

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 478**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006** **E 12183100 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 2532750**

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

30 Prioridad:

01.07.2005 US 695952 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.09.2016

73 Titular/es:

BASF SE (50.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE y
NIDERA S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

SALA, CARLOS ALBERTO;
ECHARTE, ADRIANA MARIEL;
BULOS, MARIANO;
WHITT, SHERRY R. y
ASCENZI, ROBERT

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 581 478 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 para proteínas de la subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa resistentes a herbicidas y procedimientos de uso

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de la biotecnología agrícola, en particular a plantas de girasol resistentes a herbicidas y a nuevas secuencias de polinucleótido que codifican para proteínas de la subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa de girasol resistentes a herbicidas.

Antecedentes de la invención

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, págs. 227-247). La AHAS es el sitio de acción de cinco familias de herbicidas estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (Tan *et al.* (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 *et al.* (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 *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 94:239-244) y las sulfonilamino-carboniltriázolinonas (Tan *et al.* (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 AHAS, estas familias de herbicidas impiden el crecimiento y desarrollo adicional 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). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorsulfurón, metsulfurón-metilo, sulfometurón-metilo, clorimurón-etilo, tifensulfurón-metilo, tribenurón-metilo, bensulfurón-metilo, nicosulfurón, etametsulfurón-metilo, rimsulfurón, triflursulfurón-metilo, triasulfurón, primisulfurón-metilo, cinosulfurón, amidosulfurón, flazasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón-etilo y halosulfurón.

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 de las plantas y disminuye la necesidad de la preparación del sitio antes del uso de tales compuestos químicos. La pulverización por encima de una especie tolerante deseada también da como resultado 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 tales técnicas de pulverización por encima depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinonas de la vegetación deseada en el área de pulverización.

Entre los principales cultivos agrícolas, algunas especies leguminosas tales 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 tales como el maíz (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) y arroz (Barret *et al.* (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, Nueva York, 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 *et al.* (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546; Brown *et al.* (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* 27:24-29). Otras diferencias relativas a la fisiología de la planta, tales como la absorción y la translocación, pueden desempeñar también un papel importante en la sensibilidad (Shaner y Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

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 *et al.* (1989) *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson *et al.* (1989) *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand *et al.* (1993) *J. Heredity* 84:91-96; Wright y Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620; patente estadounidense n.º 5.545.822). En todos los casos, un único gen nuclear parcialmente dominante confirió resistencia. Previamente también se habían aislado cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinonas tras la mutagénesis de semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Los estudios de heredabilidad confirmaron que un único gen parcialmente dominante confería resistencia. 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 como FS-4 (Newhouse *et al.* (1992)

Plant Physiol. 100:882-886).

Las poblaciones de plantas que se producen de manera 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 que se origina a partir de una población de tipo natural de girasol común (*Helianthus annuus*) como fuente del rasgo de resistencia al herbicida (Miller y Al-Khatib (2004) *Crop Sci.* 44:1037-1038). Previamente, White *et al.* ((2002) *Weed Sci.* 50:432-437) habían notificado que algunos individuos de una población de tipo natural 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 grande de la acetohidroxiácido sintasa (AHASL) de individuos de esta población reveló una mutación puntual que daba como resultado una sustitución del aminoácido Ala por Val en la proteína AHASL de girasol, que corresponde a Ala₂₀₅ en la proteína AHASL de tipo natural de *Arabidopsis thaliana* (White *et al.* (2003) *Weed Sci.* 51:845-853). Previamente, Al-Khatib y Miller (2000) *Crop Sci.* 40:869) notificaron la producción de cuatro líneas de mejora de girasol resistentes a imidazolinonas.

El modelado por ordenador de la conformación tridimensional del complejo inhibidor de AHAS predice varios aminoácidos en la cavidad propuesta de unión del inhibidor como sitios en los que es probable que las mutaciones inducidas confieran resistencia selectiva a imidazolinonas (Ott *et al.* (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 *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368).

También se ha notificado la resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona en numerosas patentes. Las patentes estadounidenses 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 alterado de AHAS para producir resistencia a herbicidas en plantas y divulgan específicamente determinadas líneas de maíz resistentes a imidazolinonas. La patente estadounidense n.º 5.013.659 divulga 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 o bien para resistencia cruzada para imidazolinonas y sulfonilureas o bien para resistencia específica a sulfonilureas, pero no se describe una resistencia específica a imidazolinonas. Las patentes estadounidenses n.º 5.731.180 y n.º 5.767.361 comentan un gen aislado que tiene una sustitución de un solo aminoácido en una secuencia de aminoácidos de AHAS de monocotiledónea de tipo natural que da como resultado resistencia específica a imidazolinonas. Además, se han desarrollado plantas de arroz que son resistentes a herbicidas que interfieren con la AHAS mediante mejora por mutación y también por la selección de plantas resistentes a herbicidas de entre un conjunto de plantas de arroz producidas mediante cultivo de anteras. Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.822, 5.736.629, 5.773.703, 5.773.704, 5.952.553 y 6.274.796.

En las plantas, al igual que en todos los demás organismos examinados, la enzima AHAS está formada por dos subunidades: una subunidad grande (papel catalítico) y una subunidad pequeña (papel regulador) (Duggleby y Pang (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:1-36). La subunidad grande de AHAS (también denominada AHASL en el presente 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 solo nucleótido en la subunidad grande confieren a la enzima un grado de insensibilidad a una o más clases de herbicidas (Chang y Duggleby (1998) *Biochem J.* 333:765-777).

Por ejemplo, el trigo candeal, *Triticum aestivum* L., contiene tres genes homólogos de la subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa. Cada uno de los genes muestra una expresión significativa, según los datos bioquímicos y de respuesta a herbicidas de mutantes en cada uno de los tres genes (Ascenzi *et al.* (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 nivel de 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 imidazolinonas) era la mutación S653(A)N, que indica una sustitución de serina por asparagina en una posición equivalente a la serina en el aminoácido 653 en *Arabidopsis thaliana* (documentos WO 03/01436; WO 03/014357). Esta mutación se debe a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la secuencia de ADN que codifica para la proteína AHASL.

También se sabe que hay múltiples genes AHASL en especies de plantas dicotiledóneas. Recientemente, Kolkman *et al.* ((2004) *Theor. Appl. Genet.* 109:1147-1159) notificaron la identificación, clonación y secuenciación de tres genes AHASL (AHASL1, AHASL2 y AHASL3) de genotipos resistentes a herbicidas y de tipo natural de girasol (*Helianthus annuus* L.). Kolkman *et al.* notificaron que la resistencia a herbicidas era debida o bien a la sustitución Pro197Leu (usando la nomenclatura de las posiciones de los aminoácidos de AHASL de *Arabidopsis*) o bien 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.

Dada su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se prefieren para 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 imidazolinonas de la planta cultivada de interés. Para producir tales variedades resistentes a imidazolinonas, los obtentores de plantas necesitan desarrollar líneas de mejora con el rasgo de resistencia a imidazolinonas. Por lo tanto, se necesitan más líneas y variedades de mejora de plantas de cultivo resistentes a imidazolinonas, así como procedimientos y composiciones para la producción y el uso de líneas y variedades de mejora resistentes a imidazolinonas.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Tal como se expone en la reivindicación 1, la invención proporciona un polinucleótido de subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa de girasol (*AHASL*), en el que dicho polinucleótido *AHASL* codifica para una proteína *AHASL1* tolerante a herbicidas de imidazolinona que comprende una sustitución de alanina a treonina en la posición de aminoácido 7 de SEQ ID NO:2 o, de manera equivalente, en la posición 107 de SEQ ID NO:12; en el que dicha proteína *AHASL1* comprende un polipéptido que es idéntico en al menos el 95% a SEQ ID NO:12; y en el que dicha proteína *AHASL1* confiere a una planta un aumento de la tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo natural de dicha planta.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las demás reivindicaciones.

La siguiente descripción expone detalles referentes tanto a realizaciones cubiertas por las reivindicaciones como a contenido no cubierto por las reivindicaciones. La descripción de contenido no cubierto por las reivindicaciones se divulga sólo para información.

En el presente documento se divulgan plantas de girasol que presentan un aumento de la resistencia a herbicidas en comparación con una planta de girasol de tipo natural. En particular, las plantas de girasol de la divulgación presentan un aumento de la resistencia a herbicidas de imidazolinona en comparación con una planta de girasol de tipo natural. Las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la divulgación comprenden al menos una copia de un gen o polinucleótido que codifica para una subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa (*AHASL*) resistente a herbicidas. Una proteína *AHASL* resistente a herbicidas de este tipo comprende una treonina en la posición de aminoácido 107 o en una posición equivalente. Una planta de girasol resistente a herbicidas de la divulgación puede contener una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más copias de un gen o polinucleótido que codifica para una proteína *AHASL* resistente a herbicidas de la divulgación. Las plantas de girasol de la divulgación incluyen también las semillas y las plantas de la progenie que comprenden al menos una copia de un gen o polinucleótido que codifica para una proteína *AHASL* resistente a herbicidas de la divulgación.

La presente divulgación proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas o una línea de girasol que se denomina S4897 en el presente documento y la progenie y derivados de la misma que comprenden las características de resistencia a herbicidas de S4897. Una línea genética denominada GM40 en el presente documento se ha derivado de S4897 y presenta las características de resistencia a herbicidas de la misma. 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 divulgación 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 las mismas 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 de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y que codifica para la proteína *AHASL1* que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. Al compararla con la secuencia de aminoácidos de la proteína *AHASL1* (SEQ ID NO: 4) que está codificada por un gen *AHASL1* (SEQ ID NO: 3) de una planta de girasol de tipo natural, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 tiene una diferencia de un solo aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos de tipo natural. En la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 hay una treonina en la posición de aminoácido 7. Esta posición corresponde a la posición 107 en la proteína *AHASL1* de girasol de longitud completa codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 12 (número de registro AY541451). En la secuencia de aminoácidos de *AHASL1* de tipo natural de la divulgación (SEQ ID NO: 4), esta posición de aminoácido equivalente presenta una alanina. A menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácido a las que se hace referencia en el presente documento para las proteínas *AHASL* de girasol corresponden a las posiciones de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa expuesta en SEQ ID NO: 12.

La presente divulgación proporciona plantas de girasol resistentes a herbicidas que son la línea de girasol que se denomina GM1606 en el presente 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 divulgación divulga plantas de girasol resistentes a herbicidas con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 y la progenie y derivados de las mismas 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 la misma que comprenden las características de resistencia a herbicidas de GM1606 comprenden en sus genomas un gen *AHASL1* que codifica para 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 las mismas que comprenden las características de resistencia a herbicidas de las plantas de girasol con el número de depósito de patente ATCC PTA-7606 comprenden en sus genomas un gen *AHASL1* que codifica para una proteína AHASL1 que comprende una treonina en la posición 107 de la proteína AHASL1 de girasol de longitud completa.

La presente divulgación divulga además polinucleótidos aislados y polipéptidos aislados para las proteínas AHASL de girasol (*Helianthus annuus*). Los polinucleótidos del presente documento abarcan secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas AHASL resistentes a herbicidas y de tipo natural que incluyen, pero no se limitan a las proteínas codificadas por los genes *AHASL1*, *AHASL2* y *AHASL3*. Las proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas incluyen son proteínas AHASL resistentes a imidazolinonas que comprenden treonina en la posición 107 de una proteína AHASL1 de girasol de longitud completa o una posición equivalente.

Los polinucleótidos de la divulgación abarcan las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3, las secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de dichas secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas con actividad AHAS.

La presente divulgación describe casetes de expresión para expresar los polinucleótidos de la divulgación en plantas, células vegetales, y otras células huésped no humanas. Los casetes de expresión comprenden un promotor expresable en la planta, célula vegetal, u otras células huésped de interés operativamente unido a un polinucleótido de la divulgación que codifica para una proteína AHASL o bien de tipo natural o bien resistente a herbicidas. Si es necesario para dirigir la expresión al cloroplasto, el casete de expresión también puede comprender una secuencia de direccionamiento al cloroplasto operativamente unida que codifica para un péptido de tránsito al cloroplasto para dirigir una proteína AHASL expresada al cloroplasto. Los casetes de expresión de la divulgación encuentran uso en un procedimiento para potenciar la tolerancia a herbicidas de una planta y una célula huésped. El procedimiento implica transformar la planta o célula huésped con un casete de expresión de la divulgación, en el que el casete de expresión comprende un promotor que puede expresarse en la planta o célula huésped de interés y un promotor está operativamente unido a un polinucleótido de la divulgación que codifica para una proteína AHASL resistente a herbicidas de la divulgación. El procedimiento comprende además regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada.

La presente divulgación describe un procedimiento para aumentar la actividad AHAS en una planta que comprende transformar una célula vegetal con un constructo de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal y regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada. La secuencia de nucleótidos se selecciona de aquellas secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas AHASL resistentes a herbicidas o de tipo natural de la divulgación, particularmente las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOS: 1 y 3, y secuencia de nucleótidos que codifica para las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2, y 4, y fragmentos y variantes de las mismas. Una planta producida mediante este procedimiento comprende un aumento de la actividad AHAS o un aumento de la actividad AHAS resistente a herbicidas, en comparación con una planta no transformada.

La presente divulgación describe un procedimiento para producir una planta resistente a herbicidas que comprende transformar una célula vegetal con un constructo de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal y regenerar una planta transformada a partir de dicha célula vegetal transformada. La secuencia de nucleótidos se selecciona de aquellas secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas AHASL resistentes a herbicidas de la divulgación, particularmente la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2., y fragmentos y variantes de las mismas. Una planta resistente a herbicidas producida mediante este procedimiento comprende un aumento de la resistencia a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinone, en comparación con una planta no transformada.

La presente divulgación describe un procedimiento para aumentar la tolerancia a herbicidas en una planta tolerante a herbicidas. El procedimiento encuentra uso para aumentar la resistencia de una planta que ya es resistente a una concentración de un herbicida que destruiría o dañaría significativamente a una planta de tipo natural. Una planta tolerante a herbicidas de este tipo puede ser una planta tolerante a herbicidas que se ha modificado mediante ingeniería genética para presentar tolerancia a herbicidas o una planta tolerante a herbicidas que se desarrolló mediante procedimientos que no implican ADN recombinante tales como, por ejemplo, las plantas de girasol S4897, GM40 y GM1606 de la presente divulgación. El procedimiento comprende transformar una planta tolerante a herbicidas con un constructo de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal y regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada. La secuencia de nucleótidos se selecciona de aquellas secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas AHASL resistentes a herbicidas de la divulgación, particularmente una secuencia de

nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, secuencias de nucleótidos que codifican para una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y fragmentos y variantes de las mismas.

La presente divulgación describe vectores de transformación que comprenden un gen marcador seleccionable de la divulgación. El gen marcador seleccionable comprende un promotor que dirige la expresión en una célula huésped operativamente unido a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína AHASL resistente a herbicidas de la divulgación. El vector de transformación puede comprender adicionalmente un gen de interés que va a expresarse en la célula huésped y también puede incluir, si se desea, una secuencia de direccionamiento al cloroplasto que está operativamente unida al polinucleótido de la invención.

La presente divulgación describe además procedimientos para usar los vectores de transformación de la divulgación para seleccionar células transformadas con el gen de interés. Tales procedimientos implican la transformación de una célula huésped con el vector de transformación, la exposición de la célula a un nivel de un herbicida de imidazolinona que destruiría o inhibiría el crecimiento de una célula huésped no transformada, y la identificación de la célula huésped transformada por su capacidad para crecer en presencia del herbicida. La célula huésped puede ser una célula vegetal y el gen marcador seleccionable comprende un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal.

La presente divulgación describe un procedimiento para controlar malas hierbas en las proximidades de las plantas resistentes a herbicidas de la divulgación, incluyendo las plantas de girasol resistentes a herbicidas descritas anteriormente y plantas transformadas con los polinucleótidos AHASL resistentes a herbicidas de la divulgación. Tales plantas transformadas comprenden en sus genomas al menos un casete de expresión que comprende un promotor que dirige la expresión génica en una célula vegetal, en las que el promotor está operativamente unido a un polinucleótido AHASL de la divulgación. El procedimiento comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida a las malas hierbas y a la planta resistente a herbicidas, en el que la planta resistente a herbicidas presenta un aumento de la resistencia a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona, en comparación con una planta de tipo natural o no transformada.

Las plantas de la presente divulgación 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 derivado mutante, recombinante o 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 progenie 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 que es una 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 divulgación también incluye plantas, órganos vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas que se transforman con al menos un polinucleótido, casete de expresión o vector de transformación de la divulgación. Tales plantas, órganos vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas transformados tienen un aumento de la tolerancia o resistencia a al menos un herbicida, a niveles del herbicida que destruyen o inhiben el crecimiento de una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped no humana no transformados, respectivamente. Las plantas, tejidos vegetales, células vegetales y semillas transformados de la divulgación pueden ser *Arabidopsis thaliana*, girasol y otras plantas de cultivo.

La presente divulgación describe además polipéptidos aislados que comprenden proteínas AHASL de girasol resistentes a imidazolinonas y de tipo natural. Los polipéptidos aislados comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes de dichas secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas con actividad AHAS.

Breve descripción de los dibujos

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

La figura 2 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína AHASL1 de girasol resistente a

herbicidas (SEQ ID NO: 2), la proteína AHASL1 de girasol de tipo natural (SEQ ID NO: 4), el número de registro de GenBank U16280 (SEQ ID NO: 6), el número de registro de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 12) y el número de registro de GenBank AY124092 (SEQ ID NO: 14). El asterisco indica el sitio de la sustitución de un solo aminoácido (Ala por Thr) encontrada en la proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas. Este sitio de la sustitución corresponde a la posición de aminoácido 7 en la secuencia de aminoácidos de AHASL1 de longitud parcial expuesta en SEQ ID NO: 2. La posición equivalente de esta sustitución en la secuencia de aminoácidos de AHASL1 de girasol de longitud completa 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 (lado derecho) 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 en 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 de tipo natural de control no sobrevivieron después del tratamiento por pulverización con imazamox en una dosis de o bien 100 o bien 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 en invernadero tras el tratamiento por pulverización de plantas de girasol IMISUN-1, de tipo natural y S4897 con imazamox en dosis de o bien 100 (columnas claras) o bien 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 de tipo natural. 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 *et al.* (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 en 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 en invernadero descrito en el ejemplo 5.

La figura 7 es la ilustración gráfica de una comparación de la inhibición de 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 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 de nucleótidos y de aminoácidos indicadas en el listado de secuencias adjunto se muestran con las abreviaturas convencionales de una letra para las bases nucleotídicas y el código de tres letras para los aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos satisfacen la convención habitual de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y avanzar hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta 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 de aminoácidos satisfacen la convención habitual de comenzar en el extremo amino-terminal de la secuencia y avanzar hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo carboxilo-terminal.

SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de nucleótidos de longitud parcial que codifica para una proteína AHASL1 resistente a herbicidas de la línea de girasol S4897.

