGGCGTGTTC	GCCGCCGAAG	GCTACGCGCG
SEQ_ID_NO: 11	CTCCCCCGTC	ACGAACAGGG	CGGCGTGTTC	GCCGCCGAAG	GCTACGCGCG
SEQ_ID_NO: 5	CTCCCCCGTC	ACGAACAGGG	CGGCGTCTTT	GCTGCCGAAG	GCTACGCACG
SEQ_ID_NO: 13	CTTCTCTGTC	ACGAACAAGG	AGGTGTATTG	GCAGCAGAAG	GATACGCTCG
	551				600
SEQ_ID_NO: 1	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACCTCCGGT	CCC GGAGCTA
SEQ_ID_NO: 3	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACCTCCGGT	CCC GGAGCTA
SEQ_ID_NO: 11	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACCTCCGGT	CCC GGAGCTA
SEQ_ID_NO: 5	TGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TCTGTATTGC	AACCTCTGGT	CCTGGAGCTA
SEQ_ID_NO: 13	ATCCTCAGGT	AAACCAGGTA	TCTGTATAGC	CACCTCAGGT	CCC GGAGCTA
	601				650
SEQ_ID_NO: 1	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCTCATG
SEQ_ID_NO: 3	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCTCATG
SEQ_ID_NO: 11	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCTCATG
SEQ_ID_NO: 5	CGAACCTAGT	AAGTGGTCTT	GCTGATGCTT	TATTAGACAG	TGTTCCAATG
SEQ_ID_NO: 13	CAAATCTCGT	TAGCGGATTA	GCCGATGCGT	TGTTAGATAG	TGTTCTCTTT
	651				700
SEQ_ID_NO: 1	GTGGCAATCA	CCGGTCAAGT	TCCCCGGAGA	ATGATCGGAA	CCGATGCGTT
SEQ_ID_NO: 3	GTGGCAATCA	CCGGTCAAGT	TCCCCGGAGA	ATGATCGGAA	CCGATGCGTT
SEQ_ID_NO: 11	GTGGCAATCA	CCGGTCAAGT	TCCCCGGAGA	ATGATCGGAA	CCGATGCGTT
SEQ_ID_NO: 5	GTTGCTATTA	CTGGTCAAGT	TCCCAGGAGA	ATGATTGGAA	CAGATGCGTT
SEQ_ID_NO: 13	GTAGCAATCA	CAGGACAAGT	CCCTCGTCGT	ATGATTGGTA	CAGATGCGTT
	701				750
SEQ_ID_NO: 1	TCAAGAAACC	CCAATTGTTG	AGGTAACACG	TTCGATCACT	AAACATAATT
SEQ_ID_NO: 3	TCAAGAAACC	CCAATTGTTG	AGGTAACACG	TTCGATCACT	AAACATAATT
SEQ_ID_NO: 11	TCAAGAAACC	CCAATTGTTG	AGGTAACACG	TTCGATCACT	AAACATAATT
SEQ_ID_NO: 5	TCAAGAAACC	CCTATTGTTG	AGGTAACACG	TTCCATTAAT	AAGCATAATT
SEQ_ID_NO: 13	TCAAGAGACT	CCGATTGTTG	AGGTAACGCG	TTCGATTACG	AAGCATAACT
	751				800
SEQ_ID_NO: 1	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTCCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 3	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTCCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 11	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTCCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 5	ATTTAGTTTT	GGATGTCGAG	GATATTCCCA	GGATTGTTAG	GGAAGCTTTT
SEQ_ID_NO: 13	ATCTTGTGAT	GGATGTTGAA	GATATCCCTA	GGATTATTGA	GGAAGCTTTT

FIGURA 1
(Hoja 3 de 6)

	801				850
SEQ_ID_NO: __1	TATCTTGCGA	GTTCTGGGTCG	ACCCGGCCCCG	GTTTTGATAG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: __3	TATCTTGCGA	GTTCTGGGTCG	ACCCGGCCCCG	GTTTTGATAG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: __11	TATCTTGCGA	GTTCTGGGTCG	ACCCGGCCCCG	GTTTTGATAG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: __5	TATCTTGCGT	CTTCTGGTTCG	ACCCGGACCCG	GTTTTAATTG	ATGTACCTAA
SEQ_ID_NO: __13	TTTTTAGCTA	CTTCTGGTAG	ACCTGGACCT	GTTTTGGTTG	ATGTTCTCTAA
	851				900
SEQ_ID_NO: __1	AGATATACAG	CAACAGTTAG	TGGTGCCGAA	ATGGGATGAA	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: __3	AGATATACAG	CAACAGTTAG	TGGTGCCGAA	ATGGGATGAA	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: __11	AGATATACAG	CAACAGTTAG	TGGTGCCGAA	ATGGGATGAA	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: __5	GGATATACAG	CAGCAGTTGG	TAGTGCCTAA	ATGGGATGAG	CCTATTAGGT
SEQ_ID_NO: __13	AGATATTCAA	CAACAGCTTG	CGATTCTCTAA	TTGGGAACAG	GCTATGAGAT
	901				950
SEQ_ID_NO: __1	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	ATGCCGAAGC	CTCAATATGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: __3	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	ATGCCGAAGC	CTCAATATGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: __11	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	ATGCCGAAGC	CTCAATATGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: __5	TACCTGGGTA	TTTGTCTAGG	TTCCCTAAAA	CGGAGAATAA	TGGGCAGTTG
SEQ_ID_NO: __13	TACCTGGTTA	TATGTCTAGG	ATGCCTAAAC	CTCCGGAAGA	TTCTCATTTG
	951				1000
SEQ_ID_NO: __1	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	GGGGGAAGCG	AAGAGGCCGG	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: __3	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	GGGGGAAGCG	AAGAGGCCGG	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: __11	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	GGGGGAAGCG	AAGAGGCCGG	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: __5	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	GAGTGAGGCC	AAGAGGCCGG	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: __13	GAGCAGATTG	TTAGGTTGAT	TTCTGAGTCT	AAGAAGCCTG	TGTTGTATGT
	1001				1050
SEQ_ID_NO: __1	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	CGGATGATGA	GTTGAGGCCG	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: __3	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	CGGATGATGA	GTTGAGGCCG	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: __11	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	CGGATGATGA	GTTGAGGCCG	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: __5	GGGGGGTGGG	TGTTTGAATT	CGGGAGATGA	GTTGAGGCCG	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: __13	TGGTGGTGGT	TGTTTGAATT	CTAGCGATGA	ATTGGGTAGG	TTTGTGGAGC
	1051				1100
SEQ_ID_NO: __1	TTACGGGGAT	TCCGTTGCG	AGTACTTTGA	TGGGGCTCGG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: __3	TTACGGGGAT	TCCGTTGCG	AGTACTTTGA	TGGGGCTCGG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: __11	TTACGGGGAT	TCCGTTGCG	AGTACTTTGA	TGGGGCTCGG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: __5	TTACGGGGAT	ACCGTTGCG	AGTACGTTGA	TGGGGCTTGG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: __13	TTACGGGGAT	CCCTGTTGCG	AGTACGTTGA	TGGGGCTGGG	ATCTTATCCT
	1101				1150
SEQ_ID_NO: __1	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	TCATATGCTT	GGGATGCATG	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: __3	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	TCATATGCTT	GGGATGCATG	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: __11	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	TCATATGCTT	GGGATGCATG	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: __5	GCTTCTAGTG	ATTTGTCGCT	GCATATGCTT	GGGATGCATG	GGACCGTTTA
SEQ_ID_NO: __13	TGTGATGATG	AGTTGTCGTT	ACATATGCTT	GGAATGCATG	GGACGGTGTA
	1151				1200
SEQ_ID_NO: __1	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	AGAGTGATTT	GTTGCTTGCG	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: __3	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	AGAGTGATTT	GTTGCTTGCG	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: __11	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	AGAGTGATTT	GTTGCTTGCG	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: __5	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	AGAGTGATTT	GTTGCTTGCG	TTTGGGGTAA
SEQ_ID_NO: __13	TGCGAATTAC	GCTGTGGAGC	ATAGTGATTT	GTTGTTGGCG	TTTGGGGTGA

FIGURA 1
(Hoja 4 de 6)

	1201				1250
SEQ_ID_NO: __1	GGTTTGATGA	TCGTGTGACG	GGGAAGCTTG	AGGCGTTTGC	TAGTAGGGCG
SEQ_ID_NO: __3	GGTTTGATGA	TCGTGTGACG	GGGAAGCTTG	AGGCGTTTGC	TAGTAGGGCG
SEQ_ID_NO: _11	GGTTTGATGA	TCGTGTGACG	GGGAAGCTTG	AGGCGTTTGC	TAGTAGGGCG
SEQ_ID_NO: __5	GGTTTGATGA	CCGTGTGACG	GGGAAGCTTG	AGGCTTTTGC	TAGCAGAGCT
SEQ_ID_NO: _13	GGTTTGATGA	TCGCGTCACG	GGTAAGCTTG	AGGCTTTTGC	TAGTAGGGCT
	1251				1300
SEQ_ID_NO: __1	AAGATTGTTC	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __3	AAGATTGTTC	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: _11	AAGATTGTTC	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __5	AAGATTGTTC	ATATTGATAT	TGATTCTGCG	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: _13	AAGATTGTTC	ATATTGATAT	TGACTCTGCT	GAGATTGGGA	AGAATAAGAC
	1301				1350
SEQ_ID_NO: __1	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: __3	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: _11	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: __5	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTA	GGTCGCGTTA	CAGGGTCTGA
SEQ_ID_NO: _13	TCCTCATGTG	TCTGTGTGTG	GTGATGTCAA	GCTGGCTTTG	CAAGGGATGA
	1351				1400
SEQ_ID_NO: __1	ACAAGATTTT	GGAGGAAAAG	AATTCGGTGA	CTAATCTTGA	TTTTTCGACC
SEQ_ID_NO: __3	ACAAGATTTT	GGAGGAAAAG	AATTCGGTGA	CTAATCTTGA	TTTTTCGACC
SEQ_ID_NO: _11	ACAAGATTTT	GGAGGAAAAG	AATTCGGTGA	CTAATCTTGA	TTTTTCGACC
SEQ_ID_NO: __5	ACAAGATTTT	GGAGGTAAG	AATTCGGTGA	CTAATCTTGA	TTTCTCGAAC
SEQ_ID_NO: _13	ATAAGGTTC	TGAGAAACCGA	GCTGAGGAGC	TTAAGCTTGA	TTTTGGAGTT
	1401				1450
SEQ_ID_NO: __1	TGGAGAAAGG	AATTGGATGA	ACAAAAAATG	AAGTTCCCGT	TGAGCTTTAA
SEQ_ID_NO: __3	TGGAGAAAGG	AATTGGATGA	ACAAAAAATG	AAGTTCCCGT	TGAGCTTTAA
SEQ_ID_NO: _11	TGGAGAAAGG	AATTGGATGA	ACAAAAAATG	AAGTTCCCGT	TGAGCTTTAA
SEQ_ID_NO: __5	TGGAGGAAGG	AATTGGATGA	GCAAAAAGTT	AAGTATCCGT	TGAGTTTTAA
SEQ_ID_NO: _13	TGGAGGAATG	AGTTGAACGT	ACAGAAACAG	AAGTTTCCGT	TGAGCTTTAA
	1451				1500
SEQ_ID_NO: __1	AACGTTTGGC	GAAGCGATTC	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: __3	AACGTTTGGC	GAAGCGATTC	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: _11	AACGTTTGGC	GAAGCGATTC	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: __5	AACATTTGGC	GAAGCTATTC	CTCCGCAGTA	TGCCATTCAA	GTGCTTGATG
AY124092	GACGTTTGGG	GAAGCTATTC	CTCCACAGTA	TGCGATTAAG	GTCCTTGATG
	1501				1550
SEQ_ID_NO: __1	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCCG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: __3	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCCG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: _11	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCCG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: __5	AGTTAACGGG	TGGGAATGCG	ATTATTAGCA	CTGGGGTCCG	GCAGCATCAG
SEQ_ID_NO: _13	AGTTGACTGA	TGGAAAAGCC	ATAATAAGTA	CTGGTGTCCG	GCAACATCAA
	1551				1600
SEQ_ID_NO: __1	ATGTGGGCTG	CTCAGTTTTA	CAAATACAAC	AAACCTAGAC	AATGGCTGAC
SEQ_ID_NO: __3	ATGTGGGCTG	CTCAGTTTTA	CAAATACAAC	AAACCTAGAC	AATGGCTGAC
SEQ_ID_NO: _11	ATGTGGGCTG	CTCAGTTTTA	CAAATACAAC	AAACCTAGAC	AATGGCTGAC
SEQ_ID_NO: __5	ATGTGGGCTG	CTCAGTTTTA	CAAATACAAC	AAGCCTAGAC	AATGGCTGAC
SEQ_ID_NO: _13	ATGTGGGCGG	CGCAGTTCTA	CAATTACAAG	AAGCCAAGGC	AGTGGCTATC