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos de longitud parcial de la proteína AHASL1 resistente a herbicidas codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de nucleótidos de longitud parcial que codifica para la proteína AHASL1 de tipo natural de la línea de girasol BTK47.

SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de aminoácidos de longitud parcial de la proteína AHASL1 de tipo natural codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de número de registro de GenBank U16280.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del número de registro de GenBank U16280.

SEQ ID NO: 7 expone la secuencia de nucleótidos del cebador HA1U409 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 8 expone la secuencia de nucleótidos del cebador HA1L1379 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 9 expone la secuencia de nucleótidos del cebador HA1U1313 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 10 expone la secuencia de nucleótidos del cebador HA1L2131 descrito en el ejemplo 2.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos del número de registro de GenBank AY541451.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del número de registro de GenBank AY541451.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos del número de registro de GenBank AY124092.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del número de registro de GenBank AY124092.

Descripción detallada de la invención

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

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

Dado que la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 no corresponde a la región codificante de longitud completa de una proteína AHASL, la secuencia de aminoácidos codificada por esta que se expone en SEQ ID NO: 2 tampoco es de longitud completa. Para facilitar la comparación con otras secuencias de aminoácidos de AHASL de girasol, las posiciones de aminoácido de las proteínas AHASL de girasol a las que se hace referencia en el presente documento corresponden a las posiciones de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína AHASL1 de girasol codificada por la secuencia con el número de registro 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 de aminoácido 7 de SEQ ID NO: 2 corresponde a la posición de aminoácido 107 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Por lo tanto, la presente divulgación incluye una sustitución de aminoácido que puede usarse para producir proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas, los polinucleótidos que codifican para tales proteínas y plantas, tejidos vegetales, células vegetales y semillas resistentes a herbicidas. Dado que la alanina que se encuentra en la posición de aminoácido 107 en las proteínas AHASL1 de tipo natural 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 de treonina, en lugar de esta misma alanina conservada en otras proteínas AHASL de girasol (por ejemplo AHASL2 y AHASL3) también confiera resistencia a herbicidas. Por lo tanto, un polinucleótido que codifica para una proteína AHASL de girasol puede mutarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, como por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, para producir un polinucleótido de girasol que codifica para una proteína AHASL con una treonina en la posición 107 o en una posición equivalente. Las secuencias de polinucleótido y las secuencias de aminoácidos codificadas por las mismas correspondientes a los genes *AHASL1*, *AHASL2* y *AHASL3* se exponen en los números de registro 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 los mismos encuentran uso para la producción de plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas resistentes a herbicidas mediante los procedimientos divulgados en el presente documento.

La presente divulgación abarca adicionalmente polinucleótidos *AHASL2* y *AHASL3* de girasol aislados que codifican para las proteínas AHASL2 y AHASL3 resistentes a herbicidas, respectivamente.

En tales proteínas AHASL2 y AHASL3 resistentes a herbicidas, el aminoácido en la posición 107 o en una posición equivalente es treonina.

La divulgación se refiere además a moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas de la subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa (*AHASL*) y a tales proteínas AHASL. La divulgación divulga el aislamiento y la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica para una proteína AHASL1 de girasol resistente a herbicidas a partir de una planta de girasol resistente a herbicidas producida mediante mutagénesis química de plantas de girasol de tipo natural. Las proteínas AHASL1 de girasol resistentes a herbicidas de la divulgación presentan una sustitución de alanina por treonina en la posición 107 o en una posición equivalente de sus secuencias de aminoácidos respectivas, en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo natural correspondiente. La divulgación divulga además el aislamiento y la secuencia de nucleótidos de una molécula de polinucleótido que codifica para una proteína AHASL1 de girasol de tipo natural.

La presente divulgación describe moléculas de polinucleótido aisladas que codifican para proteínas AHASL de girasol (*Helianthus annuus* L.). Específicamente, la divulgación incluye moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden: las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3, las secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas AHASL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de tales secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas AHASL funcionales.

Las moléculas de polinucleótido AHASL resistentes a herbicidas aisladas de la divulgación comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas AHASL resistentes a herbicidas. Tales moléculas de polinucleótido pueden usarse en constructos de polinucleótido 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 constructos de polinucleótido pueden usarse en casetes de expresión, vectores de expresión, vectores de transformación, plásmidos y similares. Las plantas transgénicas obtenidas tras la transformación con tales constructos de polinucleótido muestran un aumento de la resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS tales como, por ejemplo, herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea.

Las composiciones de la divulgación incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas AHASL. En particular, la presente divulgación proporciona moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 2 y 4 y fragmentos y variantes de las mismas que codifican para polipéptidos que comprenden actividad AHAS. Además se proporcionan polipéptidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de polinucleótido descrita en el presente documento, por ejemplo, aquellas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes de las mismas que codifican para polipéptidos que comprenden actividad AHAS.

La divulgación abarca composiciones aisladas o sustancialmente purificadas de ácido nucleico o proteína. Una molécula de polinucleótido o proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma no contiene sustancial o esencialmente componentes que normalmente acompañan o interaccionan con la molécula de polinucleótido o proteína, tal como se encuentran en su entorno natural. Por lo tanto, una molécula de polinucleótido 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. Un ácido nucleico "aislado" puede no contener secuencias

(preferiblemente 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 deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, la molécula de polinucleótido 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 de nucleótidos que flanquean naturalmente a la molécula de polinucleótido 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 divulgación o una porción biológicamente activa de la misma se produce de manera recombinante, preferiblemente 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 divulgación describe polipéptidos aislados que comprenden proteínas AHASL. Los polipéptidos aislados comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3 y fragmentos y variantes funcionales de dichas secuencias de aminoácidos que codifican para 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.

Los procedimientos divulgados en el presente documento pueden implicar 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 de tipo natural.

Las plantas tolerantes a herbicidas de la divulgación pueden comprender una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Con "proteína AHASL tolerante a herbicidas" o "proteína AHASL resistente a herbicidas" se pretende indicar que una proteína AHASL de este tipo muestra mayor actividad AHAS respecto a la actividad AHAS de una proteína AHASL de tipo 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 que se sabe que inhibe la actividad AHAS de la proteína AHASL de tipo natural. Además, la actividad AHAS de una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas de este tipo puede denominarse en el presente documento como actividad AHAS "tolerante a herbicidas" o "resistente a herbicidas".

En el presente documento, 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 imidazolinonas" y "resistencia a imidazolinonas" se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente a los términos "tolerante a imidazolinonas" y "tolerancia a imidazolinonas", respectivamente.

La divulgación 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 para 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.

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 la misma con una secuencia de nucleótidos que codifica para 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 que se produce de manera natural o inducida en un gen AHASL endógeno en el genoma de una planta o de un progenitor de la misma.

La presente divulgación describe plantas, tejidos vegetales, células vegetales 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 del herbicida puede ser 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 vegetal, célula vegetal o célula huésped de tipo natural similar, pero esta cantidad no destruye o inhibe tan intensamente el crecimiento de las plantas, tejidos vegetales, células vegetales y células huésped resistentes a herbicidas de la presente divulgación. Normalmente, 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 de este tipo la conocen los expertos en la técnica.

Con "planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped de tipo natural similar" se pretende indicar una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped, respectivamente, que carece de las características de resistencia a herbicidas y/o de un polinucleótido particular de la divulgación divulgado en el presente documento. Por lo tanto, el

uso del término “de tipo natural” no pretende implicar que una planta, tejido vegetal, célula vegetal u otra célula huésped carece de ADN recombinante en su genoma y/o no tiene características de resistencia a herbicidas diferentes de las divulgadas en el presente documento.

Según se usa en el presente 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 la misma. 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 hipocótilo, un epicótilo, 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.

Las plantas de la presente divulgación 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 de este tipo puede producirse mediante 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 progenie que comprende al menos una porción del ADN recombinante de al menos una planta transgénica progenitora también es una planta transgénica.

La presente divulgación describe la línea de girasol resistente a herbicidas que en el presente documento se denomina S4897 y la progenie y derivados de la misma 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 divulgación proporciona además la línea de girasol resistente a herbicidas que en el presente 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 divulgación describe plantas de girasol resistentes a herbicidas producidas mediante mejora por mutación. Las plantas de girasol de tipo natural se mutagenizaron mediante la exposición de las plantas a un mutágeno, en particular un mutágeno químico, más en particular metanosulfonato de etilo (EMS). Sin embargo, la presente divulgación no se limita a las plantas de girasol resistentes a herbicidas producidas mediante 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 divulgadas en el presente documento. Tales procedimientos de mutagénesis pueden implicar, por ejemplo, el uso de uno o más de los mutágenos siguientes: radiación, tal como rayos X, rayos gamma (por ejemplo, cobalto 60 o cesio 137), neutrones (por ejemplo, producto de la fisión nuclear de uranio 235 en un reactor atómico), radiación beta (por ejemplo, emitida por radioisótopos tales como fósforo 32 o carbono 14) y radiación ultravioleta (preferiblemente de 2.500 a 2.900 nm) y mutágenos químicos tales como análogos de bases (por ejemplo, 5-bromouracilo), compuestos relacionados (por ejemplo, 8-etoxicafeína), antibióticos (por ejemplo, estreptonigrina), agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas de azufre, mostazas de nitrógeno, epóxidos, etilenaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nitroso o acridinas. Las plantas resistentes a herbicidas también pueden producirse mediante procedimientos de cultivo tisular para seleccionar células vegetales que comprenden mutaciones de resistencia a herbicidas y después regenerar plantas resistentes a herbicidas a partir de las mismas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.773.702 y 5.859.348.

Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la mejora por mutación en “Principles of Cultivar Development” Fehr, 1993, Macmillan Publishing Company.

El análisis del gen *AHASL1* de las plantas de girasol de las líneas S4897 y GM1606 reveló la mutación que da como resultado la sustitución por una treonina de la alanina que se encuentra en la posición de aminoácido 7 en la secuencia de aminoácidos de *AHASL1* de tipo natural de SEQ ID NO: 4. La posición de aminoácido 7 en SEQ ID

NO: 2 y 4 corresponde a la posición de aminoácido 107 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de una proteína AHASL1 de girasol expuesta en SEQ ID NO: 12. Por lo tanto, la sustitución de la alanina en la posición de aminoácido 107 o en una posición equivalente de una proteína AHASL por treonina 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 divulga en el ejemplo 6 más adelante, la alanina en la posición de aminoácido 107 está dentro de una región conservada de las proteínas AHASL. De manera similar, se han divulgado 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 de este tipo. Por consiguiente, las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la divulgación incluyen, aquellas plantas de girasol que comprenden en sus genomas al menos una copia de un polinucleótido AHASL que codifica para una proteína AHASL resistente a herbicidas que comprende una treonina en la posición de aminoácido 107 o en una posición equivalente.

Las plantas de girasol de la divulgación incluyen además plantas que comprenden una treonina en la posición de aminoácido 107 o en una posición equivalente, respecto a la proteína AHASL de tipo natural, y una o más sustituciones de aminoácidos adicionales en la proteína AHASL, respecto a la proteína AHASL de tipo natural, en las que una planta de girasol de este tipo presenta un aumento de la resistencia a al menos un herbicida en comparación con una planta de girasol de tipo natural. Tales plantas de girasol comprenden proteínas AHASL que comprenden una treonina en la posición de aminoácido 107 o en una posición equivalente y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en: glutamina o serina en la posición de aminoácido 182 o en una posición equivalente; una isoleucina o un aminoácido distinto de treonina en la posición de aminoácido 188 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición de aminoácido 190 o en una posición equivalente; una leucina en la posición de aminoácido 559 o en una posición equivalente y una asparagina, treonina, fenilalanina o valina en la posición de aminoácido 638 o en una posición equivalente.

La presente divulgación describe proteínas AHASL con sustituciones de aminoácidos en posiciones particulares dentro de regiones conservadas de las proteínas AHASL de girasol divulgadas en el presente documento. Además, los expertos reconocerán que tales posiciones de aminoácido pueden variar dependiendo de si se añaden o se eliminan aminoácidos, por ejemplo, del extremo N-terminal de una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la divulgación abarca las sustituciones de aminoácidos en la posición indicada o en una posición equivalente (por ejemplo, "la posición de 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 de aminoácido de ejemplo. Tales regiones conservadas se conocen en la técnica (véase la tabla 4 más adelante) o pueden determinarse mediante alineamientos de secuencias múltiples según se divulga en el presente documento o mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Además, la presente divulgación describe 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 de aminoácido 107 y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en: una glutamina o serina en la posición de aminoácido 182 o en una posición equivalente; una isoleucina u otro aminoácido distinto de treonina en la posición de aminoácido 188 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición de aminoácido 190 o en una posición equivalente; un aspartato o valina en la posición de aminoácido 190 o en una posición equivalente; una leucina en la posición de aminoácido 559 o en una posición equivalente, y una asparagina, treonina, fenilalanina o valina en la posición de aminoácido 638 o en una posición equivalente. La divulgación describe además polinucleótidos aislados que codifican para tales polipéptidos AHASL, así como casetes de expresión, vectores de transformación, células huésped transformadas, plantas transformadas y procedimientos que comprenden tales polinucleótidos.

La presente divulgación describe procedimientos para aumentar la tolerancia o la resistencia de una planta, un tejido vegetal, una célula vegetal u otra célula huésped a al menos un herbicida que interfiere con la actividad de la enzima AHAS. Un herbicida de este tipo puede ser un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriaolinona o una mezcla de los mismos. Un herbicida de este tipo puede ser un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea o una mezcla de los mismos. Los herbicidas de imidazolinona incluyen, pero no se limitan a PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquín), 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 los mismos: 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-metoximetilnicotínico. Se prefiere en particular el uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metoximetilnicotínico.

Para la presente divulgación, 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, triflursulfurón-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 triazolopirimidina de la divulgación incluyen, pero no se limitan a cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam. Los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato incluyen, pero no se limitan a, bispiribac, piritiobac, piriminobac, piribenzoxim y piriftalid. Los herbicidas de sulfonilamino-carbonil triazolinona incluyen, pero no se limitan a, flucarbazona y propoxycarbazona.

Se reconoce que los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato están estrechamente relacionados con los herbicidas de pirimidiniltiobenzoato y se generalizan con el encabezado de este último nombre por la Weed Science Society de America. Por consiguiente, los herbicidas de la presente divulgación incluyen además herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, incluyendo, pero sin limitarse a, los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato descritos anteriormente.

La presente divulgación describe procedimientos para mejorar la actividad AHAS en una planta que comprende transformar una planta con un constructo de polinucleótido que comprende un promotor operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de AHASL1 de la divulgación. Los procedimientos implican introducir un constructo de polinucleótido de la divulgación en al menos una célula vegetal y regenerar una planta transformada a partir de la misma. Los procedimientos implican el uso de un promotor que puede dirigir la expresión génica en una célula vegetal. Un promotor de este tipo puede ser un promotor constitutivo o un promotor preferido de tejido. Los procedimientos encuentran uso en la mejora o el aumento de la resistencia de una planta a al menos un herbicida que interfiere con la actividad de catalítica de la enzima AHAS, particularmente un herbicida de imidazolinona.

La presente divulgación describe casetes de expresión para expresar los polinucleótidos de la divulgación en plantas, tejidos vegetales, células vegetales, y otras células huésped. Los casetes de expresión comprenden un promotor expresable en la planta, tejido vegetal, célula vegetal, u otras células huésped de interés operativamente unidos a un polinucleótido de la divulgación que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para o bien una proteína AHASL1 de longitud completa (es decir que incluye el péptido de tránsito al cloroplasto) o bien una proteína AHASL1 madura (es decir sin el péptido de tránsito al cloroplasto). Si se desea la expresión en los plástidos o cloroplastos de plantas o células vegetales, el casete de expresión también puede comprender una secuencia de direccionamiento al cloroplasto operativamente unida que codifica para un péptido de tránsito al cloroplasto.

Los casetes de expresión de la divulgación encuentran uso en un procedimiento para mejorar la tolerancia a herbicidas de una planta o una célula huésped. El procedimiento implica transformar la planta o célula huésped con un casete de expresión de la divulgación, en el que el casete de expresión comprende un promotor que puede expresarse en la planta o célula huésped de interés y el promotor está operativamente unido a un polinucleótido de la divulgación que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína AHASL1 resistente a imidazolinonas de la divulgación.

El uso del término “constructos de polinucleótido” en el presente documento no pretende limitar la presente invención a constructos de polinucleótido que comprenden ADN. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que constructos de polinucleótido, particularmente polinucleótidos y oligonucleótidos, formados por ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos también pueden emplearse en los procedimientos divulgados en el presente documento. Por tanto, los constructos de polinucleótido de la presente divulgación abarcan todos constructos de polinucleótido que pueden emplearse en los procedimientos de la presente divulgación para transformar plantas incluyendo sin limitación, aquellos formados por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y combinaciones de los mismos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas que se producen de manera natural como análogos sintéticos. Los constructos de polinucleótido de la divulgación también abarcan todas las formas de constructos de polinucleótido incluyendo, pero sin limitarse a, formas monocatenarias, formas bicatenarias, estructuras en horquilla y de tallo y bucle, y similares. Además, los expertos habituales en la técnica entienden que cada secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento también abarca el complemento de esa secuencia de nucleótidos de ejemplo.

Además, se reconoce que los procedimientos de la divulgación pueden emplear un constructo de polinucleótido que puede dirigir, en una planta transformada, la expresión de al menos una proteína, o al menos un ARN, tal como, por ejemplo, un ARN antisentido que es complementario a al menos una porción de un ARNm. Normalmente un constructo de polinucleótido de este tipo está formado por una secuencia codificante para una proteína o un ARN operativamente unido a regiones reguladoras transcripcionales en 5' y 3'. Alternativamente, también se reconoce que los procedimientos de la divulgación pueden emplear un constructo de polinucleótido que no puede dirigir, en una planta transformada, la expresión de una proteína o un ARN.

Además, se reconoce que, para la expresión de un polinucleótido de la divulgación en una célula huésped de interés, el polinucleótido normalmente está operativamente unido a un promotor que puede dirigir la expresión génica en la célula huésped de interés. Los procedimientos de la divulgación para expresar los polinucleótidos en células huésped no dependen de un promotor particular. Los procedimientos abarcan el uso de cualquier promotor que se conoce en la técnica y que puede dirigir la expresión génica en la célula huésped de interés.

La presente divulgación abarca moléculas de polinucleótido *AHASL* y fragmentos y variantes de las mismas. La presente divulgación también abarca las moléculas de polinucleótido que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos. Con "fragmento" se pretende indicar una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína *AHASL* de la divulgación. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos *AHASL* de la divulgación 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 de nucleótidos *AHASL* de la divulgación, que expresan la porción codificada de la proteína *AHASL* (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*) y la evaluación de la actividad de la porción codificada de la proteína *AHASL*. Las moléculas de polinucleótido que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos *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 ó 1.100 nucleótidos o hasta el número de nucleótidos presente en una secuencia de nucleótidos de longitud completa divulgada en el presente documento (por ejemplo, 1.178 nucleótidos para SEQ ID NO: 1 y 3), dependiendo del uso pretendido.