FIGURA 1
(Hoja 5 de 6)

	1601				1650
SEQ_ID_NO: __1	GTCG.....
SEQ_ID_NO: __3	GTCG.....
SEQ_ID_NO: __11	GTCGGGCGGG	CTAGGGGCAA	TGGGTTTCGG	CCTGCCCGCT	GCTATCGGGG
SEQ_ID_NO: __5	GTCAGGTGGA	CTAGGGGCGA	TGGGTTTTGG	GTTGCCCGCT	GCTATCGGGG
SEQ_ID_NO: __13	ATCAGGAGGC	CTTGGAGCTA	TGGGTTTTGG	ACTTCCTGCT	GCCATTGGAG
	1651				1700
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CGGCCGTTGC	AAGACCTGAT	GCGGTAGTAG	TTGACATCGA	CGGTGACGGA
SEQ_ID_NO: __5	CCGCTGTTGC	AAGACCTGAT	GCGGTAGTAG	TTGATATCGA	TGGTGATGGA
SEQ_ID_NO: __13	CGTCTGTTGC	TAACCCTGAT	GCAATAGTTG	TGGATATTGA	CGGAGATGGA
	1701				1750
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	AGCTTTATGA	TGAATGTTCA	AGAGTTAGCC	ACAATCCGTG	TTGAAAATCT
SEQ_ID_NO: __5	AGCTTTATAA	TGAACGTTCA	AGAGTTAGCC	ACAATCCGTG	TTGAAAATCT
SEQ_ID_NO: __13	AGCTTTATAA	TGAATGTGCA	AGAGCTGGCC	ACAATCCGTG	TAGAGCAACT
	1751				1800
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	GCCGGTTAAG	ATTTTATTAC	TTAAACAACCA	GCATTTGGGT	ATGGTGGTTC
SEQ_ID_NO: __5	TCCTGTTAAG	ATTTTGTTC	TTAAACAATCA	GCATTTGGGT	ATGGTGGTTC
AY124092	TCCAGTGAAG	ATACTCTTAT	TAAACAACCA	GCATCTGGC	ATGGTTATGC
	1801				1850
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	AGTGGGAGGA	TCGGTTTTAC	AAGGCGAATC	GGGCTCATAC	CTACTTAGGA
SEQ_ID_NO: __5	AGTGGGAGGA	TCGGTTTTAC	AAGGCGAATC	GGGCTCATAC	CTACTTAGGA
SEQ_ID_NO: __13	AATGGGAAGA	TCGGTCTAC	AAGGCTAACC	GAGCTCACAC	ATTTCTCGGG
	1851				1900
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	AACCCGTCAA	AAGAGTCGGA	AATATTCCCT	AACATGGTGA	AGTTTGCTGA
SEQ_ID_NO: __5	AATCCGTCAA	AAGAGTCTGA	AATATTCCCT	AACATGTTGA	AGTTTGCTGA
AY124092	GATCCGGCTC	AGGAGGACGA	GATATTCCCG	AACATGTTGC	TGTTTGACGC
	1901				1950
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	AGCCTGTGAT	ATCCCGGCTG	CTCGAGTGAC	CCAAAAGGCG	GATCTACGAG
SEQ_ID_NO: __5	AGCGTGTGAT	ATCCAGCTG	CCCGAGTGAC	CCGGAAGGCA	GATCTACGAG
SEQ_ID_NO: __13	AGCTTGCGGG	ATTCCAGCGG	CGAGGGTGAC	AAAGAAAGCA	GATCTCCGAG
	1951				2000
SEQ_ID_NO: __1
SEQ_ID_NO: __3
SEQ_ID_NO: __11	CAGCTATTCA	GAAGATGTTG	GATACACCCG	GGCCTTACTT	GTTGGATGTG
SEQ_ID_NO: __5	CAGCTATTCA	GAAGATGTTG	GATACACCCG	GGCCTTACTT	GTTGGATGTG
SEQ_ID_NO: __13	AAGCTATTCA	GACAATGCTG	GATACACCAG	GACCTTACCT	GTTGGATGTG

FIGURA 1
(Hoja 6 de 6)

	2001				2050
SEQ_ID_NO: 1
SEQ_ID_NO: 3
SEQ_ID_NO: 11	ATTGTGCCGC	ATCAAGAACA	CGTGTTGCC	ATGATCCCG	CTGGCGGAGG
SEQ_ID_NO: 5	ATCGTGCCCC	ATCAAGAACA	TGTGTTGCC	ATGATCCCG	CTGGTGGAGG
SEQ_ID_NO: 13	ATTTGTCCGC	ACCAAGAACA	TGTGTTGCC	ATGATCCCG	GTGGTGGCAC
	2051				2100
SEQ_ID_NO: 1
SEQ_ID_NO: 3
SEQ_ID_NO: 11	TTTCTCGGAT	GTGATCACCG	AGGGTGATGG	CAGAACGAAA	TATTGA....
SEQ_ID_NO: 5	TTTCATGGAT	GTGATCACCG	AAGGCGACGG	CAGAATGAAA	TATTGAGCTT
SEQ_ID_NO: 13	TTTCAACGAT	GTCATAACGG	AAGGAGATGG	CCGGATTAAA	TACTGA....
	2101				2150
SEQ_ID_NO: 1
SEQ_ID_NO: 3
SEQ_ID_NO: 11
SEQ_ID_NO: 5	CAATGTCACA	TATAGTGTGT	TCTGTAAGCA	GTTTGTCGGT	TATGAAGTTA
SEQ_ID_NO: 13
	2151				2195
SEQ_ID_NO: 1
SEQ_ID_NO: 3
SEQ_ID_NO: 11
SEQ_ID_NO: 5	AATGTTTGT	TGTGTAATT	CGTTCCTGGT	TAAAAAATCA	AGCTT
SEQ_ID_NO: 13

FIGURA 2
(Hoja 1 de 2)

	1				50
SEQ_ID_NO: 2
SEQ_ID_NO: 4
SEQ_ID_NO: 12MA	APPNPSISFK	PPSPAAALPP	RS AFLPRFAL	PITSTTQKRH
SEQ_ID_NO: 6MAAI	PHTNPSITTK	PPSS....PP	RPTFLARFTF	PITSTSHKRH
SEQ_ID_NO: 14	MAAATTTTTT	SSSISFSTKP	SPSSSKSPLP	ISRFSLPFSL	NPNKSSSSSR
	51				100
SEQ_ID_NO: 2
SEQ_ID_NO: 4
SEQ_ID_NO: 12	RLHISNVLS	SKSTTTTTTT	T.....QR	PLPVQPFVSR	YAPDQPRKGA
SEQ_ID_NO: 6	RLHISNVLS	SKPTITHS..	PLPTKSFISR	YAPDQPRKGA
SEQ_ID_NO: 14	RRGIKSSSPS	SISAVLNTTT	NVTTTTPSPTK	PTKPETFISR	FAPDQPRKGA
	101		*		150
SEQ_ID_NO: 2FAYPG	GTSMEIHQAL	TRSSTIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 4FAYPG	GASMEIHQAL	TRSSTIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 12	DVLVEALERE	GVTDVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSSTIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 6	DVLVEALERE	GVTDVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSTTIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 14	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSSSIRNVL	PRHEQGGVFA
	151				200
SEQ_ID_NO: 2	AEGYARASGL	PGVCIATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPMV	AITGQVPRRM
SEQ_ID_NO: 4	AEGYARASGL	PGVCIATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPMV	AITGQVPRRM
SEQ_ID_NO: 12	AEGYARASGL	PGVCIATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPMV	AITGQVPRRM
SEQ_ID_NO: 6	AEGYARASGL	PGVCIATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPMV	AITGQVPRRM
SEQ_ID_NO: 14	AEGYARSSGK	PGICIAATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPLV	AITGQVPRRM
	201				250
SEQ_ID_NO: 2	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 4	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 12	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 6	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 14	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVED	IPRIIEEAFY	LATSGRPGPV
	251				300
SEQ_ID_NO: 2	LIDVPKDIIQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 4	LIDVPKDIIQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 12	LIDVPKDIIQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 6	LIDVPKDIIQ	QLVVPKWDEP	IRLPGYLSRF	PKTENNGQLE	QIVRLYSEAK
SEQ_ID_NO: 14	LVDVPKDIIQ	QLAIPNWEQA	MRLPGYMSRM	PKPPEDSHLE	QIVRLISESK
	301				350
SEQ_ID_NO: 2	RPVLYVGGGC	LNSDDELRRF	VELTGIPVAS	TLMGLGAYPA	SSDLSLHMLG
SEQ_ID_NO: 4	RPVLYVGGGC	LNSDDELRRF	VELTGIPVAS	TLMGLGAYPA	SSDLSLHMLG
SEQ_ID_NO: 12	RPVLYVGGGC	LNSDDELRRF	VELTGIPVAS	TLMGLGAYPA	SSDLSLHMLG
SEQ_ID_NO: 6	RPVLYVGGGC	LNSGDELRRF	VELTGIPVAS	TLMGLGAYPA	SSDLSLHMLG
SEQ_ID_NO: 14	KPVLYVGGGC	LNSDDELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	DDLSLHMLG
	351				400
SEQ_ID_NO: 2	MHGTVYANYA	VDKSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 4	MHGTVYANYA	VDKSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 12	MHGTVYANYA	VDKSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 6	MHGTVYANYA	VDKSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAE
SEQ_ID_NO: 14	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAE

FIGURA 2
(Hoja 2 de 2)