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

La presente divulgación también abarca moléculas de polinucleótido que son variantes de las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento. Las "variantes" de las secuencias de nucleótidos *AHASL* de la divulgación incluyen aquellas secuencias que codifican para las proteínas *AHASL* divulgadas en el presente documento pero que difieren de manera conservativa por la degeneración del código genético. Estas variantes alélicas que se producen de manera 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 indicado más adelante. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen también secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, generadas, por ejemplo, por mutación dirigida al sitio, pero que todavía codifican para la proteína *AHASL* divulgada en la presente divulgación según se comenta más adelante. Generalmente, las variantes de las secuencias de nucleótidos de la divulgación 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 de nucleótidos particular divulgada en el presente documento. Respectivamente, una variante de la secuencia de nucleótidos *AHASL* codificará para una proteína *AHASL* con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente el 95% con la secuencia de aminoácidos de una proteína *AHASL* divulgada en el presente documento.

Además, el experto apreciará que es posible introducir cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de la divulgación, lo que conduce de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas *AHASL* codificadas sin que se altere la actividad biológica de las proteínas *AHASL*. Por lo tanto, es posible crear una molécula de polinucleótido aislada que codifica para 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 de nucleótidos divulgada en el presente 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 convencionales, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. La presente divulgación también abarca tales secuencias de nucleótidos variantes.

Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácido predichos, preferiblemente no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse en la secuencia de tipo natural de una proteína *AHASL* (por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente) sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácido con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). No se llevarán a

cabo tales sustituciones para residuos de aminoácido conservados ni para residuos de aminoácido dentro de un motivo conservado.

Las proteínas de la divulgación pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para tales manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de las proteínas AHASL mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos de mutagénesis y de alteración de la secuencia de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, véanse Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; la patente estadounidense n.º 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 *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., EE. UU.), puede encontrarse una orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés.

Pueden ser deseables sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido por otro de propiedades similares.

Alternativamente, pueden crearse variantes de las secuencias de nucleótidos de AHASL mediante la introducción de mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de AHASL, por ejemplo mediante 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 convencionales.

Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de la divulgación incluyen las secuencias divulgadas en el presente documento así como fragmentos y variantes de las mismas. Las secuencias de nucleótidos de AHASL descritas en el presente documento y los fragmentos y variantes de las mismas 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 para 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 divulgación. Por ejemplo, véanse Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) e Innis *et al.* (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY). La presente divulgación abarca las secuencias de nucleótidos de AHASL aisladas sobre la base de su identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos de AHASL1 expuestas en el presente documento o con fragmentos y variantes de las mismas.

En un procedimiento de hibridación puede usarse toda o parte de una secuencia de nucleótidos de AHASL conocida para el cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas. Los procedimientos de construcción de tales bibliotecas de ADNc y genómicas se conocen en la técnica y se divulgan en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). Las denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADN u otros oligonucleótidos y pueden marcarse con un grupo detectable tal como ³²P o cualquier otro marcador detectable, tal 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 de nucleótidos de AHASL conocida divulgada en el presente documento. Adicionalmente pueden usarse cebadores degenerados diseñados sobre la base de nucleótidos o residuos de aminoácido conservados en una secuencia de nucleótidos de AHASL conocida o una secuencia de aminoácidos codificada por la misma. Normalmente, la sonda comprende una región de la secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, con preferencia 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 o 1.178 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de AHASL de la divulgación o de un fragmento o variante de la misma. La preparación de las sondas se conoce generalmente en la técnica y se divulga en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Por ejemplo, la totalidad de la secuencia AHASL divulgada en el presente documento o una o más porciones de la misma pueden usarse como sonda capaz de hibridar específicamente con las secuencias de AHASL y los ARN mensajeros correspondientes. Las técnicas de hibridación incluyen el cribado por hibridación de bibliotecas de ADN extendidas en placas de cultivo (o bien placas o bien colonias; por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

La hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones rigurosas. Con "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se pretende indicar condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana en un grado mayor de manera detectable que con otras secuencias (por ejemplo, al menos el doble con respecto al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias

diferentes.

Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,5 M de iones de Na, normalmente una concentración de iones de 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 (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60°C para sondas de mayor longitud (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Unas condiciones rigurosas pueden conseguirse también mediante la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las condiciones poco rigurosas a modo de ejemplo incluyen la hibridación con una disolución tampón de formamida a del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37°C y un lavado en SSC de 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M, citrato de trisodio 0,3 M) a de 50 a 55°C. Las condiciones moderadamente rigurosas a modo de ejemplo 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 de 0,5X a 1X a de 55 a 60°C. Las condiciones muy rigurosas a modo de ejemplo incluyen la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en SSC 0,1X a de 60 a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS a de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1%. La duración de la hibridación es generalmente inferior a aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

Normalmente, la especificidad es función de los lavados después de la hibridación, en la que los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, la T_f puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_f = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L$; en la 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_f 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_f se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento incorrecto; por lo tanto, la T_f 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 $\geq 90\%$ de identidad, la T_f puede reducirse 10°C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para quedar aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_f) de la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, unas condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 ó 4°C por debajo de la temperatura de fusión (T_f); unas condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C por debajo de la temperatura de fusión (T_f); unas condiciones poco rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_f). Mediante el uso de la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_f deseada, los expertos habituales entenderán que se describen inherentemente las variaciones en la rigurosidad de las disoluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de apareamiento incorrecto da como resultado una T_f 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) y Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

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

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de nucleótidos, 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 compartidas por las dos secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias pueden tener la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse mediante técnicas similares a las descritas más adelante, permitiendo huecos o no. Normalmente, al calcular el porcentaje de identidad se cuentan las coincidencias exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitativo 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 de este tipo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (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 de nucleótidos homólogas a las moléculas de polinucleótido de la divulgación. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la divulgación. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación puede utilizarse el programa Gapped BLAST según se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) citado anteriormente. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Un algoritmo de este tipo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de programas de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos puede usarse una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. El alineamiento también puede hacerse manualmente mediante inspección.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido con el uso de las secuencias de longitud completa de la divulgación y el uso de 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 idénticas coincidencias de nucleótidos o residuos de aminoácido y un porcentaje idéntico 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 de nucleótidos de AHASL de la divulgación incluyen tanto las secuencias que se producen de manera natural como las formas mutantes, en particular formas mutantes que codifican para proteínas AHASL que comprenden actividad AHAS resistente a herbicidas. De manera similar, las proteínas de la divulgación abarcan tanto proteínas que se producen de manera natural como variaciones y formas modificadas de las mismas. Tales variantes seguirán teniendo la actividad AHAS deseada. Obviamente, las mutaciones que se hagan en el ADN que codifica para la variante no deben poner a la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente 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 espera que las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias de proteína abarcadas por esta divulgación 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 se evaluará mediante ensayos rutinarios. Es decir, la actividad puede evaluarse mediante ensayos de la actividad AHAS. Por ejemplo, véase Singh *et al.* (1988) *Anal. Biochem.* 171:173-179.

Las secuencias de nucleótidos y proteínas variantes también abarcan secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y de recombinación como el intercambio de ADN. Con un procedimiento de este tipo es posible manipular una o más secuencias codificantes de AHASL diferentes para crear una nueva proteína AHASL con las propiedades deseadas. De esta manera se generan bibliotecas 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 este enfoque pueden intercambiarse motivos de secuencia que codifican para un dominio de interés entre el gen AHASL de la divulgación y otros genes AHASL conocidos para obtener un nuevo gen que codifica para una proteína con una propiedad de interés mejorada, como un aumento de K_m , en el caso de una enzima. Las estrategias para tal intercambio de ADN se conocen en la técnica. Por ejemplo, véanse Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4505-4509; Cramer *et al.* (1998) *Nature* 391:288-291, y las patentes estadounidenses n.ºs 5.605.793 y 5.837.458.

Las secuencias de nucleótidos de la divulgación 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 tales como PCR, hibridación y similares para identificar tales secuencias sobre la base de su homología de secuencia con las secuencias expuestas en el presente documento. La presente divulgación abarca las secuencias aisladas sobre la base de su identidad de secuencia con las secuencias de polinucleótido AHASL expuestas en el presente documento en su totalidad o con fragmentos de las mismas. Por lo tanto, la presente divulgación abarca las secuencias de polinucleótido aisladas que codifican para una proteína AHASL y que hibridan en condiciones rigurosas con la secuencia divulgada en el presente documento o con fragmentos de la misma.

En un enfoque de PCR, pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para su uso en reacciones de PCR para amplificar las correspondientes secuencias de ADN 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 se conocen generalmente en la técnica y se divulgan en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véanse también Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York), e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York). Los procedimientos conocidos de PCR incluyen, pero no se limitan a procedimientos que usan cebadores apareados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector, cebadores de apareamiento parcialmente incorrecto y similares.

Las secuencias de polinucleótido *AHASL* de la divulgación se proporcionan en casetes de expresión para la expresión en la planta de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras en 5' y 3' operativamente unidas a una secuencia de polinucleótido *AHASL* de la divulgación. Con "operativamente unido" se pretende indicar una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la secuencia promotora inicia y media en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, operativamente unido significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional que va a transformarse conjuntamente en el organismo. Alternativamente, el/los gen(es) adicional(es) puede(n) proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

Un casete de expresión de este tipo se dota con una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción de la secuencia de polinucleótido *AHASL* esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores seleccionables.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de transcripción, una región de iniciación de la transcripción y la traducción (es decir, un promotor), una secuencia de polinucleótido *AHASL* de la divulgación, y una región de terminación de la transcripción y la traducción (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o foráneo o heterólogo, con respecto al huésped vegetal y/o con respecto a la secuencia de polinucleótido *AHASL* de la divulgación. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" con respecto al huésped vegetal, se pretende indicar que el promotor no se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" con respecto a la secuencia de polinucleótido *AHASL* de la divulgación, se pretende indicar que el promotor no es el promotor nativo o que se produce de manera natural para la secuencia de polinucleótido *AHASL* operativamente unida de la divulgación. Tal como se usa en el presente documento, un gen quimérico comprende una secuencia codificante operativamente unida a una región de iniciación de la transcripción que es heteróloga a la secuencia codificante.

Aunque puede ser deseable expresar los polinucleótidos *AHASL* de la divulgación usando promotores heterólogos, pueden usarse las secuencias de promotor nativas. Tales constructos cambiarían los niveles de expresión de la proteína *AHASL* en la planta o célula vegetal. Por tanto, se altera el fenotipo de la planta o célula vegetal.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de interés *AHASL* operativamente unida, puede ser nativa con el huésped vegetal, o puede derivar de otra fuente (es decir, foránea o heteróloga con respecto al promotor, la secuencia de polinucleótido *AHASL* de interés, el huésped vegetal, o cualquier combinación de las mismas). Están disponibles regiones de terminación convenientes del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase también Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 14:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; y Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Cuando sea apropiado, el/los gen(es) puede(n) optimizarse para un aumento de la expresión en la planta transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse usando codones preferidos para la planta para una mejora de la expresión. Véase, por ejemplo, Campbell y Growri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para un comentario sobre el uso de codones preferidos para el huésped. Están disponibles procedimientos en la técnica para la síntesis de genes preferidos para plantas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.380.831 y 5.436.391, y Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498.

Se conocen modificaciones de secuencia adicionales para mejorar la expresión génica en un huésped celular. Estas incluyen la eliminación de secuencias que codifican para señales de poliadenilación espúreas, señales de sitio de corte y empalme de exón-intrón, repeticiones de tipo transposón y otras de tales secuencias bien caracterizadas que pueden ser perjudiciales para la expresión génica. El contenido de G-C de la secuencia puede ajustarse a niveles promedio para un huésped celular dado, tal como se calcula mediante referencia a genes conocidos expresados en

la célula huésped. Cuando sea posible, se modifica la secuencia para evitar estructuras secundarias de ARNm en horquilla predichas.

También pueden usarse secuencias de nucleótidos para mejorar la expresión génica en los vectores de expresión de plantas. Estas incluyen las secuencias del gen de Adbl, intrón del maíz (Callis *et al.* Genes and Development 1:1183-1200,1987), y secuencias líder, (secuencia W) del virus del mosaico del tabaco (VMT), virus del moteado clorótico del maíz y virus del mosaico de la alfalfa (Gallie *et al.* Nucleic Acid Res. 15:8693-8711, 1987 y Skuzeski *et al.* Plant Mol. Biol. 15:65-79,1990). Se ha mostrado que el primer intrón del locus shrunken-1 del maíz, aumenta la expresión de genes en constructos de genes quiméricos. Las patentes estadounidenses n.ºs 5.424.412 y 5.593.874 divulgan el uso de intrones específicos en constructos de expresión génica, y Gallie *et al.* (Plant Physiol. 106:929-939,1994) también han mostrado que los intrones son útiles para regular la expresión génica en una base específica de tejido. Para mejorar u optimizar adicionalmente la expresión génica de la subunidad grande de AHAS, los vectores de expresión de plantas de la divulgación también pueden contener secuencias de ADN que contienen regiones de unión a la matriz (MAR). Entonces, las células vegetales transformadas con tales sistemas de expresión modificados pueden presentar sobreexpresión o expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos de la divulgación.

Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder en 5' en el constructo de casete de expresión. Tales secuencias líder pueden actuar para mejorar la traducción. Se conocen secuencias líder para la traducción en la técnica e incluyen: secuencias líder de picornavirus, por ejemplo, secuencia líder de EMCV (región no codificante en 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6126-6130); secuencias líder de potivirus, por ejemplo, secuencia líder de VGT (virus del grabado del tabaco) (Gallie *et al.* (1995) Gene 165(2):233-238), secuencia líder de VMEM (virus del mosaico del enanismo del maíz) (Virology 154:9-20), y proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak *et al.* (1991) Nature 353:90-94); secuencia líder no traducida de ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (ARN 4 de VMA) (Jobling *et al.* (1987) Nature 325:622-625); secuencia líder del virus del mosaico del tabaco (VMT) (Gallie *et al.* (1989) en Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, Nueva York), págs. 237-256); y secuencia líder del virus del moteado clorótico del maíz (VMCM) (Lommel *et al.* (1991) Virology 81:382-385). Véase también, Della-Cioppa. *et al.* (1987) Plant Physiol 84:965-968. Otros procedimientos conocidos para mejorar la traducción también pueden utilizarse, por ejemplo, intrones, y similares.

En la preparación del casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN pueden manipularse, de modo que se proporcionen las secuencias de ADN en la orientación adecuada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, pueden emplearse adaptadores o ligadores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar los sitios de restricción convenientes, la eliminación de ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Con este fin, puede estar implicada mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, restricción, apareamiento, nuevas sustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones.

Pueden usarse varios promotores en la práctica de la divulgación. Los promotores pueden seleccionarse sobre la base del resultado deseado. Los ácidos nucleicos pueden combinarse con promotores constitutivos, preferidos de tejido, u otros promotores para la expresión en plantas.

Tales promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor central del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos divulgados en el documento WO 99/43838 y la patente estadounidense n.º 6.072.050; el promotor central 35S del VMCo (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-812); actina del arroz (MeElroy *et al.* (1990) Plant Cell 2: 163-171); ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 y Christensen *et al.* (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) EMBO J. 3:2723-2730); promotor ALS (patente estadounidense n.º 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

Pueden utilizarse promotores preferidos de tejido para seleccionar como diana la expresión de AHASL 1 mejorada dentro de un tejido vegetal particular. Tales promotores preferidos de tejido incluyen, pero no se limitan a, promotores preferidos de hoja, promotores preferidos de raíz, promotores preferidos de semilla y promotores preferidos de tallo. Los promotores preferidos de tejido incluyen Yamamoto *et al.* (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata *et al.* (1997) Plant Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen *et al.* (1997) Mol. Gen Genet. 254(3):337-343; Russell *et al.* (1997) Transgenic Res. 6(2):157-168; Rinehart *et al.* (1996) Plant Physiol. 112(3):1331-1341; Van Camp *et al.* (1996) Plant Physiol. 112(2):525-535; Canevascini *et al.* (1996) Plant Physiol. 112(2):513-524; Yamamoto *et al.* (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:181,196; Orozco *et al.* (1993) Plant Mol Biol. 23(6):1129-1138; Matsuoka *et al.* (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590; y Guevara-Garcia *et al.* (1993) Plant J. 4(3):495-505. Tales promotores pueden ser modificados, si fuera necesario, para una expresión débil.

Los ácidos nucleicos de interés pueden dirigirse al cloroplasto para la expresión. De este modo, cuando el ácido nucleico de interés no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente

una secuencia de direccionamiento al cloroplasto que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido de tránsito al cloroplasto para dirigir el producto génico de interés a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Con respecto a las secuencias de direccionamiento al cloroplasto, "operativamente unida" significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido de tránsito (es decir, la secuencia de direccionamiento al cloroplasto) está unida al polinucleótido AHASL de la divulgación de tal manera que las dos secuencias son contiguas y están en el mismo marco de lectura. Véanse, por ejemplo, Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; y Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481. Aunque las proteínas AHASL de la divulgación incluyen un péptido nativo de tránsito al cloroplasto, puede fusionarse cualquier péptido de tránsito al cloroplasto conocido en la técnica con la secuencia de aminoácidos de una proteína AHASL madura de la divulgación uniendo operativamente una secuencia de direccionamiento al cloroplasto en el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína AHASL madura de la divulgación.

Se conocen en la técnica secuencias de direccionamiento al cloroplasto e incluyen la subunidad pequeña de cloroplasto de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco) (de Castro Silva Filho *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnell *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5-(enolpiruvil)shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Archer *et al.* (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); triptófano sintasa (Zhao *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); plastocianina (Lawrence *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); corismato sintasa (Schmidt *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); y proteína de unión a clorofila a/b captadora de luz (LHBP) (Lamppa *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999). Véanse también Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; y Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

Se conocen en la técnica procedimientos para la transformación de cloroplastos. Véanse, por ejemplo, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El procedimiento se basa en el suministro con pistola génica de ADN que contiene un marcador seleccionable y el direccionamiento del ADN al genoma plastídico a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, puede lograrse la transformación plastídica mediante transactivación de un transgén portado por plastidios silencioso mediante expresión preferida de tejido de una ARN polimerasa codificada de manera nuclear y dirigida a plastidios. Se ha notificado un sistema de este tipo en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Los ácidos nucleicos de interés que van a dirigirse al cloroplasto pueden optimizarse para la expresión en el cloroplasto para tener en cuenta diferencia en el uso de codones entre el núcleo vegetal y este orgánulo. De este modo, los ácidos nucleicos de interés pueden sinterizarse usando codones preferidos de cloroplasto. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.380.831.