	401				450
SEQ_ID_NO: 2	IGKNKQPHVS	ICGDIKVALQ	GLNKILEEKN	SVTNLDFSTW	RKELDEQKMK
SEQ_ID_NO: 4	IGKNKQPHVS	ICGDIKVALQ	GLNKILEEKN	SVTNLDFSTW	RKELDEQKMK
SEQ_ID_NO: 12	IGKNKQPHVS	ICGDIKVALQ	GLNKILEEKN	SVTNLDFSTW	RKELDEQKMK
SEQ_ID_NO: 6	IGKNKQPHVS	ICGDIKVALQ	GLNKILEVKN	SVTNLDFSNW	RKELDEQKVK
SEQ_ID_NO: 14	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDFGVW	RNELNVQKQK
	451				500
SEQ_ID_NO: 2	FPLSFKTFGE	AIPPQYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 4	FPLSFKTFGE	AIPPQYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 12	FPLSFKTFGE	AIPPQYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 6	YPLSFKTFGE	AIPPQYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 14	FPLSFKTFGE	AIPPQYAIKV	LDELTDGKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYNYKK
	501				550
SEQ_ID_NO: 2	PRQWLTS...
SEQ_ID_NO: 4	PRQWLTS...
SEQ_ID_NO: 12	PRQWLTSGGL	GAMGFGLPAA	IGAAVARPDA	VVVDIDGDGS	FMMNVQELAT
SEQ_ID_NO: 6	PRQWLTSGGL	GAMGFGLPAA	IGAAVARPDA	VVVDIDGDGS	FIMNVQELAT
SEQ_ID_NO: 14	PRQWLSSGGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDGS	FIMNVQELAT
	551				600
SEQ_ID_NO: 2
SEQ_ID_NO: 4
SEQ_ID_NO: 12	IRVENLPVKI	LLLNNQHLM	VVQWEDRFYK	ANRAHTYLG	PSKESEIFPN
SEQ_ID_NO: 6	IRVENLPVKI	LLLNNQHLM	VVQWEDRFYK	ANRAHTYLG	PSKESEIFPN
SEQ_ID_NO: 14	IRVEQLPVKI	LLLNNQHLM	VMQWEDRFYK	ANRAHTFLGD	PAQEDEIFPN
	601				650
SEQ_ID_NO: 2
SEQ_ID_NO: 4
SEQ_ID_NO: 12	MVKFAEACDI	PAARVTQKAD	LRAAIQKMLD	TPGPYLLDVI	VPHQEHVLP
SEQ_ID_NO: 6	MLKFAEACDI	PAARVTRKAD	LRAAIQKMLD	TPGPYLLDVI	VPHQEHVLP
SEQ_ID_NO: 14	MLLFAAACGI	PAARVTKKAD	LREAIQTMLD	TPGPYLLDVI	CPHQEHVLP
	651		671		
SEQ_ID_NO: 2
SEQ_ID_NO: 4
SEQ_ID_NO: 12	IPAGGGFSDV	ITEGDGRTKY	.	.	.
SEQ_ID_NO: 6	IPAGGGFMDV	ITEGDGRMKY	.	.	.
SEQ_ID_NO: 14	IPSGGTFNDV	ITEGDGRIKY	.	.	.

FIGURA 3

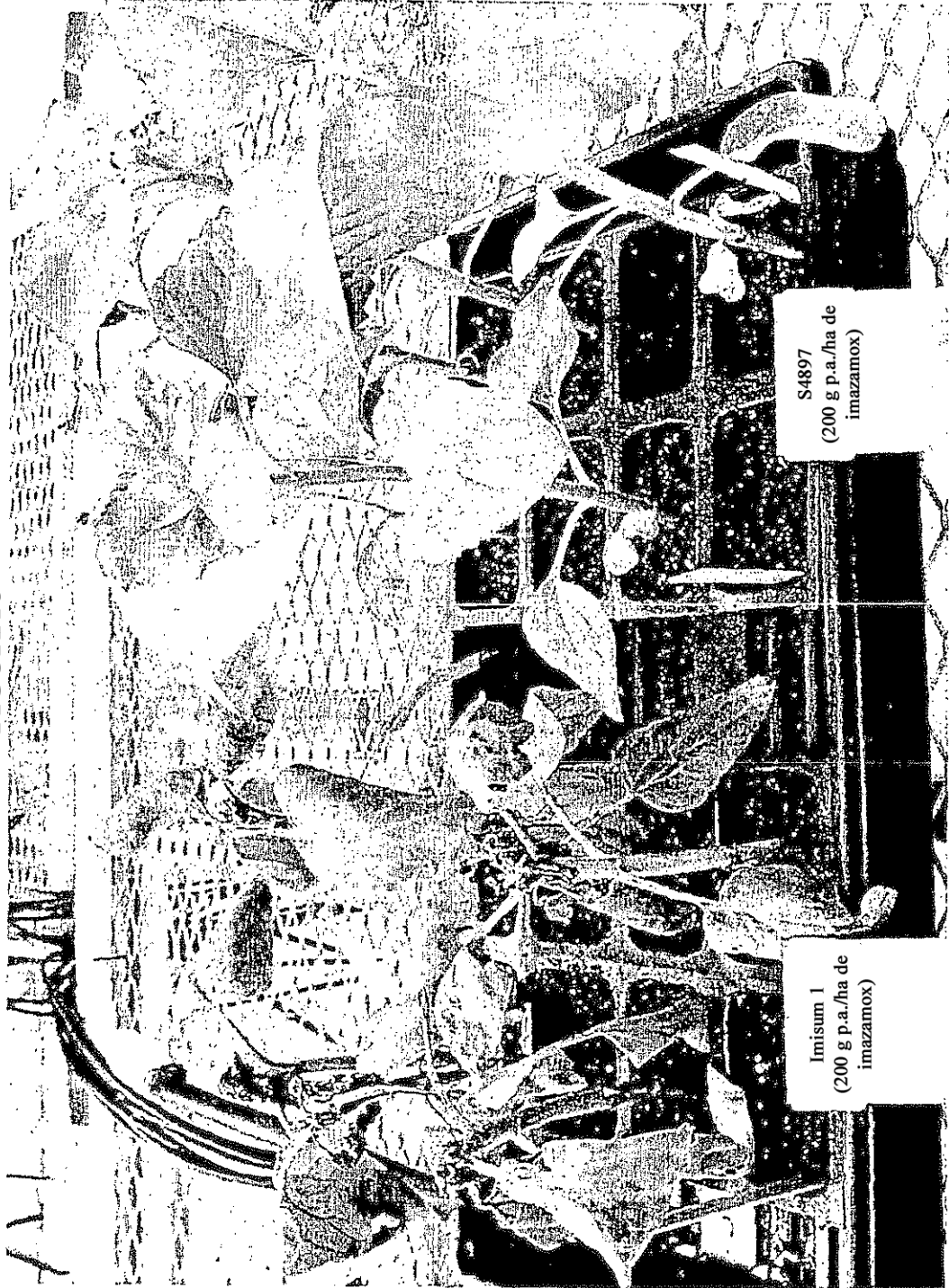


FIGURA 4

Tolerancia a herbicidas de S4897 frente a IMISUN1

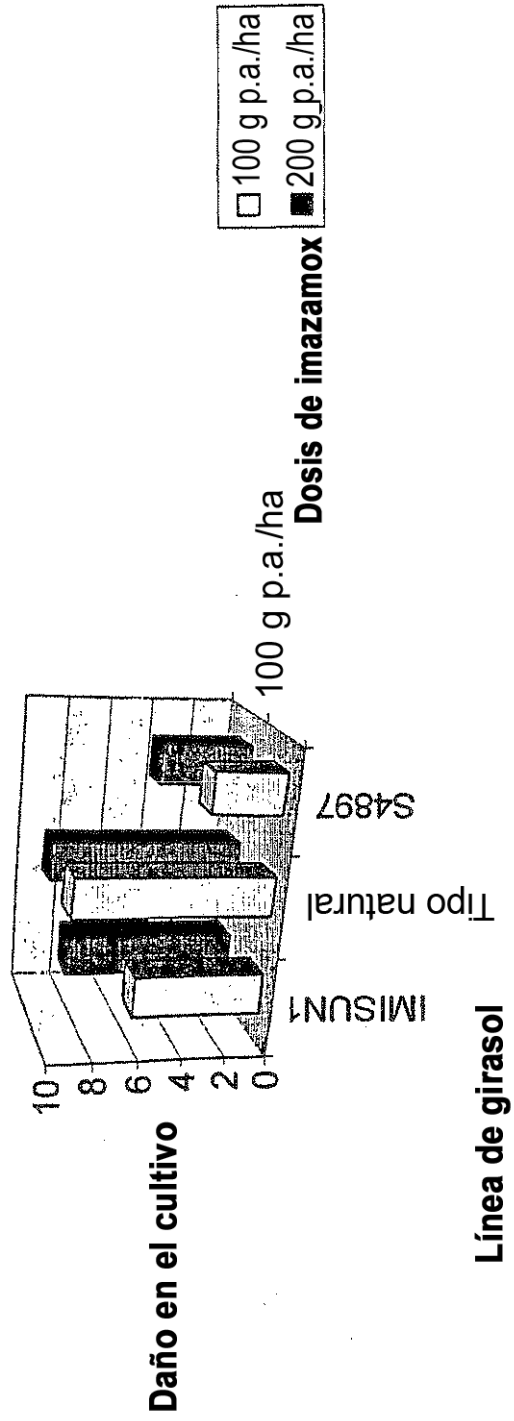


FIGURA 5

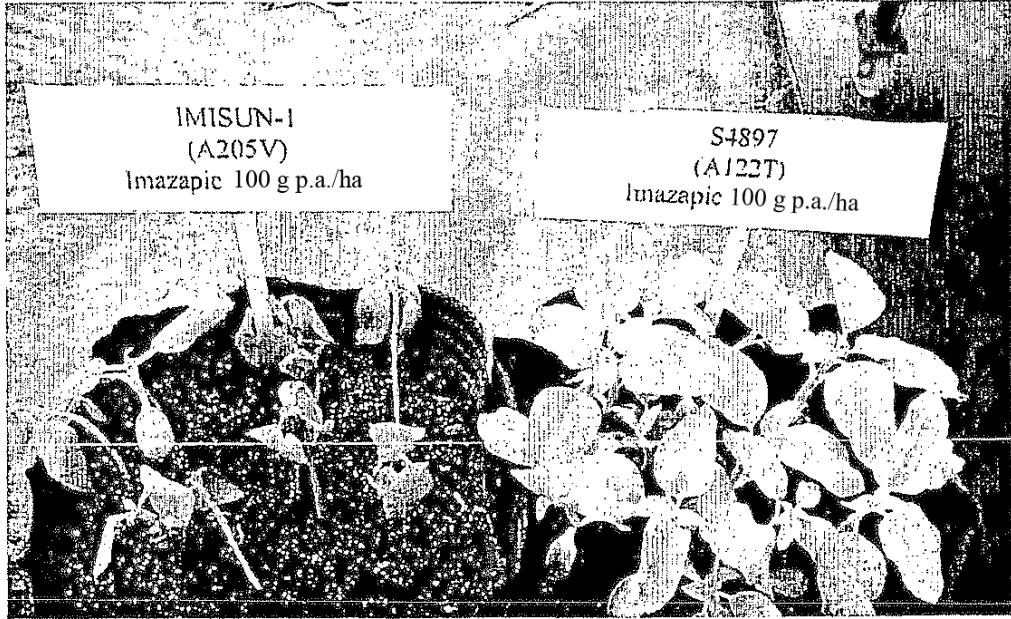