Según se divulga en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de AHASL de la divulgación encuentran uso para mejorar la tolerancia a herbicidas de plantas que comprenden en sus genomas un gen que codifica para una proteína AHASL tolerante a herbicidas. Un gen de este tipo puede ser un gen endógeno. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos de la presente divulgación pueden mezclarse con cualquier combinación de secuencias de polinucleótido de interés con el fin de crear plantas con un fenotipo deseado. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden mezclarse con otros polinucleótidos cualesquiera que codifican para polipéptidos con actividad pesticida y/o insecticida tales como, por ejemplo, las proteínas de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (descrita en las patentes estadounidenses n.ºs 5.366.892, 5.747.450, 5.737.514, 5.723.756, 5.593.881 y en Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109). Las combinaciones generadas pueden incluir también múltiples copias de uno cualquiera de los polinucleótidos de interés.

Se reconoce que con estas secuencias de nucleótidos, pueden construirse construcciones antisentido, complementarias a al menos una porción del ARN mensajero (ARNm) para las secuencias de polinucleótido AHASL. Se construyen nucleótidos antisentido para hibridar con el ARNm correspondiente. Pueden realizarse modificaciones de las secuencias antisentido siempre que las secuencias hibriden con e interfieran con la expresión del ARNm correspondiente. De este modo, pueden usarse construcciones antisentido con una identidad de secuencia del 70%, preferiblemente el 80%, más preferiblemente el 85% con las secuencias antisentido correspondientes. Además, pueden usarse porciones de los nucleótidos antisentido para perturbar la expresión del gen diana. Generalmente, pueden usarse secuencias de al menos 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 200 nucleótidos, o más.

Las secuencias de nucleótidos de la presente divulgación también pueden usarse en la orientación sentido para suprimir la expresión de genes endógenos en plantas. Se conocen en la técnica procedimientos para suprimir la expresión génica en plantas usando secuencias de nucleótidos en la orientación sentido. Los procedimientos implican generalmente transformar plantas con un constructo de ADN que comprende un promotor que dirige la expresión en una planta operativamente unido a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos que corresponde al transcrito del gen endógeno. Normalmente, una secuencia de nucleótidos de este tipo tiene una identidad de secuencia sustancial con la secuencia del transcrito del gen endógeno, por ejemplo una identidad de

secuencia mayor de aproximadamente el 65%, una identidad de secuencia mayor de aproximadamente el 85%, o una identidad de secuencia mayor de aproximadamente el 95%. Véanse, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.283.184 y 5.034.323.

Aunque los polinucleótidos AHASL1 resistentes a herbicidas de la divulgación encuentran uso como genes marcadores seleccionables para la transformación de plantas, los casetes de expresión de la divulgación pueden incluir otro gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Se utilizan genes marcadores seleccionables, incluyendo los de la presente divulgación, para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican para resistencia a antibióticos, tales como aquellos que codifican para neomicina fosfotransferasa II (NEO) e higromicina fosfotransferasa (HPT), así como genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas, tales como glufosinato de amonio, bromoxinil, imidazolinonas y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Véanse generalmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao *et al.* (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley *et al.* (1980) en *The Operon*, págs. 177-220; Hu *et al.* (1987) *Cell* 48:555-566; Brown *et al.* (1987) *Cell* 49:603-612; Figge *et al.* (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle *et al.* (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) tesis doctoral, Universidad de Heidelberg; Reines *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb *et al.* (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt *et al.* (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) tesis doctoral, Universidad de Heidelberg; Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva *et al.* (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka *et al.* (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill *et al.* (1988) *Nature* 334:721-724.

La lista anterior de genes marcadores seleccionables no pretende ser limitativa. Puede usarse cualquier gen marcador seleccionable.

Las moléculas de polinucleótidos aisladas que comprenden secuencia de nucleótidos que codifican para las proteínas AHASL de la divulgación pueden usarse en vectores para transformar plantas de modo que las plantas creadas presenten un aumento de la resistencia a herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona. Las moléculas de polinucleótido AHASL aisladas de la divulgación pueden usarse en vectores solas o en combinación con una secuencia de nucleótidos que codifica para la subunidad pequeña de la enzima AHAS (AHASS) confiriendo resistencia a herbicidas en plantas. Véase, la patente estadounidense n.º 6.348.643.

La divulgación también se refiere a un vector de expresión de plantas que comprende un promotor que dirige la expresión en una planta operativamente unido a una molécula de polinucleótido aislada de la divulgación. La molécula de polinucleótido aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína AHASL, particularmente una proteína AHASL que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 2 ó 4, o un fragmento funcional y variante de la misma. El vector de expresión de plantas de la divulgación no depende de un promotor particular, sólo de que tal promotor pueda dirigir la expresión génica en una célula vegetal. Los promotores preferidos incluyen promotores constitutivos y promotores preferidos de tejido.

Los vectores de transformación de la divulgación pueden usarse para producir plantas transformadas con un gen de interés. El vector de transformación comprenderá un gen marcador seleccionable de la divulgación y un gen de interés que va a introducirse y expresarse normalmente en la planta transformada. Un gen marcador seleccionable de este tipo comprende un polinucleótido AHASL resistente a herbicidas de la divulgación operativamente unido a un promotor que dirige la expresión en una célula huésped. Para su uso en plantas y células vegetales, el vector de transformación comprende un gen marcador seleccionable que comprende un polinucleótido AHASL resistente a herbicidas de la divulgación operativamente unido a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal.

Los genes de interés de la divulgación varían dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, diversos cambios en el fenotipo pueden ser de interés incluyendo la modificación de la composición de ácidos grasos en una planta, la alteración del contenido de aminoácidos de una planta, la alteración de los mecanismos de defensa frente a insectos y/o patógenos de una planta, y similares. Pueden lograrse estos resultados proporcionando la expresión de productos heterólogos o el aumento de la expresión de productos heterólogos en planta. Alternativamente, pueden lograrse los resultados proporcionando una reducción de la expresión de uno o más productos endógenos, particularmente enzimas o cofactores en la planta. Estos cambios dan como resultado un cambio en el fenotipo de la planta transformada.

Los genes de interés pueden incluir genes de resistencia a insectos tales como, por ejemplo, genes de proteínas de toxina de *Bacillus thuringiensis* (patentes estadounidenses n.^{os} 5.366.892; 5.747.450; 5.736.514; 5.723.756; 5.593.881; y Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109).

Las proteínas o polipéptidos AHASL de la divulgación pueden purificarse a partir de, por ejemplo, plantas de girasol y pueden usarse en composiciones. Además, puede usarse una molécula de polinucleótido aislada que codifica para

una proteína AHAS de la divulgación para expresar una proteína AHASL de la divulgación en un microbio tal como *E. coli* o una levadura. La proteína AHASL expresada puede purificarse a partir de extractos de *E. coli* o levadura mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos habituales en la técnica.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para crear una planta transgénica que es resistente a herbicidas, que comprende transformar una planta con un vector de expresión de plantas que comprende un promotor que dirige la expresión en una planta operativamente unido a una molécula de polinucleótido aislada de la divulgación. La molécula de polinucleótido aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína AHASL de la divulgación, particularmente una proteína AHASL que comprende: una secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 2, una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1, o un fragmento funcional y variante de dichas secuencias de aminoácidos.

La divulgación se refiere a las plantas no transgénicas de girasol, a plantas transgénicas producidas mediante los métodos de la divulgación y a la progenie y otros descendientes de tales plantas no transgénicas y plantas 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 divulgación, en particular aquellos que codifican para proteínas AHASL resistentes a herbicidas, encuentran uso en procedimientos para mejorar la resistencia de plantas tolerantes a herbicidas. Las plantas tolerantes a herbicidas comprenden una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Las plantas tolerantes a herbicidas incluyen tanto plantas transformadas con secuencias de nucleótidos AHASL tolerantes a herbicidas como plantas que comprenden un gen endógeno en su genoma que codifica para una proteína AHASL tolerante a herbicidas. Las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas AHASL tolerantes a herbicidas y las plantas tolerantes a herbicidas que comprenden un gen endógeno que codifica para una proteína AHASL tolerante a herbicidas incluyen los polinucleótidos y las plantas de la presente divulgación y aquellos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses 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.

Tales procedimientos para mejorar la resistencia de plantas tolerantes a herbicidas comprenden transformar una planta tolerante a herbicidas con al menos una construcción de polinucleótido que comprende un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal que está operativamente unido a un polinucleótido AHASL resistente a herbicidas de la divulgación, particularmente el polinucleótido que codifica para una proteína AHASL resistente a herbicidas expuesta en SEQ ID NO: 1, polinucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y fragmentos y variantes de dichos polinucleótidos que codifican para polipéptidos que comprenden actividad AHAS resistente a herbicidas.

Se dispone de numerosos vectores de transformación de plantas y procedimientos para la transformación de plantas. Por ejemplo, véanse An, G. *et al.* (1986) *Plant Physiol.* 81:301-305; Fry, J. *et al.* (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76:767-774; Hinchey *et al.* (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203212:203-212; Cousins *et al.* (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. y Slightom, J. L. (1992) *Gene* 118:255-260; Christou *et al.* (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; D'Halluin *et al.* (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas *et al.* (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29P:119-124; Davies *et al.* (1993) *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 *et al.* (1993) *Plant Sci.* 90:41-52; Guo *Chin Sci. Bull.* 38:2072-2078; Asano *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. y Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo *et al.* (1994) *Plant. J.* 5:583-592; Becker *et al.* (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska *et al.* (1994) *Acta. Physiol. Plant.* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5:17-27; Eapen *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman *et al.* (1994) *Bio-Technology* 12:919923; Ritala *et al.* (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24:317-325, y Wan, Y. C. y Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104:3748.

Los procedimientos de la divulgación implican la introducción de un constructo de polinucleótido en una planta. Con "introducción" se pretende indicar la presentación a la planta del constructo de polinucleótido de tal manera que el constructo adquiere acceso al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la divulgación no dependen de un procedimiento particular para la introducción de un constructo de polinucleótido en una planta, solamente de que el constructo de polinucleótido adquiera acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los procedimientos para la introducción de constructos de polinucleótido en plantas se conocen 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 el constructo de polinucleótido introducido en una planta se integra en el genoma de la planta y es capaz de heredarse por la progenie de la misma. Con "transformación transitoria" se pretende indicar que un constructo de polinucleótido introducido en una planta no se integra en el genoma de la planta.

Para la transformación de plantas y de células vegetales, las secuencias de nucleótidos de la divulgación se insertan mediante técnicas convencionales en cualquier vector conocido en la técnica adecuado para la expresión de las

secuencias de nucleótidos en una planta o en una célula vegetal. La selección del vector depende de la técnica de transformación preferida y de la especie de planta diana que ha de transformarse. Una secuencia de nucleótidos de AHASL1 puede estar unida operativamente a un promotor de plantas que se conoce por la expresión de alto nivel en una célula vegetal y este constructo se introduce entonces en una planta que es susceptible a un herbicida de imidazolinona y se regenera una planta transformada. La planta transformada es tolerante a la exposición a un nivel de un herbicida de imidazolinona que destruiría o dañaría significativamente a una planta no transformada. Este procedimiento puede aplicarse a cualquier especie de planta; sin embargo, lo más beneficioso es cuando se aplica a plantas de cultivo.

Las metodologías para la construcción de casetes de expresión en plantas y para la introducción de ácidos nucleicos foráneos en plantas se conocen generalmente en la técnica y se han descrito previamente. Por ejemplo, el ADN foráneo puede introducirse en las plantas por medio de vectores del plásmido inductor de tumores (Ti). Otros procedimientos para la introducción de ADN foráneo implican el uso de la transformación de protoplastos mediada por PEG, electroporación, microinyección, fibras cortas y biolística o bombardeo de microproyectiles para la absorción directa de ADN. Estos procedimientos se conocen en la técnica (patente estadounidense n.º 5.405.765 concedida a Vasil *et al.*; Bilang *et al.* (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid *et al.*, (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:104-112; Guerche *et al.* (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhauser *et al.* (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36; Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70-73; Howell *et al.* (1980) *Science* 208:1265; Horsch *et al.* (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock *et al.* (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach 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 vegetal 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 de nucleótidos en células vegetales y para la subsiguiente inserción en el genoma de la planta incluyen la microinyección según Crossway *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:320-334, la electroporación según se describe en Riggs *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, la transformación mediada por *Agrobacterium* según se describe en Townsend *et al.*, patente estadounidense n.º 5.563.055, Zhao *et al.*, patente estadounidense n.º 5.981.840, la transferencia génica directa según se describe en Paszkowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722 y la aceleración balística de partículas según se describe, por ejemplo, en Sanford *et al.*, patente estadounidense n.º 4.945.050; Tomes *et al.*, patente estadounidense n.º 5.879.918; Tomes *et al.*, patente estadounidense n.º 5.886.244; Bidney *et al.*, patente estadounidense n.º 5.932.782; Tomes *et al.* (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 *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:923-926; y la transformación de Lec1 (documento WO 00/28058). Véanse también Weissinger *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford *et al.* (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh *et al.* (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); Tomes, patente estadounidense n.º 5.240.855; Buisson *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 5.322.783 y 5.324.646; Tomes *et al.* (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); Klein *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Sloteren *et al.* (1984) *Nature (London)* 311:763-764; Bowen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.736.369 (cereales); Bytebier *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (liliáceas); De Wet *et al.* (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman *et al.* (Longman, Nueva York) págs. 197-209 (polen); Kaeppler *et al.* (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppler *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por fibras cortas); D'Halluin *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li *et al.* (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maíz por medio de *Agrobacterium tumefaciens*).

Los polinucleótidos de la divulgación pueden introducirse en las plantas poniendo estas en contacto con un virus o con ácidos nucleicos virales. Generalmente, tales procedimientos implican la incorporación de un constructo de polinucleótido de la divulgación dentro de una de una molécula de ADN o ARN viral. Se reconoce que una proteína AHASL de la divulgación puede sintetizarse inicialmente como parte de una poliproteína viral, que después puede procesarse mediante proteólisis *in vivo* o *in vitro* para producir la proteína recombinante deseada. Además, se reconoce que los promotores de la divulgación también abarcan promotores utilizados para la transcripción por ARN polimerasas virales. Los procedimientos para la introducción de constructos de polinucleótido en plantas y la expresión de una proteína codificada en los mismos, que implican moléculas de ADN o ARN viral se conocen en la técnica. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 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 *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden dejarse crecer entonces y o bien polinizarse con la misma cepa transformada o bien con cepas diferentes, e identificarse el híbrido resultante con expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada.

Puede ser necesario el crecimiento de dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda de manera estable y después las semillas se recogen para garantizar que se ha conseguido la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta manera, la presente divulgación describe semillas transformadas (también denominadas “semillas transgénicas”) que tienen un constructo de polinucleótido de la divulgación, por ejemplo, un casete de expresión de la divulgación, incorporado de manera estable en su genoma.

La presente divulgación se refiere a la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de especies de planta de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente las especies *Brassica* útiles como fuente de oleaginosas, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), panizo (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum ssp. durum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos micifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles de cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), aceituna (*Olea europaea*), papaya (*Curica papaya*), anacardo (*Amacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prumus amygdalus*), remolachas azucareras (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avenas, cebada, hortalizas, plantas ornamentales y coníferas.

Las plantas de la presente divulgación incluyen plantas de cultivo (por ejemplo, girasol, *Brassica* sp., algodón, remolacha azucarera, soja, cacahuete, alfalfa, cártamo; tabaco, maíz, arroz, trigo, centeno, cebada, triticale, sorgo, mijo, etc.).

Las plantas resistentes a herbicidas de la divulgación tienen utilidad en procedimientos para el control de malas hierbas. Por lo tanto, la presente divulgación describe además un procedimiento para el control de las malas hierbas en las proximidades de una planta resistente a herbicidas de la divulgación. El procedimiento comprende la aplicación de una cantidad eficaz de un herbicida a las malas hierbas y a la planta resistente a herbicidas, en el 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 de tipo natural. En un procedimiento de este tipo para el control de las malas hierbas, las plantas resistentes a herbicidas de la divulgación pueden ser plantas de cultivo, incluyendo, pero sin limitarse a, girasol, alfalfa, *Brassica* sp., soja, algodón, cártamo, cacahuete, tabaco, tomate, patata, trigo, arroz, maíz, sorgo, cebada, centeno, mijo, y sorgo.

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 frente a 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, post-emergencia, antes de plantar o al plantar en áreas que rodean a las plantas descritas en el presente documento o puede usarse una formulación de un herbicida de imidazolinona que contiene otros aditivos. El herbicida puede usarse también como tratamiento de semillas. Los aditivos que se encuentran en una formulación de un herbicida de imidazolinona o sulfonilurea incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de esparcido, agentes adherentes, agentes 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 divulgación describe semillas transgénicas y no transgénicas que presentan un aumento de la tolerancia a al menos un herbicida, en particular un herbicida inhibidor de 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 de polinucleótido de la divulgación que codifica para una proteína AHASL resistente a herbicidas.

La presente divulgación describe procedimientos para la producción de una planta resistente a herbicidas, particularmente una planta de girasol resistente a herbicidas mediante mejora 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 divulgación, incluidas por ejemplo, plantas transgénicas que comprenden al menos una de las moléculas de polinucleótido de la presente divulgación que codifican para 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 plantas de progenie viables (es decir, semillas) al cruzarla con la primera planta. Normalmente, pero no necesariamente, la primera y la segunda plantas son de la misma especie. Los procedimientos de la divulgación 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 plantas. Alternativamente, la progenie del primer cruzamiento o de cualquier cruzamiento subsiguiente puede cruzarse con una tercera planta de una línea o genotipo diferente que o bien la primera o bien la segunda plantas. Los procedimientos de la divulgación pueden implicar adicionalmente la selección de plantas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la primera planta.

La presente divulgación describe además procedimientos para aumentar la resistencia a herbicidas de una planta, en particular una planta de girasol resistente a herbicidas, mediante mejora 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 divulgación, incluidas, por ejemplo, plantas de girasol transgénicas que comprenden al menos una de las moléculas de polinucleótido de la presente divulgación que codifican para una proteína AHAS 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 plantas de progenie viables (es decir, semillas) al cruzarla con la primera planta. Normalmente, pero no necesariamente, la primera y la segunda plantas son de la misma especie. Las plantas de la progenie producidas mediante este procedimiento de la presente divulgación presentan un aumento de la resistencia a un herbicida en comparación con o bien la primera o bien la segunda plantas 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 divulgación 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 o bien la primera o bien 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 o bien la primera o bien la segunda plantas. Los procedimientos de la divulgación 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 divulgación pueden ser transgénicas o no transgénicas. Un ejemplo de una planta de girasol no transgénica que presenta un aumento de la resistencia a imidazolinonas 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 derivado mutante, recombinante o modificado mediante ingeniería genética 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 que es una 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 divulgación también describe plantas, órganos vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas que se transforman con al menos una molécula de polinucleótido, casete de expresión o vector de transformación de la divulgación. Tales plantas, órganos vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas transformados presentan un aumento de la tolerancia o resistencia a al menos un herbicida, a niveles del herbicida que destruyen o inhiben el crecimiento de una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped no humana no transformados, respectivamente. La planta, tejidos vegetales, células vegetales y semillas transformados de la divulgación pueden ser *Arabidopsis thaliana* y plantas de cultivo.