FIGURA 6

14 DDT imazamox 200/150 g p.a./ha

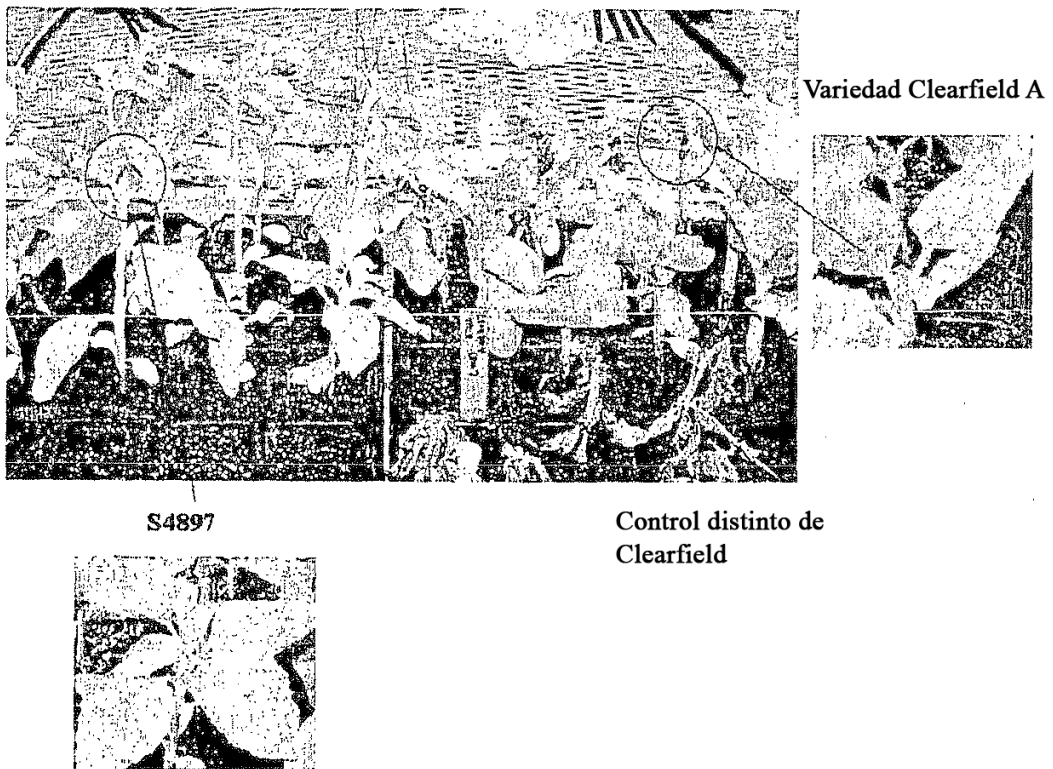


FIGURA 7

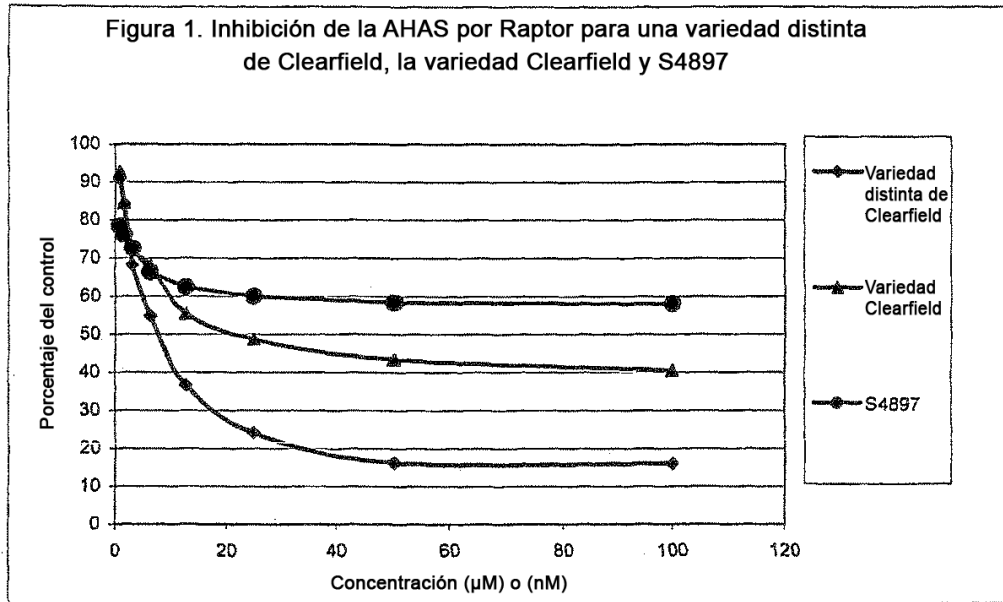


FIGURA 8

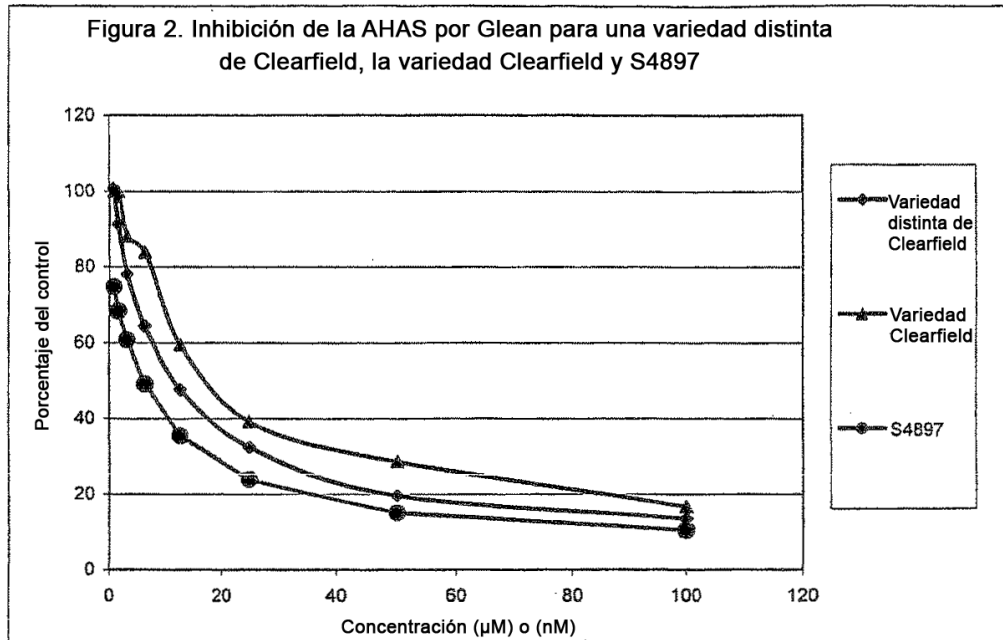


FIGURA 9

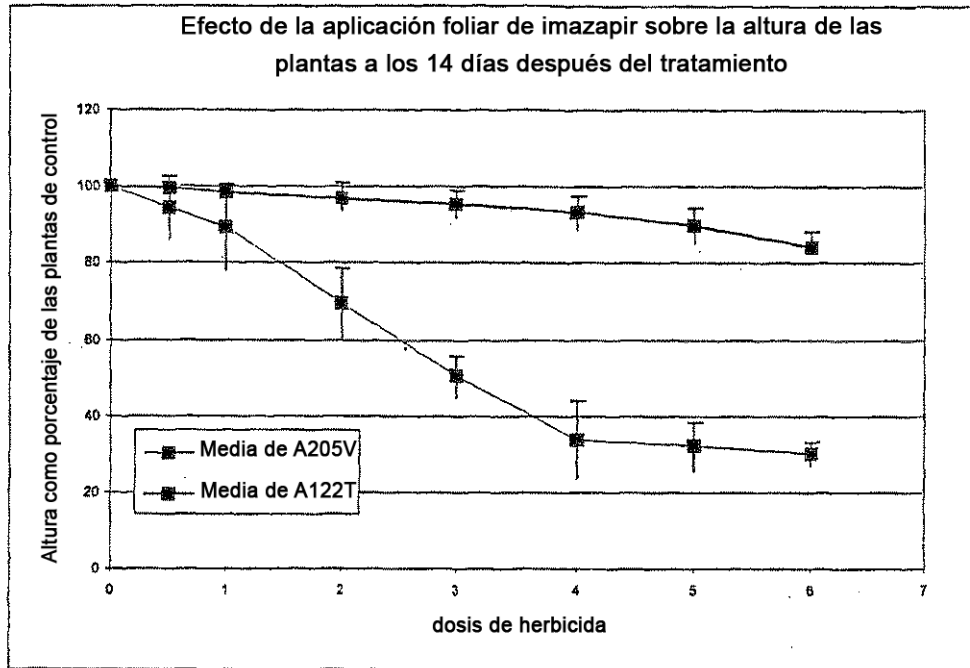


FIGURA 10

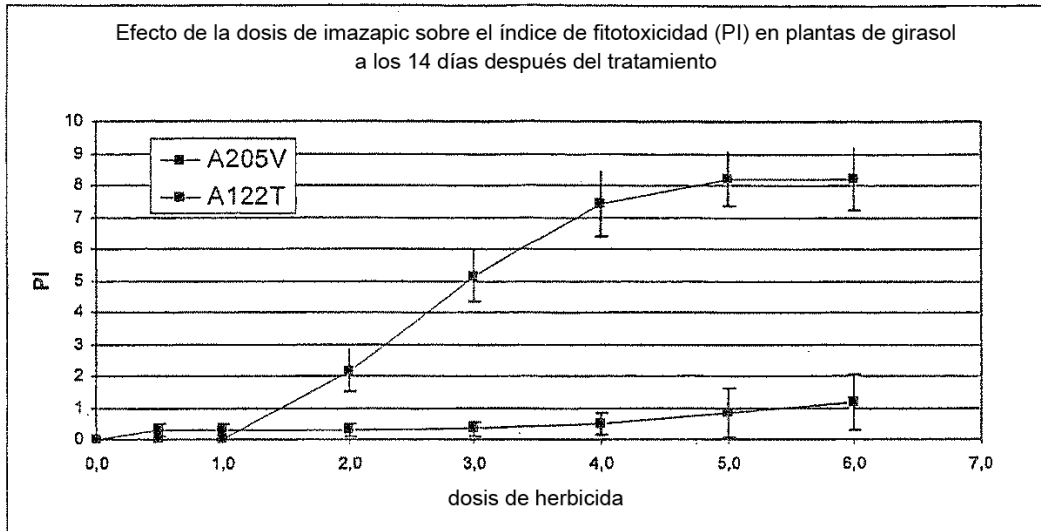


FIGURA 11

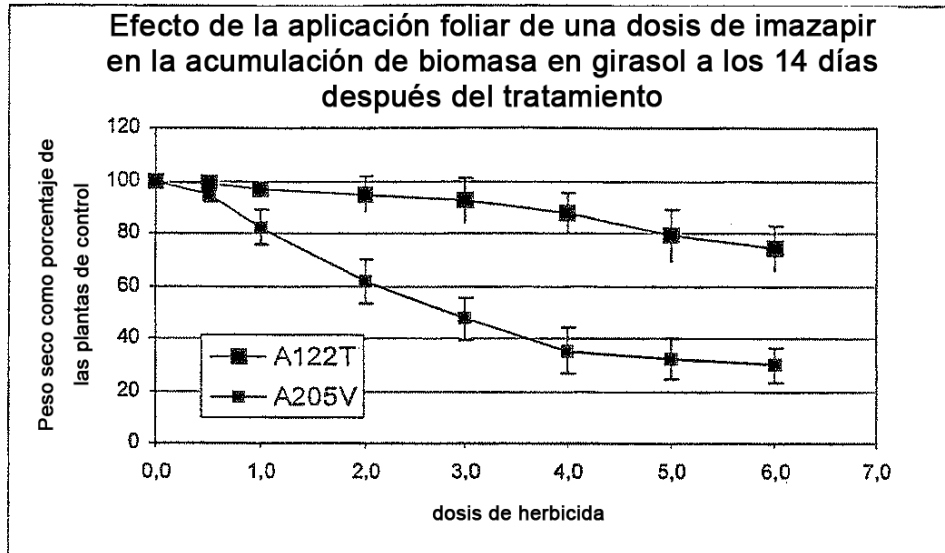


FIGURA 12