La presente divulgación describe procedimientos que implican el uso de al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste en herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de piridimidinilo xibenzoato, herbicidas de sulfonilamino-carbonil triazolinona y mezclas de los mismos. En estos procedimientos, el herbicida inhibidor de AHAS puede aplicarse mediante 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 AHAS puede transformarse en las formulaciones habituales, por ejemplo, disoluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, polvos finos, pastas y gránulos. La forma de uso depende del fin particular pretendido; en cada caso deberá garantizarse una distribución fina y uniforme del compuesto de

acuerdo con la divulgación.

Las formulaciones se preparan de manera conocida (por ejemplo, véanse como revisión los documentos US 3.060.084, 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, 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, 1961, Hance *et al.*, Weed Control Handbook, 8ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 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, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8)), por ejemplo mediante extensión del compuesto activo con sustancias auxiliares adecuadas para la formulación de productos agroquímicos como disolventes y/o vehículos, si se desean, emulsionantes, tensioactivos y dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelantes, para formulaciones para tratamiento de semillas opcionalmente también agentes colorantes y/o aglutinantes y/o gelificantes.

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, γ -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.

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, alquilsulfonatos y arilsulfonatos).

Algunos ejemplos de dispersantes son las lejías de lignina-sulfito y metilcelulosa.

Tensioactivos adecuados usados son sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de amonio, del ácido lignosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalenosulfónico, alquilarilsulfonatos, alquilsulfatos, alquilsulfonatos, sulfatos de alcoholes grasos, 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 de octilfenol de polioxietileno, iso-octilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, éteres de poliglicol de alquilfenol, tributilfenil éter de poliglicol, triestearilfenil éter de poliglicol, alquilaril-poliéter alcoholes, condensados de alcohol y alcohol graso y óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, alquil éteres de polioxietileno, polioxipropileno etoxilado, acetal de éter de poliglicol de alcohol laurílico, ésteres de sorbitol, lejías residuales de lignosulfito y metilcelulosa.

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

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

Los agentes 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.

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

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

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 agente gelificante adecuado es carragenina (Satiagel®).

Los polvos, los materiales para esparcido y los productos espolvoreables pueden prepararse mediante mezclado o molienda simultánea de los principios activos con un portador sólido.

Pueden prepararse gránulos, por ejemplo, gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, mediante la unión de los compuestos activos a portadores sólidos. Algunos ejemplos de portadores sólidos son tierras minerales como geles de sílice, silicatos, talco, caolín, arcilla acicular, piedra caliza, cal, creta, arcilla calcareoferruginosa, loess, arcilla, dolomía, tierra de diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos molidos, fertilizantes tales 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 sólidos.

En general, las formulaciones comprenden desde el 0,01 hasta el 95% en peso, preferiblemente desde el 0,1 hasta el 90% en peso del herbicida inhibidor de AHAS. En este caso, los herbicidas inhibidores de AHAS se emplean con una pureza de desde el 90% hasta el 100% en peso, preferiblemente, del 95% al 100% en peso (de acuerdo con el espectro de RMN). Para fines de 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, preferiblemente del 0,1 al 40% en peso.

El herbicida inhibidor de AHAS puede usarse tal cual, en forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de las mismas, por ejemplo, en forma de pulverizables, polvos, suspensiones o dispersiones disoluciones directamente, 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 totalmente de los fines pretendidos; en cada caso se pretenden garantizar la distribución más fina posible del herbicida inhibidor de AHAS de acuerdo con la divulgación.

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

Las concentraciones de compuesto activo en las preparaciones listas para usar pueden variar en intervalos relativamente amplios. En general, son desde el 0,0001 hasta el 10%, por ejemplo desde el 0,01 hasta el 1% en peso.

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

A continuación se incluyen ejemplos de formulaciones:

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

A) Concentrados solubles en agua (SL, LS)

Se disuelven 10 partes en peso del herbicida inhibidor de 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 AHAS se disuelve al diluirlo con agua, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 10% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

B) Concentrados dispersables (DC)

Se disuelven 20 partes en peso del herbicida inhibidor de 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, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 20% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

C) Concentrados emulsionables (EC)

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

D) Emulsiones (EW, EO, ES)

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

E) Suspensiones (SC, OD, FS)

- 20 En un molino de bolas con agitación, se trituran 20 partes en peso del herbicida inhibidor de 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 suspensión fina del herbicida inhibidor de AHAS. La dilución con agua da lugar a una suspensión estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 20% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

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

- 30 Se muelen finamente 50 partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS con la adición de 50 partes en peso de dispersantes y humectantes y se preparan como gránulos dispersables en agua o 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 AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 50% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

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

- 35 En un molino de rotor y estator se muelen 75 partes en peso del herbicida inhibidor de 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 AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 75% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

40 I) Formulación en gel (GF)

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

- 50 2. Productos que han de aplicarse sin diluir para aplicaciones foliares. Para fines de tratamiento de semillas, tales productos pueden aplicarse a la semilla diluidos.

A) Polvos espolvoreables (DP, DS)

- 55 Se muelen finamente 5 partes en peso del herbicida inhibidor de 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 AHAS.

B) Gránulos (GR, FG, GG, MG)

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

- 65 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, o bien directamente sobre las semillas.

5 En una realización preferida se usa una formulación FS para el tratamiento de semillas. Normalmente, 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 agente 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, por ejemplo agua.

10 La presente divulgación abarca semillas transgénicas y no transgénicas de las plantas resistentes a herbicidas de la presente divulgación. 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 registro de la colección NCIMB 41262 y semillas transgénicas que comprenden una molécula de polinucleótido de la divulgación que codifica para una proteína IMI.

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

25 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, el remojo de semillas y la recubrimiento protector de semillas.

30 También se divulga en el presente documento un procedimiento para el tratamiento del suelo mediante la aplicación, en particular en la sembradora, de cualquiera de una formulación granular que contiene el herbicida inhibidor de AHAS como una composición/formulación (por ejemplo, una formulación granular, opcionalmente con uno o más portadores sólidos o líquidos aceptables desde el punto de vista agrícola y/u 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.

35 La presente divulgación también comprende semillas recubiertas o que contienen una formulación de tratamiento de semillas que comprende al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste en amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribaco, piriminobaco, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, piriftalida y piritiobaco.

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

45 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.

50 La aplicación del tratamiento de semillas con el herbicida inhibidor de AHAS o con una formulación que comprende el herbicida inhibidor de 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.

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

La presente divulgación describe un procedimiento para combatir la vegetación no deseada o controlar las malas hierbas que comprende poner en contacto las semillas de las plantas resistentes de acuerdo con la divulgación antes de la siembra y/o después de la pregerminación con un herbicida inhibidor de AHAS. El procedimiento puede comprender además sembrar las semillas, por ejemplo en el suelo en un campo o en un medio de transplante a macetas en el invernadero. El procedimiento encuentra uso particular para combatir la vegetación no deseada o controlar las malas hierbas en las proximidades inmediatas de la semilla.

Se entiende que el control de la vegetación no deseada significa la destrucción de las malas hierbas y/o, si no 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 ubicaciones donde no se desean.

Las malas hierbas de la presente divulgación 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*.

Además, las malas hierbas de la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, plantas de cultivo que crecen en una ubicación no deseada. Por ejemplo, una planta de maíz espontánea que está en un campo que predominantemente comprende plantas de soja puede considerarse una mala hierba si la planta de maíz no se desea en el campo de las plantas de soja.

Los artículos “un/o” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

Según se usa en el presente documento, se entiende que el término “que comprende” o variaciones como “comprende” o “comprendiendo” implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas dados, 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 imidazolinonas

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, se sembraron las semillas tratadas en condiciones de campo el 16 de diciembre de 2002 en la estación experimental de Nidera en Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina. Florecieron aproximadamente 30.000 plantas M₁ y se cubrieron con bolsas para la autopolinización de cada planta. Se recolectó cada planta y se trilló a mano. El 10 de mayo de 2003 se sembraron 20 semillas M₂ de cada capítulo en condiciones de invernadero en la estación experimental de Nidera en Formosa. Se pulverizaron aproximadamente 590.000 plantas en la fase V2-V4 con imazapir a una dosis de 80 g p.a./ha. Ocho plantas sobrevivieron al tratamiento con herbicida y se autopolinizaron y recolectaron. Se evaluaron las semillas M₃ de cada una de estas ocho plantas para determinar 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.

Se usó tejido de las hojas de las plantas M₃ S4897 de las clases resistente e intermedia 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 para proteínas AHASL1 resistentes a imidazolinonas y de tipo natural.

Se amplificó por PCR el gen *AHASL1* a partir de ADN aislado de plantas de girasol M₃ S4897 y BTK47 (de tipo natural) como dos fragmentos solapantes. La amplificación por PCR se llevó a cabo con la ADN polimerasa Hotstart Taq y los reactivos asociados (Quiagen Inc, Valencia, California, EE.UU.; n.º de catálogo 203205) usando procedimientos convencionales. 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 registro 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 registro 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 registro 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 registro de GenBank AY124092. El par de cebadores HA1U409-HA1L1379 produjo un fragmento de 970 pares de bases. El par de cebadores HA1U1313-HA1L2131 produjo un fragmento de 818 pares de bases.

Se secuenciaron los productos de PCR resultantes para producir las secuencias de AHASL1 para S4897 y BTK47. Un alineamiento de estas secuencias de nucleótidos y la secuencia de nucleótidos del gen *ALS* de *Xanthium sp.* (número de registro de GenBank U16280; SEQ ID NO: 5) se proporcionan en la figura 1. El alineamiento reveló que el gen *AHASL1* de S4897 tenía una única mutación con respecto al *AHASL1* de BTK47. El sitio de la mutación se indica mediante 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 proporciona un alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas para las secuencias de nucleótidos *AHASL1* de S4897, BTK47 y *Xanthium sp.* Con relación a la secuencia de aminoácidos de *AHASL1* de BTK47, la secuencia de aminoácidos de *AHASL1* de S4897 tiene una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido 7 (SEQ ID NO: 2). Esta posición de aminoácido en SEQ ID NO: 2 corresponde a la posición de aminoácido 107 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa codificada por la secuencia de nucleótidos de *AHASL1* de girasol del número de registro de GenBank AY541451 (SEQ ID NO: 4) y a la posición de aminoácido 122 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa codificada por la secuencia de nucleótidos de *AHASL* de *Arabidopsis thaliana* del número de registro 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	CAGACGTGTTGGTGGAAGC (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 homocigota para las características de resistencia a herbicidas de S4897

Se produjo una línea de girasol homocigota para el rasgo de resistencia a herbicidas a partir de S4897 por autofecundación y examen de la resistencia a imazapir. Esta línea de girasol y las plantas de la misma se designaron como GM40. Después de confirmar la homogeneidad de la progenie para la resistencia a herbicidas, se trasplantaron las plantas de la línea GM40 de girasol 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 sometieron a prueba plantas S4897 para determinar la resistencia a imazapic. La resistencia a imazapic fue claramente superior a la de IMISUM-1 (mutación Ala₁₉₀ por 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 es probable que la dosis real de herbicida que alcanzó las plantas fuese menor que la aplicada. No obstante, S4897 mostró una tolerancia a imazapic superior a la de la sustitución de Ala₁₉₀ por Val. No se presentan datos de este ensayo de campo.

También se sometieron plantas de S4897 e IMISUM-1 a un tratamiento con imazapic en condiciones de invernadero. La fotografía de la figura 5 muestra esta comparación cuando se trataron las plantas 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: se pulverizaron la línea de girasol S4897, las variedades de girasol Clearfield® A, B, C y una variedad distinta de Clearfield convencional 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 la fase de dos a tres hojas. Se tomaron puntuaciones a los 14 días después del tratamiento (DDT). Se clasificó el daño con una escala de 0 a 9 en la que 0 = sin daño y 9 = planta muerta. Se pulverizaron 12 plantas por cada tratamiento con herbicida/dosis. Se realizó un análisis estadístico con STATGRAPHICS Plus 5.0 mediante el uso de los procedimientos de 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 se habían pulverizado con el herbicida aproximadamente a las cuatro semanas después de la plantación.

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 que se suministró. La altura de la barra de pulverización se había calibrado frente a S4897 y dado que las otras variedades eran más altas y estaban más próximas a la barra habrían recibido una mayor dosis del herbicida. Las dosis se recalibraron para las otras variedades para determinar la dosis aproximada que habrían recibido. Se realizaron evaluaciones según se presenta en la tabla 2, dado que no fue posible hacer una comparación directa de las dosis debido al efecto de la altura. Por ejemplo, se compararon las puntuaciones de daño 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/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 con herbicida (tabla 3). De hecho se observó muy poco daño con la mayor dosis de o bien imazamox o bien imazapir. Las otras variedades mostraron un daño creciente 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 DDT para tres líneas IMISUN1 y S4897 pulverizadas con imazamox o imazapir

Líneas	Imazamox (g p.a./ha)			Imazapir (g p.a./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 distinta de Clearfield convencional	7,2 d	8,2 d	8,7 e	8,2 d	
	LSD = 0,7	LSD = 0,7	LSD = 0,6	LSD = 0,7	

Se realizó un análisis estadístico 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 mayor concentración de imazamox en comparación con una variedad de girasol Clearfield® y una variedad distinta de Clearfield convencional (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 sometidas a prueba eran homocigotas, existe una diferencia cualitativa en la tolerancia conferida por la sustitución de aminoácidos 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 AHAS con la sustitución Ala₁₉₀ por Val. Esto indica que AHAS con la sustitución Ala₁₀₇ por Thr tiene una tolerancia superior a herbicidas de imidazolinona que AHAS con la sustitución Ala₁₉₀ por Val.

EJEMPLO 6: Proteínas AHASL de girasol resistentes a herbicidas

Se divulgan en el presente documentos las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos de polipéptidos AHASL de girasol de tipo natural y resistentes a herbicidas. Se han identificado previamente plantas que

comprenden polipéptidos AHASL resistentes a herbicidas y se han descrito una serie de regiones conservadas de los polipéptidos AHASL 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 *et al.* (eds.), págs. 159-185, IOS Press, Ámsterdam; Devine y Shukla (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

Mediante el uso de las secuencias de AHASL de la invención tal como se definen en las reivindicaciones y de procedimientos conocidos por los expertos habituales en la técnica, es posible producir polinucleótidos adicionales que codifican para 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 que se sabe que confieren resistencia a herbicidas dentro de estas regiones conservadas y los correspondientes aminoácidos en la proteína AHASL1 de girasol 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 A SMEIHQALTRS ³	Ala ₁₂₂ a Thr	Bernasconi <i>et al.</i> ⁶ Wright y Penner ¹⁴	Ala ₁₀₇
AITGQV P RRMIGT ⁴	Pro ₁₉₇ a Ala	Boutsalis <i>et al.</i> ⁷	Pro ₁₈₂
	Pro ₁₉₇ a Thr	Guttieri <i>et al.</i> ⁸	
	Pro ₁₉₇ a His	Guttieri <i>et al.</i> ⁹	
	Pro ₁₉₇ a Leu	Guttieri <i>et al.</i> ⁸ Kolkman <i>et al.</i> ¹⁵	
	Pro ₁₉₇ a Arg	Guttieri <i>et al.</i> ⁸	
	Pro ₁₉₇ a Ile	Boutsalis <i>et al.</i> ⁷	
	Pro ₁₉₇ a Gln	Guttieri <i>et al.</i> ⁸	
	Pro ₁₉₇ a Ser	Guttieri <i>et al.</i> ⁸	
A FQETP ⁴	Ala ₂₀₅ a Asp	Harnett <i>et al.</i> ¹⁰	Ala ₁₉₀
	Ala ₂₀₅ a Val	Simpson ¹¹ Kolkman <i>et al.</i> ¹⁵ White <i>et al.</i> ¹⁶	
Q WED ⁴	Trp ₅₇₄ a Leu	Boutsalis <i>et al.</i> ⁷	Trp ₅₅₉
IP S 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 *et al.* (eds.), págs. 159-185, IOS Press, Ámsterdam y Devine y Shukla, (2000) *Crop Protection* 19:881-889.

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

³Las secuencias de aminoácidos de AHASL1 de girasol expuestas en SEQ ID NO: 2 y 4 no son de longitud completa y comienzan con las secuencias de aminoácidos FAYPGG**I**SMEIHQALTRS y FAYPGG**A**SMEIHQALTRS, respectivamente.

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

⁵La región de AHASL1 de girasol (número de registro de GenBank AY541451) correspondiente a esta región conservada tiene la secuencia IP**A**GG.

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

⁷Boutsalis *et al.* (1999) *Pestic. Sci.* 55:507-516.

⁸Guttieri *et al.* (1995) *Weed Sci.* 43:143-178.

⁹Guttieri *et al.* (1992) *Weed Sci.* 40:670-678.

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

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

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

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 *et al.* (eds.), págs.

159-185, IOS Press, Ámsterdam.

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

¹⁵Kolkman *et al.* (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159.

¹⁶White *et al.* (2003) *Weed Sci.* 51:845-853.

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

EJEMPLO 7: Producción de una línea de girasol GM1606

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

EJEMPLO 8: Respuesta de los eventos de mutación A122T y A205V a imazapir

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

Tabla 5. Materiales de girasol

Código de 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	de tipo natural

Procedimientos

Se sembraron semillas en placas de Petri y después de la germinación se trasplantaron las plántulas a macetas de 10 cm de diámetro en un medio de transplante a macetas que consistía en partes iguales de vermiculita, suelo y arena. Se dejaron crecer las plantas 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 de día/noche fueron de 25 y 20°C, respectivamente. En la fase V2, se asignaron aleatoriamente 10 plantas de cada genotipo a cada tratamiento, que consistía en siete dosis de imazapir (0, 40, 80, 160, 240, 320, 400 y 480 g p.a./ha) y una determinación de biomasa a tiempo cero. Se organizó el experimento con un diseño de bloques aleatorizados y una disposición totalmente factorial (línea de girasol x tratamiento) de los tratamientos y 10 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 mantuvieron durante 10 días después del tratamiento con imazapir (DDT) y se registró su altura y la biomasa seca de las raíces y de la parte aérea. Se determinó la altura como la distancia entre el nudo cotiledonar y el ápice de cada planta. Para la determinación de la biomasa de raíces, se extrajo cada planta de la maceta y se eliminó por lavado el medio de transplante a macetas de las raíces. Se convirtieron los datos de biomasa de la parte aérea de cada línea en acumulación de biomasa después de la aplicación mediante resta de la biomasa promedio a tiempo cero apropiada para cada muestra. Se convirtieron los datos de biomasa seca en porcentajes respecto a las plantas de control sin tratar dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos.

Resultados

1. Altura

- 5 La altura de las líneas de girasol que portaban la mutación A205V no difirió de la de los controles sin tratar cuando se aplicó una dosis de imazapir de 0,5X o 1X. Desde 2X hasta 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 cambio, las líneas de girasol que portaban la mutación A122T mostraron una menor reducción de la altura (desde el 0,6 hasta el 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 desde 2X hasta 6X (tabla 6 y figura 9).

2. Índice de fitotoxicidad

- 15 Ambos mutantes mostraron grandes diferencias en su respuesta al aumento de la dosis de herbicida desde 0,5X hasta 6X (figura 10). Las líneas de girasol que portaban 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 cambio, las plantas que portaban 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 desde 2X hasta 6X (tabla 7). Ambos mutantes difirieron entre sí significativamente en cuanto al índice de fitotoxicidad desde 2X hasta 6X (tabla 7).

3. Biomasa en peso seco de la parte aérea

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

4. Biomasa de raíces

- 35 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 de la biomasa de raíces en peso seco desde el 12,8% para 0,5X (40 g p.a./ha) hasta el 75,6% para 6X (tabla 9). En cambio, las plantas que portaban A122T mostraron una disminución significativa en la biomasa en peso de raíces desde 3X hasta 6X, y a la dosis mayor, 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 desde 0,5X hasta 6X (tabla 9 y figura 12).

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

Dosis	A205V								A122T										Dif. con control	Valor de P	Dif. A122T-A205V	Valor de P
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	D.E.	Valor de P	TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	D.E.					
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	0.19611
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	0.09183
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	0.00033
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	0.00000
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	0.00001
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	0.00000
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	0.00000

Tabla 7. Efecto de diferentes dosis de imazapir sobre el índice de fitotoxicidad 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 de P	
	TH1	TH9	TH10	Media	D.E.	Valor de P	TH6	TH11	TH12	Media	D.E.	Valor de P	Valor de 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	0,8	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 sobre la acumulación de biomasa a los 14 días después del tratamiento para seis genotipos de girasol que portan la mutación A205V y seis genotipos que portan la mutación A122T

Dosis	A205V										A122T										Dif. con control		Dif. A122T-A205V		Valor de P
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	D.E.	Dif. con control	Valor de P	TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	D.E.	Dif. con control	Valor de P					
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	0.00338	100	96.6	100.0	96.5	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	0.00116	97.2	93.9	99.1	94.1	98.4	100.0	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	0.00039	97.9	81.6	97.0	97.6	97.7	97.6	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	0.00002	98.2	75.8	96.1	95.8	95.8	95.4	92.8	8.4	7.2	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	0.00001	97.8	75.0	84.3	88.3	90.8	90.5	87.8	7.6	12.2	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	0.00000	85.1	60.1	77.5	85.6	81.9	85.3	79.3	9.9	20.7	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	0.00000	79.5	59.6	70.7	78.8	78.0	83.0	74.6	8.4	25.4	0.00070	44.6	0.00000			

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

Dosis	A205V								Dif. con control	Valor de P	A122T								Dif. con control	Valor de P	Dif. A122T A205V	Valor de P	
	TH1	TH9	TH10	GIM 5-7	IB920	IR79	Media	D.E.			TH6	TH11	TH12	GM 40	GM 5-6	GM 1606	Media	D.E.					
0	100	100	100	100	100	100	100	0.0	0.0	-	100	100	100	100	100	100	0.0	0.0	-	0.0	-	0.0	-
0.5	79.4	81.5	90.3	79.2	94.0	96.6	87.2	8.3	12.6	0.01281	100	100	99.4	100	100	100	99.9	0.2	0.1	0.36322	12.7	0.01314	
1	70.7	84.9	69.9	56.3	89.6	53.4	70.8	14.6	29.2	0.00447	98.1	99.0	100	100	88.0	100.0	97.5	4.7	2.5	0.25371	26.7	0.00520	
2	69.6	58.8	41.3	40.6	50.7	42.5	50.6	11.7	49.4	0.00014	96.2	86.1	100	100	90.0	92.5	94.1	5.6	5.9	0.05070	43.6	0.00006	
3	42.3	34.1	42.6	40.2	37.3	38.4	39.2	3.3	60.8	0.00000	79.3	81.5	100.0	92.2	98.0	85.2	89.4	8.7	10.6	0.02997	50.2	0.00001	
4	38.6	27.3	22.3	34.0	32.8	31.5	31.1	5.7	68.9	0.00000	78.4	72.6	74.5	96.1	80.0	87.0	81.4	8.7	18.6	0.00346	50.3	0.00000	
5	34.7	29.9	22.7	48.5	25.4	23.3	30.7	9.8	69.3	0.00001	85.8	68.9	65.0	84.2	80.0	88.1	78.7	9.5	21.3	0.00273	47.9	0.00001	
6	23.1	22.1	16.4	43.1	19.4	21.9	24.4	9.5	75.6	0.00001	57.3	45.3	57.8	74.3	65.8	69.5	61.7	10.4	38.3	0.00028	37.3	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 la que se refiere esta invención.

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, resultará obvio que es posible poner en práctica determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Sala, Carlos
Echarte, Mariel
Bulos, Mariano
Whitt, Sherry R.
Ascenzi, Robert

15 <120> PLANTAS DE GIRASOL RESISTENTES A HERBICIDAS, POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN
PROTEÍNAS DE LA SUBUNIDAD GRANDE DE LA ACETOHIDROXIÁCIDO SINTASA RESISTENTES A
HERBICIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE USO

20 <130> 038867/310344

<150> Documento US 60/695.952
<151> 01-07-2005

25 <160> 14

<170> FastSEQ para Windows, versión 4.0

30 <210> 1
<211> 1.178
<212> ADN
<213> *Helianthus annuus*

35 <220>
<221> CDS
<222> (3)...(1.178)

<400> 1

ES 2 581 478 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	ggc	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	ggc	ccc	gga	gct	acg	aac	cta	gtt	agt	ggc	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	ggc	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	ggc	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 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
ggg 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	gtt Val	agg Arg	ttg Leu 180	gtg Val	ggg Gly	gaa Glu	gag Ala 185	agg Arg	ccg Pro	gtt Val	ttg Leu	tat Tyr 190	gtg Val	575	
ggg Gly	ggg Gly	ggg Gly	tgt Cys 195	ttg Leu	aat Asn	tcg Ser	gat Asp 200	gat Asp	gag Glu	ttg Leu	agg Arg	cgg Arg	ttt Phe 205	gtg Val	gag Glu	623
ctt Leu	acg Thr 210	ggg Gly	att Ile	ccg Pro	gtt Val	gag Ala	agt Ser 215	act Thr	ttg Leu	atg Met	ggg Gly	ctc Leu 220	gga Gly	gag 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	ggg Gly	acg Thr	719
gtt Val 240	tat Tyr	gag Ala	aat Asn	tat Tyr	gag Ala 245	gtt Val	gat Asp	aag Lys	agt Ser	gat Asp 250	ttg Leu	ttg Leu	ctt Leu	gag 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	gag Ala	ttt Phe 270	gct Ala	815
agt Ser	agg Arg	gag Ala	aag Lys 275	att Ile	gtt 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	ggg Gly	gat Asp	att Ile	aag Lys	gtc Val	gag Ala	911
tta Leu 305	cag Gln	ggg 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	gag Ala	att Ile	cct Pro	cca Pro	cag Gln 350	tat Tyr	1055
gct Ala	att Ile	caa Gln	gtt Val 355	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	ggg Gly	gtc Val 370	ggg Gly	caa Gln	cat His	cag Gln 375	atg Met	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> PRT
 <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

5 <212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

<220>

<221> CDS

10 <222> (3)...(1.178)

<400> 3

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 2 581 478 T3

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

	275						280					285					
aag Lys	aat Asn	aag Lys 290	cag Gln	cct Pro	cat His	gtg Val	tcg Ser 295	ile Ile	tgt Cys	ggc Gly	gat Asp	att Ile 300	aag Lys	gtc Val	gcg Ala	911	
tta Leu	cag Gln 305	ggc 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 365	att Ile	att Ile	agc Ser	1103	
acc Thr	ggc 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> 4
<211> 392
<212> PRT
<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

```

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> 5
 <211> 2.156
 <212> ADN
 <213> *Xanthium sp.*

<220>
 <221> CDS
 <222> (111)...(2.057)
 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> Número de registro de GenBank U16280

5 <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 50
 tcc aaa ccc acc atc acc cat tca cca tta cca acc aaa tca ttt atc 308
 Ser Lys Pro Thr Ile Thr His Ser Pro Leu Pro Thr Lys Ser Phe Ile
 55 60 65
 tcc cgt tac gct cca gac caa cca aga aaa ggc gct gat gtt ctc gtc 356
 Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Gln Pro Arg Lys Gly Ala Asp Val Leu Val
 70 75 80
 gaa gct ctg gaa cgt gaa ggc gtt aca gac gtc ttc gct tac cca ggt 404
 Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly
 85 90 95
 ggt gcc tcc atg gag atc cac caa gct ctc acg cgc tca acc acc atc 452
 Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

ES 2 581 478 T3

cgc Arg 115	aac Asn	gtt 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	gtt Val 165	cca Pro	atg Met	gtt Val	gct Ala	att Ile 170	act Thr	ggt Gly	caa Gln	gtt Val	ccc Pro 175	agg Arg	aga Arg	atg Met	644
att Ile 180	gga Gly	aca Thr	gat Asp	gcg Ala	ttt Phe	caa Gln 185	gaa Glu	acc Thr	cct Pro	att Ile 190	gtt Val	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	gtt Val	ttg Leu 205	gat Asp	gtc Val	gag Glu	gat Asp	att Ile	ccc Pro 210	740
agg Arg	att Ile	gtt 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	gtt 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 260	aaa Lys	acg Thr	gag Glu	aat Asn	aat Asn	ggg Gly 265	cag Gln	ttg Leu	gaa Glu	cag Gln	att Ile 270	gtt Val	agg Arg	ttg Leu	gtg Val	932
agt Ser 275	gag Glu	gcc Ala	aag Lys	agg Arg	ccg Pro 280	gtt 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	gtt Val	1028
gcg Ala	agt Ser	acg Thr	ttg Ala 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	gtt Val	tat Tyr	gcg Ala 335	aat Asn	tat Tyr	gcg Ala	1124
gtt Val 340	gat Asp	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	gtt 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 2 581 478 T3

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

<211> 648
 <212> PRT
 <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 Cys
      275      280      285
Leu Asn Ser Gly Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile
      290      295      300
Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro Ala Ser Ser
305      310      315      320
Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn
      325      330      335
Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
      340      345      350
Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
      355      360      365
Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
      370      375      380
Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu Gln Gly Leu
385      390      395      400
Asn Lys Ile Leu Glu Val Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu Asp Phe Ser
      405      410      415
Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Ser
      420      425      430
Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
      435      440      445
Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
      450      455      460
Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn Lys Pro Arg

```

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

5 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> Cebador HA1U409
 <400> 7
 cagacgtggtt ggtggaagc 19

 15 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> Cebador HA1L1379
 <400> 8
 ctgtaacgcg accttaatat c 21

 25 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> Cebador HA1U1313
 <400> 9
 tgctgaaatt gggaagaata ag 22

 35 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> Cebador HA1L2131

<400> 10
 tttcgttctg ccataccac 19

<210> 11
 5 <211> 1.968
 <212> ADN
 <213> *Helianthus annuus*

<220>
 10 <221> CDS
 <222> (1)...(1.965)
 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> Número de registro de GenBank AY541451

15 <400> 11

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 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 2 581 478 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	ggg	cga	ccc	ggc	ccg	gtt	ttg	ata	gat	gta	ccg	720
Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	
225					230					235					240	
aaa	gat	ata	cag	caa	cag	tta	gtg	gtg	ccg	aaa	tgg	gat	gaa	ccg	atg	768
Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Lys	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	
				245					250					255		
agg	tta	ccg	ggg	tat	ttg	tct	aga	atg	ccg	aag	cct	caa	tat	gat	ggg	816
Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr	Leu	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Asp	Gly	
			260					265					270			
cat	ttg	gaa	cag	att	gtt	agg	ttg	gtg	ggg	gaa	gcg	aag	agg	ccg	gtt	864
His	Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	Val	
		275					280					285				
ttg	tat	gtg	ggg	ggg	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					300					
ttt	gtg	gag	ctt	acg	ggg	att	ccg	gtt	gcg	agt	act	ttg	atg	ggg	ctc	960
Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	
305					310					315					320	
gga	gcg	tac	cct	gct	tcg	agt	gat	ttg	tcg	ctt	cat	atg	ctt	ggg	atg	1008
Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	
				325					330					335		
cat	ggg	acg	gtt	tat	gcg	aat	tat	gcg	gtt	gat	aag	agt	gat	ttg	ttg	1056
His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	
			340					345					350			
ctt	gcg	ttt	ggg	gtg	cgg	ttt	gat	gat	cgt	gtg	acg	ggg	aag	ctt	gag	1104
Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	
		355					360					365				
gcg	ttt	gct	agt	agg	gcg	aag	att	gtt	cat	att	gat	att	gat	cct	gct	1152
Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	
	370					375					380					
gaa	att	ggg	aag	aat	aag	cag	cct	cat	gtg	tcg	att	tgt	ggg	gat	att	1200
Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	
385					390					395					400	
aag	gtc	gcg	tta	cag	ggg	ttg	aac	aag	att	ttg	gag	gaa	aag	aat	tcg	1248
Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	
				405					410					415		
gtg	act	aat	ctt	gat	ttt	tcg	acc	tgg	aga	aag	gaa	ttg	gat	gaa	caa	1296
Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	
			420					425					430			
aaa	atg	aag	ttc	ccg	ttg	agc	ttt	aaa	acg	ttt	ggc	gaa	gcg	att	cct	1344
Lys	Met	Lys	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	
		435					440					445				
cca	cag	tat	gct	att	caa	gtt	ctt	gat	gag	tta	acg	ggc	ggg	aat	gca	1392
Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	
	450					455					460					
att	att	agc	acc	ggg	gtc	ggg	caa	cat	cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	1440
Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	
465					470					475					480	
tac	aaa	tac	aac	aaa	cct	aga	caa	tgg	ctg	acg	tcg	ggc	ggg	cta	ggg	1488

Tyr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly		
				485					490					495			
gca	atg	ggt	ttc	ggc	ctg	ccc	gct	gct	atc	ggg	gcg	gcc	gtt	gca	aga	1536	
Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg		
			500					505					510				
cct	gat	gcg	gta	gta	gtt	gac	atc	gac	ggg	gac	gga	agc	ttt	atg	atg	1584	
Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Met	Met		
		515					520					525					
aat	gtt	caa	gag	tta	gcc	aca	atc	cgt	gtt	gaa	aat	ctg	ccg	gtt	aag	1632	
Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys		
	530					535					540						
att	tta	tta	ctt	aac	aac	cag	cat	ttg	ggg	atg	gtg	gtt	cag	tgg	gag	1680	
Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu		
	545				550				555						560		
gat	cgg	ttt	tac	aag	gcg	aat	cgg	gct	cat	acc	tac	tta	gga	aac	ccg	1728	
Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro		
				565					570					575			
tca	aaa	gag	tcg	gaa	ata	ttc	cct	aac	atg	gtg	aag	ttt	gct	gaa	gcc	1776	
Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Met	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala		
			580					585					590				
tgt	gat	atc	ccg	gct	gct	cga	gtg	acc	caa	aag	gcg	gat	cta	cga	gca	1824	
Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala		
		595					600					605					
gct	att	cag	aag	atg	ttg	gat	aca	ccc	ggg	cct	tac	ttg	ttg	gat	gtg	1872	
Ala	Ile	Gln	Lys	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val		
	610					615					620						
att	gtg	ccg	cat	caa	gaa	cac	gtg	ttg	ccc	atg	atc	ccg	gct	ggc	gga	1920	
Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly		
	625				630				635					640			
ggg	ttc	tcg	gat	gtg	atc	acc	gag	ggg	gat	ggc	aga	acg	aaa	tat		1965	
Gly	Phe	Ser	Asp	Val	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr			
				645				650						655			
tga																1968	

<210> 12
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> *Helianthus annuus*

<400> 12

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	Leu	Pro	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	140	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu
145	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	155	Val	Pro	Met	Val	Ala
					165					170						175	
	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	
				180					185						190		
	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	
			195					200					205				
	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Phe	
		210					215					220					
	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	
225					230						235					240	
	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Lys	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	
				245						250					255		
	Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr	Leu	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Gln	Tyr	Asp	Gly	
			260						265					270			
	His	Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	Val	
		275						280					285				
	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	
		290				295						300					
	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	
305					310						315					320	
	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	
				325						330					335		
	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	
			340						345					350			
	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	
		355						360					365				
	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	
		370					375					380					
	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	
385					390						395					400	
	Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	
				405						410					415		
	Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	
			420						425					430			
	Lys	Met	Lys	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	
			435					440					445				
	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	
		450					455					460					
	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	
465					470						475					480	
	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	
				485						490					495		
	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	
			500						505					510			
	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Met	Met	
			515					520					525				
	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	
		530					535					540					
	Ile	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	
545					550						555					560	
	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	
				565						570					575		
	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Met	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	
			580						585					590			
	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	
			595					600					605				
	Ala	Ile	Gln	Lys	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	
		610					615					620					
	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	
625					630						635					640	
	Gly	Phe	Ser	Asp	Val	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr		
				645						650					655		

<210> 13
 <211> 2.013
 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

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

ES 2 581 478 T3

tta gct act tct ggt aga cct gga cct gtt ttg gtt gat gtt 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 Leu Ala Ile Pro 265 Asn Trp Glu Gln 270 Ala Met Arg	
tta cct ggt tat atg tct agg atg cct aaa cct ccg gaa gat tct cat	864
Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met 280 Pro Lys Pro Pro Glu 285 Asp Ser His	
ttg gag cag att gtt agg ttg att tct gag tct aag aag cct gtg ttg	912
Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu 295 Ile Ser Glu Ser Lys 300 Lys Pro Val Leu	
tat gtt ggt ggt ggt tgt ttg aat tct agc gat gaa ttg ggt agg ttt	960
Tyr Val Gly Gly Gly Cys 310 Leu Asn Ser Ser Asp 315 Glu Leu Gly Arg Phe 320	
gtt gag ctt acg ggg atc cct gtt 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 Gly 335	
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 Met His 350	
ggg acg gtg tat gcg aat tac gct gtg gag cat agt gat ttg ttg ttg	1104
Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp 365 Leu Leu Leu 365	
gcg ttt ggg gtg agg ttt gat gat cgc gtc acg ggt aag ctt gag gct	1152
Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp 375 Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala 380	
ttt gct agt agg gct aag att gtt cat att gat att gac tct gct gag	1200
Phe 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 Val Cys Gly Asp Val Lys 415	
ctg gct ttg caa ggg atg aat aag gtt ctt gag aac cga gct gag gag	1296
Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu 430	
ctt aag ctt gat ttt gga gtt tgg agg aat gag ttg aac gta cag aaa	1344
Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys 445	
cag aag ttt ccg ttg agc ttt aag acg ttt ggg gaa gct att cct cca	1392
Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro 460	
cag tat gcg att aag gtc ctt gat gag ttg act gat gga aaa gcc ata	1440
Gln Tyr Ala Ile Lys Val 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 Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr 495	
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 Ser Gly Gly 510 Leu Gly Ala	

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	
545 550 555 560	
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> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 14

Met	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe
1				5					10					15	
Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ser
			20					25					30		
Arg	Phe	Ser	Leu	Pro	Phe	Ser	Leu	Asn	Pro	Asn	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser
		35					40				45				
Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala
		50				55				60					
Val	Leu	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Val	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Thr	Lys
					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 150 Ala Thr Ser Gly 155 Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val 160
 Ser Gly Leu Ala Asp 165 Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile 175
 Thr Gly Gln Val 180 Pro Arg Arg Met 185 Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu 190
 Thr Pro 195 Ile Val Glu Val 200 Thr Arg Ser Ile Thr Lys 205 His Asn Tyr Leu 210
 Val Met Asp Val Glu Asp 215 Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe 220
 225 Leu Ala Thr Ser Gly 230 Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys 240
 Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg 245
 Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met 250 Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His 255
 Leu Glu 260 Gln Ile Val Arg Leu 265 Ile Ser Glu Ser Lys 270 Lys Pro Val Leu 285
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys 280 Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe 290
 305 Val Glu Leu Thr Gly 310 Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly 320
 Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His 325
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu 330
 Ala Phe 335 Gly Val Arg Phe Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala 340
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys 345 Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu 350
 355 Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys 365
 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu 370
 Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys 375
 Gln Lys 380 Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro 385
 Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile 390
 395 Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr 400
 Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala 405
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro 410
 Asp Ala 415 Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn 420
 Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Gln Leu Pro Val Lys Ile 425
 430 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp 435
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala 440
 Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys 445
 Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala 450
 Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile 455
 460 Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr 465
 Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr 470
 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido de subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa de girasol (*AHASL*), en el que dicho polinucleótido *AHASL* codifica para una proteína *AHASL1* tolerante a herbicidas de imidazolinona que comprende una sustitución de alanina a treonina en la posición de aminoácido 7 de SEQ ID NO:2 o, de manera equivalente, en la posición 107 de SEQ ID NO:12; en el que dicha proteína *AHASL1* comprende un polipéptido que es idéntico en al menos el 95% a SEQ ID NO:12; y en el que dicha proteína *AHASL1* confiere a una planta un aumento de la tolerancia a un herbicida de imidazolinona en comparación con una variedad de tipo natural de dicha planta.
2. Polinucleótido *AHASL* según la reivindicación 1, en el que dicha proteína *AHASL1* comprende:
 - a) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 con una sustitución de alanina a treonina en la posición de aminoácido 7 de SEQ ID NO:2 o, de manera equivalente, en la posición 107 de SEQ ID NO:12, que contiene opcionalmente al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) una sustitución de prolina a glutamina o serina en la posición de aminoácido 182 o una posición equivalente con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12;
 - (ii) una sustitución de alanina a aspartato o valina en la posición de aminoácido 190 o una posición equivalente con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12;
 - (iii) una sustitución de triptófano a leucina en la posición de aminoácido 559 o una posición equivalente con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12; y
 - (iv) una sustitución de alanina a una cualquiera de asparagina, treonina, fenilalanina o valina en la posición de aminoácido 638 o una posición equivalente con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12.
3. Casete de expresión que comprende un promotor operativamente unido al polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2.
4. Procedimiento para producir una planta que es tolerante a un herbicida de imidazolinona, comprendiendo el procedimiento
 - (i) transformar una célula vegetal con un constructo de polinucleótido que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2 operativamente unido a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal; y
 - (ii) regenerar la planta a partir de dicha célula vegetal transformada.
5. Planta que comprende al menos una copia de un polinucleótido según las reivindicaciones 1 ó 2.
6. Procedimiento para seleccionar una célula vegetal transformada, comprendiendo el procedimiento:
 - (i) proporcionar una célula vegetal que comprende un vector de transformación de planta que comprende un promotor y un polinucleótido operativamente unido según la reivindicación 1 o 2;
 - (ii) exponer dicha célula vegetal transformada a un herbicida de imidazolinona a una concentración que inhibe el crecimiento de una célula vegetal no transformada; y
 - (iii) identificar dicha célula vegetal transformada por su capacidad para crecer en presencia de dicho herbicida.
7. Procedimiento para hacer crecer una planta según la reivindicación 5, al tiempo que se controla el crecimiento de malas hierbas en las proximidades de dicha planta, comprendiendo dicho procedimiento
 - (i) hacer crecer en un campo una planta según la reivindicación 5; y
 - (ii) poner en contacto dicha planta y malas hierbas en el campo con una cantidad eficaz de una formulación de herbicida inhibidor de AHAS que comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriaolinona, o mezcla de los mismos al que la planta es tolerante y que inhibiría el crecimiento de una variedad de tipo natural de la planta, en el que la formulación de herbicida no inhibe el crecimiento de dicha planta tan intensamente como inhibiría el crecimiento de la variedad de tipo natural de la planta.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 6 y 7, en el que dicho herbicida de imidazolinona comprende uno o más de imazetapir, imazapic, imazamox, imazaquín, imazetabenz e imazapir, o una mezcla de cualquiera de los anteriores.
- 5 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en que dicho herbicida de sulfonilurea se selecciona del grupo que consiste en: 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, o una mezcla de cualquiera de los anteriores.
- 10 10. Órgano, tejido o célula de la planta según la reivindicación 5.
11. Semilla que comprende al menos una copia de un polinucleótido según las reivindicaciones 1 ó 2.
- 15 12. Semilla según la reivindicación 11, en la que dicha semilla se trata con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS.
- 20 13. Semilla según la reivindicación 12, en la que dicho herbicida inhibidor de AHAS comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriasolinona, o una mezcla de cualquiera de los anteriores.
14. Semilla según la reivindicación 13, en la que dicho herbicida inhibidor de AHAS es un herbicida de imidazolinona.
- 25 15. Procedimiento para tratar semillas, comprendiendo el procedimiento tratar la semilla según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS.
- 30 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho herbicida inhibidor de AHAS comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriasolinona, o una mezcla de cualquiera de los anteriores.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho herbicida inhibidor de AHAS es un herbicida de imidazolinona.
- 35 18. Procedimiento para detectar una AHASL1 de girasol, comprendiendo dicho procedimiento:
(i) obtener ADN genómico de una planta;
(ii) usar dicho ADN como molde para una amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende un cebador de AHASL1 directo que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO:7 y un cebador de AHASL1 inverso que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO:8; y
(iii) secuenciar los productos de dicha amplificación mediante PCR.
- 40
- 45

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	TCGTTCCACAC	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				ATGGCGGCGG	CAACAACAAC
	101				150
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11		ATGGCGGC..	TC	CTCCCAACCC	T.TCCATC.T
SEQ_ID_NO: 5	ACATTCAACA	ATGGCGGCCA	TCCC...TC	ATACAAACCC	T.TCCATC.A
SEQ_ID_NO: 13	AACAACAACA	TCTTCTTCGA	TCTCCTTCTC	CACCAAACCA	TCTCCTTCCT
	151				200
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11	CCTTCAAACC	ACCGTCACCC	GCCGCCGCAC	TGCCACCACG	CTCCGCCTTC
SEQ_ID_NO: 5	CCACCAAACC	ACCCTCATCT		..CCACCACG	TCCCACCTTC
SEQ_ID_NO: 13	CCTCCAAATC	ACCATTACCA	ATCTCCAGA.	..TTCTCCCT	CCCATTCTCC
	201				250
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11	CTCCCCCGTT	TCGCATTACC	CATCACTTCC	A..CTACCCA	AAAACGACAC
SEQ_ID_NO: 5	CTCGCCCGTT	TCACATTCCC	AATAACCTCC	A..CTTCCA	TAAACGACAC
SEQ_ID_NO: 13	CTAAACCCCA	ACAAATCATC	CTCCTCCTCC	CGCCGCCGCG	GTATCAAATC
	251				300
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11	CGTCTTCACA	TCTCCAATGT	TCTCTCCGA.	CTCCAAATCC	ACCACCACCA
SEQ_ID_NO: 5	CGTCTCCACA	TCTCCAACGT	CCTCTCCGA.	CTCCAAACCC	ACCATCACC.
SEQ_ID_NO: 13	CAGCTCTCCC	TCCTCCATCT	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: 5		CATTC	ACCATTACCA	A..CCAAATC	ATTTATCTCC
SEQ_ID_NO: 13	CAACCACTCC	CTCTCCAACC	AAACCTACCA	AACCCGAAAC	ATTCTCTCC
	351				400
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11	CGTTACGCGC	CAGATCAACC	GAGAAAAGGC	GCAGACGTGT	TGGTGGAAGC
SEQ_ID_NO: 5	CGTTACGCTC	CAGACCAACC	AAGAAAAGGC	GCTGATGTTC	TCGTCGAAGC
SEQ_ID_NO: 13	CGATTCGCTC	CAGATCAACC	CCGCAAAGGC	GCTGATATCC	TCGTCGAAGC

FIGURA 1
(Hoja 2 de 6)

	401				*450
SEQ_ID_NO: 1			TCTT	CGCCTACCCC	GGCGGCACGT
SEQ_ID_NO: 3			TCTT	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	CAACCAACAT	CCGCAACGTT
SEQ_ID_NO: 13	CAATGGAGAT	TCACCAAGCC	TTAACCCGCT	CTTCCTCAAT	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	CTCCACGTC	ACGAACAGGG	CGGCGTCTTT	GCTGCCGAAG	GCTACGCACG
SEQ_ID_NO: 13	CTTCCTCGTC	ACGAACAAGG	AGGTGTATTG	GCAGCAGAAG	GATACGCTCG
	551				600
SEQ_ID_NO: 1	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACTTCCGGT	CCCGGAGCTA
SEQ_ID_NO: 3	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACTTCCGGT	CCCGGAGCTA
SEQ_ID_NO: 11	CGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TGTGTATCGC	CACTTCCGGT	CCCGGAGCTA
SEQ_ID_NO: 5	TGCCTCCGGT	CTTCCCGGCG	TCTGTATTGC	AACCTCTGGT	CCTGGAGCTA
SEQ_ID_NO: 13	ATCCTCAGGT	AAACCAAGTA	TCTGTATAGC	CACTTCAGGT	CCCGGAGCTA
	601				650
SEQ_ID_NO: 1	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCCCATG
SEQ_ID_NO: 3	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCCCATG
SEQ_ID_NO: 11	CGAACCTAGT	TAGTGGTCTT	GCTGACGCGC	TGTTAGACAG	TGTCCCCATG
SEQ_ID_NO: 5	CGAACCTAGT	AAGTGGTCTT	GCTGATGCTT	TATTAGACAG	TGTTCCAATG
SEQ_ID_NO: 13	CAAATCTCGT	TAGCGGATTA	GCCGATGCGT	TGTTAGATAG	TGTTCTCTCT
	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	TTCCATTACT	AAGCATAATT
SEQ_ID_NO: 13	TCAAGAGACT	CCGATTGTTG	AGGTAACGCG	TTCGATTACG	AAGCATAACT
	751				800
SEQ_ID_NO: 1	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTTCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 3	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTTCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 11	ATCTTGTGTT	GGATGTTGAG	GATATTCCCA	GAATTGTTTCG	TGAGGCTTTT
SEQ_ID_NO: 5	ATTTAGTTTT	GGATGTTGAG	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	GTTTCGGGTCG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: 3	TATCTTGCGA	GTTTCGGGTCG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: 11	TATCTTGCGA	GTTTCGGGTCG	ATGTACCGAA
SEQ_ID_NO: 5	TATCTTGCGT	CTTCTGGTTCG	ATGTACCTAA
SEQ_ID_NO: 13	TTTTTAGCTA	CTTCTGGTAG	ATGTTCCTAA
	851		900
SEQ_ID_NO: 1	AGATATACAG	CAACAGTTAG	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: 3	AGATATACAG	CAACAGTTAG	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: 11	AGATATACAG	CAACAGTTAG	CCGATGAGGT
SEQ_ID_NO: 5	GGATATACAG	CAGCAGTTGG	CCTATTAGGT
SEQ_ID_NO: 13	AGATATTCAA	CAACAGCTTG	GCTATGAGAT
	901		950
SEQ_ID_NO: 1	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: 3	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: 11	TACCGGGTTA	TTTGTCTAGA	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: 5	TACCTGGGTA	TTTGTCTAGG	TGGGCATTTG
SEQ_ID_NO: 13	TACCTGGTTA	TATGTCTAGG	CTCCGGAAGA
	951		1000
SEQ_ID_NO: 1	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: 3	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: 11	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: 5	GAACAGATTG	TTAGGTTGGT	TTTTGTATGT
SEQ_ID_NO: 13	GAGCAGATTG	TTAGGTTGAT	TGTTGTATGT
	1001		1050
SEQ_ID_NO: 1	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: 3	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: 11	GGGTGGTGGG	TGTTTGAATT	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: 5	GGGGGGTGGG	TGTTTGAATT	TTTGTGGAGC
SEQ_ID_NO: 13	TGGTGGTGGT	TGTTTGAATT	TTTGTGGAGC
	1051		1100
SEQ_ID_NO: 1	TTACGGGGAT	TCCGGTTGCG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: 3	TTACGGGGAT	TCCGGTTGCG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: 11	TTACGGGGAT	TCCGGTTGCG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: 5	TTACGGGGAT	ACCGGTTGCG	AGCGTACCCT
SEQ_ID_NO: 13	TTACGGGGAT	CCCTGTTGCG	ATCTTATCCT
	1101		1150
SEQ_ID_NO: 1	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: 3	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: 11	GCTTCGAGTG	ATTTGTCGCT	GTACGGTTTA
SEQ_ID_NO: 5	GCTTCTAGTG	ATTTGTCGCT	GGACCGTTTA
SEQ_ID_NO: 13	TGTGATGATG	AGTTGTCGTT	GGACCGTGTA
	1151		1200
SEQ_ID_NO: 1	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: 3	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: 11	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	TTTGGGGTGC
SEQ_ID_NO: 5	TGCGAATTAT	GCGGTTGATA	TTTGGGGTAA
SEQ_ID_NO: 13	TGCGAATTAC	GCTGTGGAGC	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	AAGATTGTTT	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __3	AAGATTGTTT	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __11	AAGATTGTTT	ATATTGATAT	TGATCCTGCT	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __5	AAGATTGTTT	ATATTGATAT	TGATTCTGCG	GAAATTGGGA	AGAATAAGCA
SEQ_ID_NO: __13	AAGATTGTTT	ATATTGATAT	TGACTCTGCT	GAGATTGGGA	AGAATAAGAC
	1301				1350
SEQ_ID_NO: __1	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTAA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: __3	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTAA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: __11	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTAA	GGTCGCGTTA	CAGGGTTTGA
SEQ_ID_NO: __5	GCCTCATGTG	TCGATTTGTG	GTGATATTAA	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	GGAGGTAAAG	AATTCGGTGA	CTAATCTTGA	TTTCTCGAAC
SEQ_ID_NO: __13	ATAAGGTTCT	TGAGAACCGA	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	AACGTTTGCG	GAAGCGATTG	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: __3	AACGTTTGCG	GAAGCGATTG	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: __11	AACGTTTGCG	GAAGCGATTG	CTCCACAGTA	TGCTATTCAA	GTTCTTGATG
SEQ_ID_NO: __5	AACATTTGGC	GAAGCTATTG	CTCCGACAGTA	TGCCATTCAA	GTGCTTGATG
AY124092	GACGTTTGCG	GAAGCTATTG	CTCCACAGTA	TGCGATTAA	GTCCTTGATG
	1501				1550
SEQ_ID_NO: __1	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCGG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: __3	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCGG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: __11	AGTTAACGGG	CGGGAATGCA	ATTATTAGCA	CCGGTGTCGG	GCAACATCAG
SEQ_ID_NO: __5	AGTTAACGGG	TGGGAATGCG	ATTATTAGCA	CTGGGGTCCG	GCAGCATCAG
SEQ_ID_NO: __13	AGTTGACTGA	TGGAAAAGCC	ATAATAAGTA	CTGGTGTCGG	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	TTAACAACCA	GCATTTGGGT	ATGGTGGTTC
SEQ_ID_NO: 5	TCCTGTAAAG	ATTTTGTTAC	TTAACAATCA	GCATTTGGGT	ATGGTGGTTC
AY124092	TCCAGTGAAG	ATACTCTTAT	TAAACAACCA	GCATCTTGGC	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	TCGGTTCTAC	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	TGTTTGCAGC
	1901				1950
SEQ_ID_NO: 1					
SEQ_ID_NO: 3					
SEQ_ID_NO: 11	AGCCTGTGAT	ATCCCGGCTG	CTCGAGTGAC	CCAAAAGGCG	GATCTACGAG
SEQ_ID_NO: 5	AGCGTGTGAT	ATCCCAGCTG	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	ATGATCCCGG	CTGGCGGAGG
SEQ_ID_NO: 5	ATCGTGCCCC	ATCAAGAACA	TGTGTTGCC	ATGATCCCGG	CTGGTGGAGG
SEQ_ID_NO: 13	ATTTGTCCGC	ACCAAGAACA	TGTGTTGCC	ATGATCCCGA	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	AATGTTTTGT	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: 12	MA	APPNPSISFK	PPSPAAALPP	RSAFLPRFAL	PITSTTQKRH
SEQ_ID_NO: 6	MAAI	PHTNPSITTK	PPSS....PP	RPTFLARFTF	PITSTSHKRH
SEQ_ID_NO: 14	MAAATTTTTT	SSSI SFSTKP	SPSSSKSPLP	ISRFSLPFSL	NPNKSSSSSR
	51				100
SEQ_ID_NO: 2					
SEQ_ID_NO: 4					
SEQ_ID_NO: 12	RLHISNVLSD	SKSTTTTTTT	T.....QR	PLPVQPFVSR	YAPDQPRKGA
SEQ_ID_NO: 6	RLHISNVLSD	SKPTITHS..		PLPTKSFISR	YAPDQPRKGA
SEQ_ID_NO: 14	RRGIKSSSPS	SISAVLNTTT	NVTTTPSPTK	PTKPETFISR	FAPDQPRKGA
	101		*		150
SEQ_ID_NO: 2		FAYPG	6TSM EIHQAL	TRSS TIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 4		FAYPG	GASMEIHQAL	TRSS TIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 12	DVLVEALERE	GVTDVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSS TIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 6	DVLVEALERE	GVTDVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSS TIRNVL	PRHEQGGVFA
SEQ_ID_NO: 14	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL	TRSS SIRNVL	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	PGICIATSGP	GATNLVSGLA	DALLDSVPLV	AITGQVPRRM
	201				250
SEQ_ID_NO: 2	IGTDAFQETP	IVEVTR SITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 4	IGTDAFQETP	IVEVTR SITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 12	IGTDAFQETP	IVEVTR SITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 6	IGTDAFQETP	IVEVTR SITK	HNYLVLDVED	IPRIVREAFY	LASSGRPGPV
SEQ_ID_NO: 14	IGTDAFQETP	IVEVTR SITK	HNYLVMDVED	IPRIIEEAFY	LATSGRPGPV
	251				300
SEQ_ID_NO: 2	LIDVPKDIQQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 4	LIDVPKDIQQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 12	LIDVPKDIQQ	QLVVPKWDEP	MRLPGYLSRM	PKPQYDGHLE	QIVRLVGEAK
SEQ_ID_NO: 6	LIDVPKDIQQ	QLVVPKWDEP	IRLPGYLSRF	PKTENNGQLE	QIVRLVSEAK
SEQ_ID_NO: 14	LVDVPKDIQQ	QLAI PNWEQA	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	LNSSDELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPG	DDLSLHMLG
	351				400
SEQ_ID_NO: 2	MHGTVYANYA	VDKSDLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 4	MHGTVYANYA	VDKSDLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 12	MHGTVYANYA	VDKSDLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDPAE
SEQ_ID_NO: 6	MHGTVYANYA	VDKSDLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAE
SEQ_ID_NO: 14	MHGTVYANYA	VEHSDLLAF	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	AIPPPYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 4	FPLSFKTFGE	AIPPPYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 12	FPLSFKTFGE	AIPPPYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 6	YPLSFKTFGE	AIPPPYAIQV	LDELTGGNAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYNK
SEQ_ID_NO: 14	FPLSFKTFGE	AIPPPYAIKV	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	LLLNNQHLGM	VVQWEDRFYK	ANRAHTYLGN	PSKESEIFPN
SEQ_ID_NO: 6	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VVQWEDRFYK	ANRAHTYLGN	PSKESEIFPN
SEQ_ID_NO: 14	IRVEQLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTFLGD	PAQEDEIFPN
	601				650
SEQ_ID_NO: 2					
SEQ_ID_NO: 4					
SEQ_ID_NO: 12	MVKFAEACDI	PAARVTQKAD	LRAAIQKMLD	TPGPYLLDVI	VPHQEHLVPM
SEQ_ID_NO: 6	MLKFAEACDI	PAARVTRKAD	LRAAIQKMLD	TPGPYLLDVI	VPHQEHLVPM
SEQ_ID_NO: 14	MLLFAAACGI	PAARVTKKAD	LREAIQTMLD	TPGPYLLDVI	CPHQEHLVPM
	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

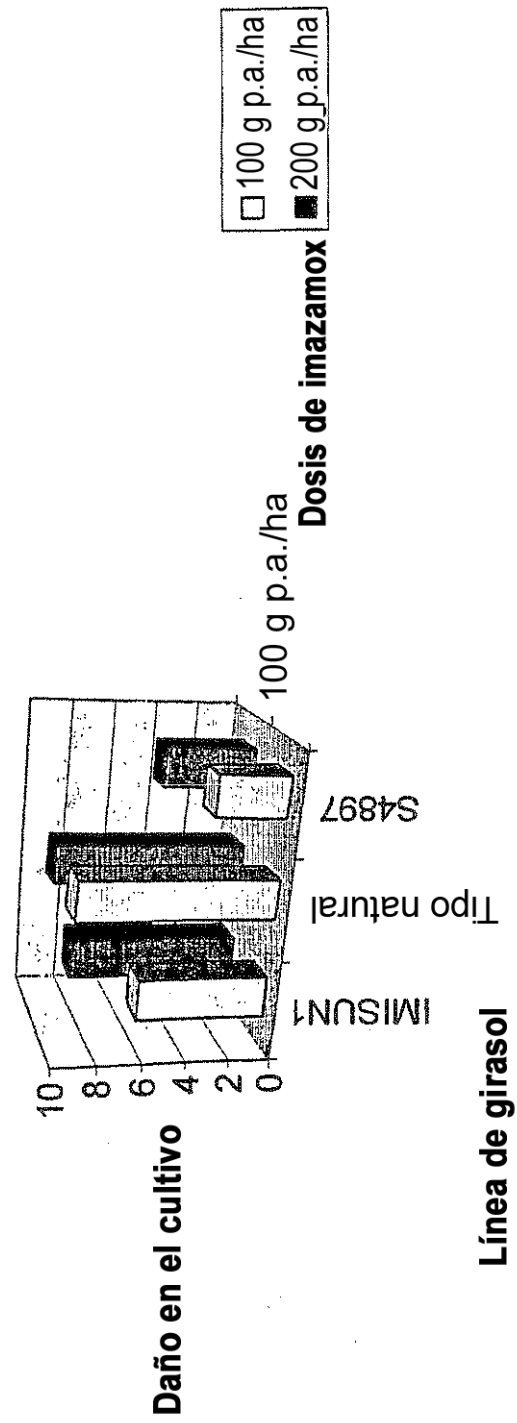


FIGURA 5

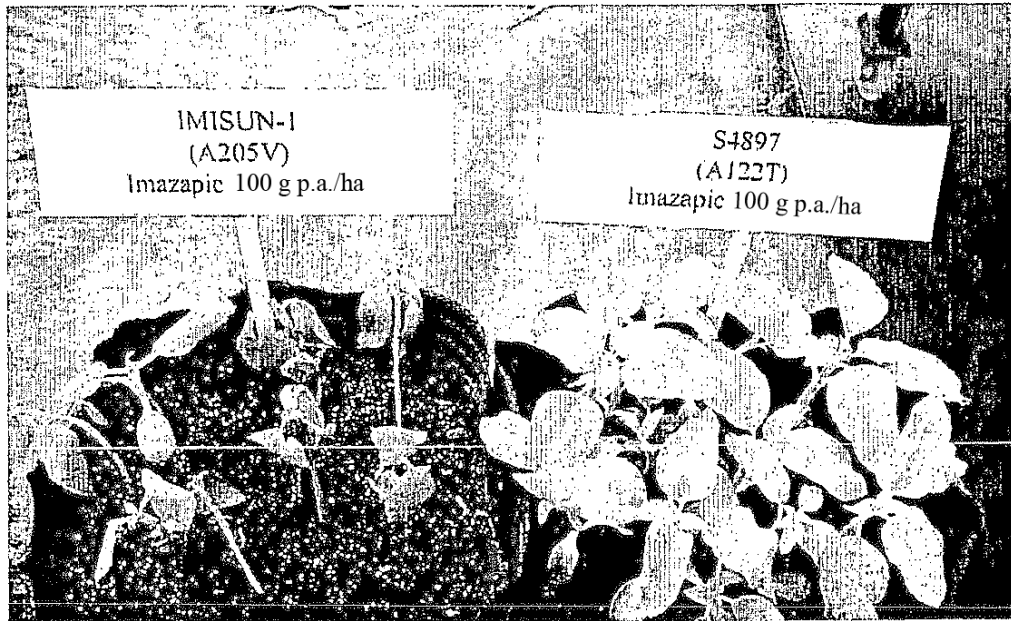


FIGURA 6

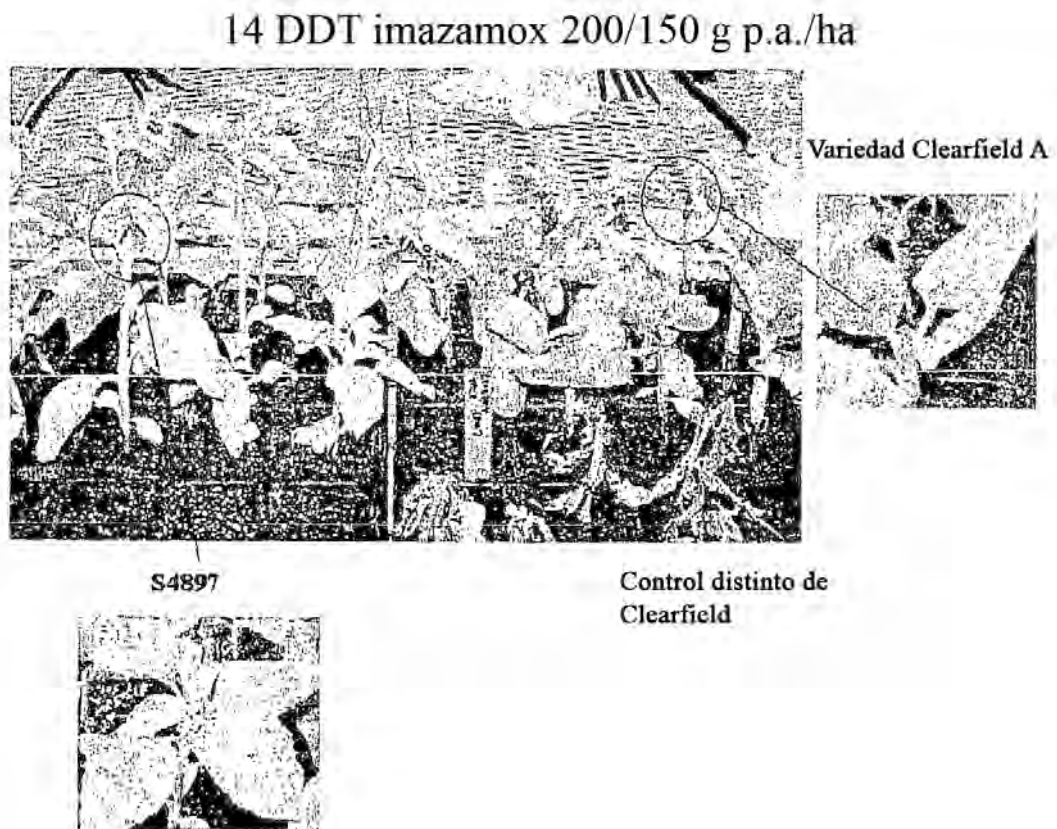


FIGURA 7

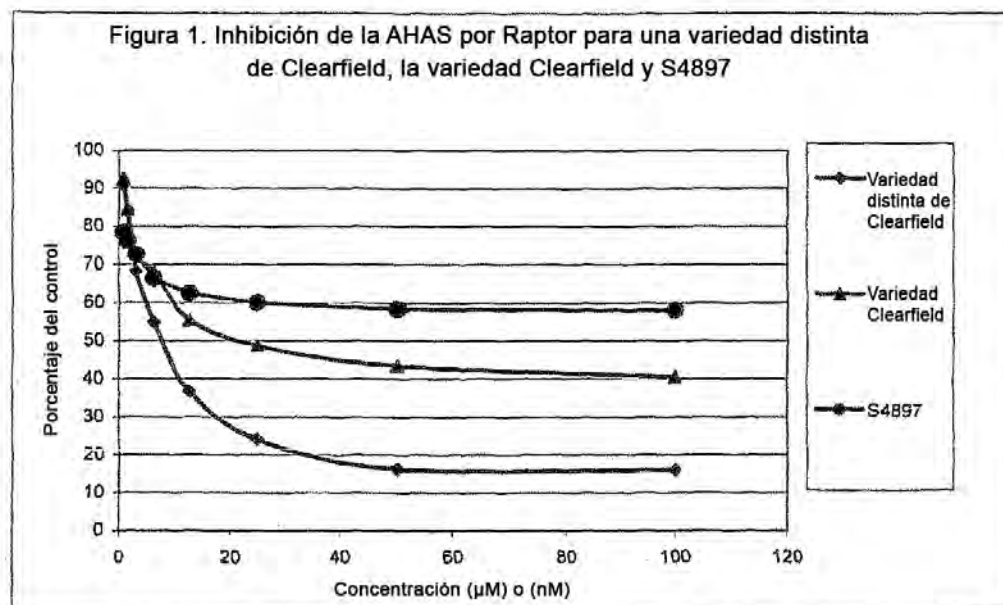


FIGURA 8

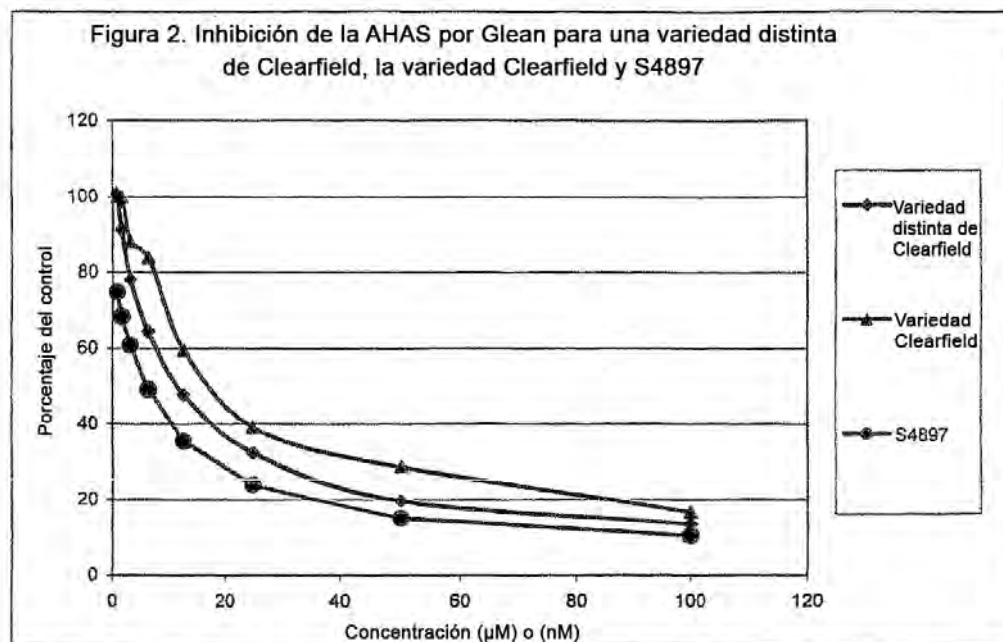


FIGURA 9

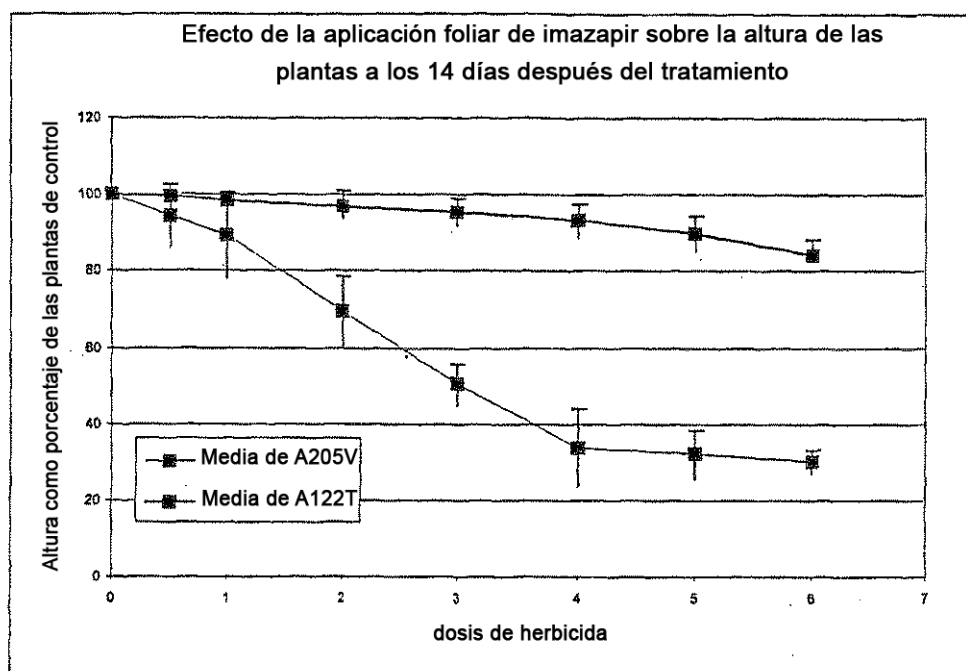


FIGURA 10

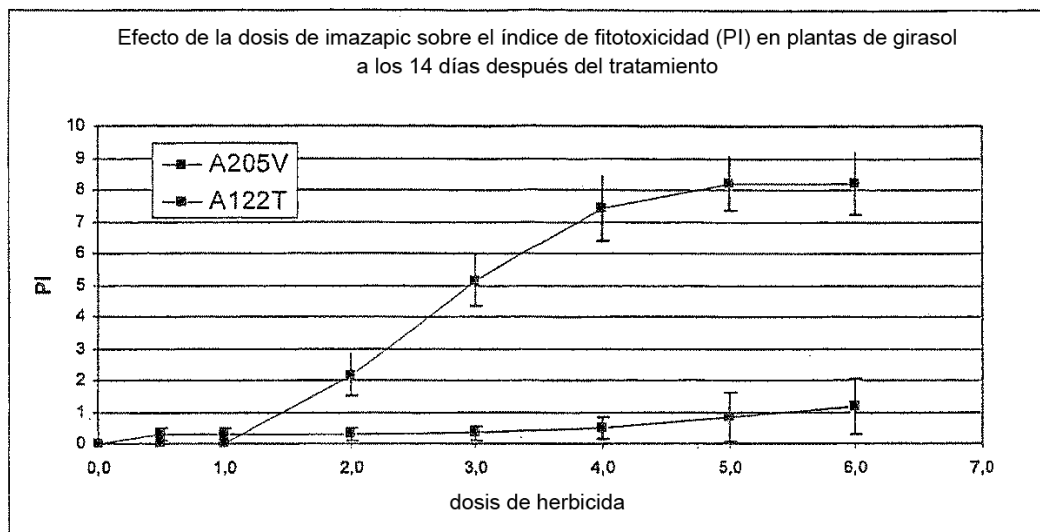


FIGURA 11

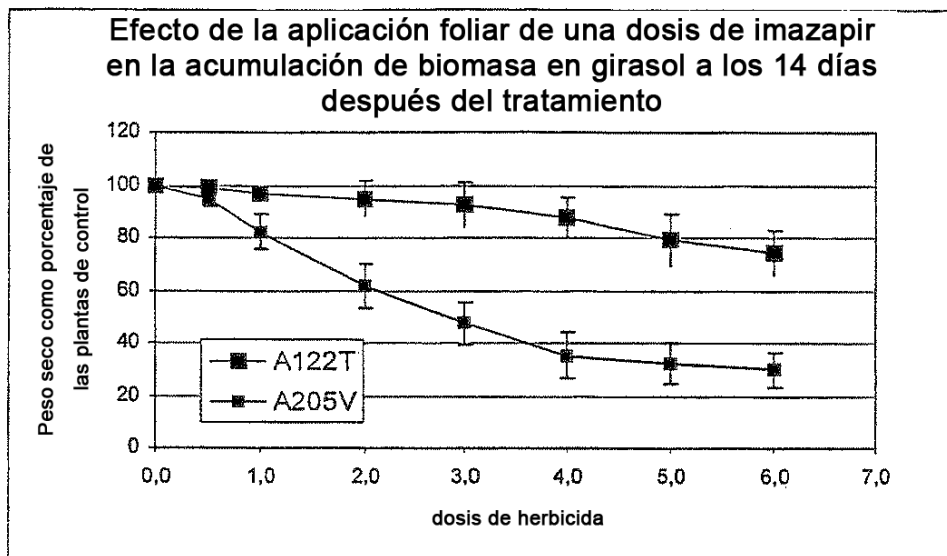


FIGURA 12

