

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 987**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07848061 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2091319**

54 Título: **Plantas de girasol resistentes a herbicidas y métodos de uso**

30 Prioridad:

12.12.2006 US 874309 P

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS, B.V. (50.0%)
Kadestraat 1
6811 CA Arnhem, NL y
ADVANTA SEEDS B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEON, ALBERTO JAVIER;
MORATA, MONICA MARIEL y
ZAMBELLI, ANDRES DANIEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

ES 2 581 987 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 y métodos de uso

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con el campo de biotecnología para la agricultura, particularmente con plantas de girasol resistentes a herbicidas y secuencias novedosas de polinucleótidos que codifican proteínas de subunidad grande de acetohidroxiácido sintetasa de girasol resistente a herbicida y tipo silvestre.

Antecedentes de la invención

10 La acetohidroxiácido sintetasa (AHAS; EC 4.1.3.18, también conocida como acetolactato sintetasa 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," in *Plant Amino Acid*, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. Nueva York, Nueva York, pp. 227-247). AHAS es el sitio de acción de cinco familias de herbicidas diversas estructuralmente que incluyen las sulfonilureas (LaRossa and Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner et al. (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian and Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines," in *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E., eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 277-288), y los pirimidiloxibenzoatos (Subramanian et al. (1990) *Plant Physiol.* 94: 239-244). Los herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea son usados ampliamente en la agricultura moderna debido a su efectividad a ratas de aplicación muy bajas y sin toxicidad relativa en animales. Por inhibir la actividad de AHAS, estas familias previenen crecimiento y desarrollo adicionales de plantas susceptibles que incluyen muchas especies de maleza. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona disponibles comercialmente son PURSUIT® (imazetapyr), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapyr). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorosulfurona, metil metsulfurona, metil sulfometurona, etil cloroimurona, metil thifensulfurona, metil tribenurona, metil bensulfurona, nicosulfurona, metil etametsulfurona, rimsulfurona, metil triflurosulfurona, triasulfurona, metil primisulfurona, cinosulfurona, amidosulfurona, flazasulfurona, imazosulfurona, etil pirazosulfurona y halosulfurona.

25 Debido a su alta efectividad y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se ven favorecidos para aplicación por aerosol sobre la parte superior de un área amplia de vegetación. La habilidad de atomizar un herbicida sobre la parte superior sobre un rango amplio de vegetación disminuye el costo asociado con el establecimiento y mantenimiento de plantas y disminuye la necesidad de preparación de sitio antes del uso de dichas sustancias químicas. Atomizar sobre la parte superior de una especie tolerante deseada también resulta en la habilidad de lograr el máximo potencial de producción de la especie deseada debido a la ausencia de especies competitivas. Sin embargo, la habilidad de usar tales técnicas de atomización, depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada en el área de atomización.

35 Entre la mayoría de cultivos de agricultura, algunas especies de leguminosas tales como soja son naturalmente resistentes a herbicidas de imidazolinona debido a su habilidad para metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner and Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471). Otros cultivos tales como maíz (Newhouse et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) y Ross (Barrett et al. (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, New York, pp. 195-220) son de alguna manera susceptibles a herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a herbicidas de imidazolinona es dependiente de la naturaleza química del herbicida particular y metabolismo diferencial del compuesto de una forma tóxica a una 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 fisiológicas de la planta tales como absorción y translocación también juegan un papel importante en la sensibilidad (Shaner and Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

45 Plantas resistentes a imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, y pirimidiloxibenzoatos han sido producidas satisfactoriamente usando semillas, microesporas, polen, y mutagénesis de callo en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (es decir, canola) *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, remolacha de azúcar (*Beta vulgaris*) y *Oryza sativa* (Sebasrian 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 and Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620; documento U.S. 5,545,822). En todos los casos, un gen individual, nuclear parcialmente dominante confirió resistencia. Se aislaron previamente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona después de la mutagénesis de semilla de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Los estudios de herencia confirmaron que un gen individual nuclear parcialmente dominante confirió resistencia. Con base en estudios alélicos, se concluyó que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas estaban localizadas en el mismo locus. Uno de los genes de resistencia a cultivar Fidel fue designado FS-4 (Newhouse et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886).

55 Las poblaciones de plantas que de origen natural que se descubrió que eran resistentes a herbicidas de imidazolinona y/o sulfonilurea también han sido usadas para desarrollar líneas de engendramiento de girasol resistentes a herbicidas. Recientemente, se desarrollaron dos líneas de girasol que son resistentes a herbicidas de

sulfonilurea usando germoplasma originario de una población silvestre de girasoles comunes (*Helianthus annuus*) como la fuente del rasgo de resistencia a herbicidas (Miller and Al-Khatib (2004) Crop Sci. 44:1037-1.038). Anteriormente, White et al. ((2002) Weed Sci. 50:432-437) reportaron que individuos de una población silvestre de girasoles comunes de Dakota del Sur, EEUU, tuvieron resistencia cruzada a un herbicida de imidazolinona sulfonilurea. El análisis de una porción de la región que codifica de genes de subunidad grande de acetohidroxiácido sintetasa (AHASL) de individuos de esta población, reveló una mutación puntual que resultó en una sustitución de aminoácido Ala a Val en la proteína AHASL de girasol que corresponde a Ala₂₀₅ en la proteína *Arabidopsis thaliana* AHASL de tipo silvestre (White et al. (2003) Weed Sci. 51:845-853).

El modelo basado en ordenador de una conformación tridimensional del inhibidor complejo AHAS predice varios aminoácidos en la bolsa de unión del inhibidor propuesto como sitios en donde las mutaciones inducidas probablemente conferirían resistencia selectiva a imidazolinonas (Ott et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:359-368). Las plantas de trigo producidas con algunas de estas mutaciones designadas racionalmente en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS de hecho, han exhibido resistencia específica a una única clase de herbicidas (Ott et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:359-368).

La resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona también ha sido reportada en una serie de patentes. Los documentos U.S. Nos. 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 y 6,222,100 generalmente describen el uso de un gen AHAS alterado para obtener resistencia a los herbicidas en plantas, y específicamente divulgan ciertas líneas de maíz de resistencia a imidazolinona. El documento U.S. No. 5,013,659 divulga plantas que exhiben resistencia a herbicidas debido a mutaciones en al menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas en el documento codifican ya sea resistencia cruzada para imidazolinonas y sulfonilureas o resistencia específica a sulfonilurea, pero no se describe resistencia específica a imidazolinona. Los documentos U.S. No. 5,731,180 y U.S. No. 5,767,361 discuten un gen aislado que tiene una sustitución de aminoácido individual en una secuencia de aminoácido AHAS monocotiledónea de tipo silvestre que resulta en resistencia específica a imidazolinona. Adicionalmente, las plantas de arroz que son resistentes a herbicidas que interfieren con AHAS, han sido desarrolladas por engendramiento por mutación y también por selección de plantas resistentes a herbicidas de un conjunto de plantas de arroz producidas por otro cultivo. Véanse los documentos U.S. Nos. 5,545,822, 5,736,629, 5,773,703, 5,773,704, 5,952,553 y 6,274,796. Las plantas de girasol que comprenden un AHASL1 de resistencia a herbicidas son descritas en el documento WO 2006/024351.

En las plantas, como en todos los otros organismos examinados, la enzima AHAS comprende dos subunidades: una subunidad grande (rol catalítico) y una subunidad pequeña (rol regulatorio) (Duggleby y Pang (2000) J. Biochem. Mol. Biol. 33:1-36). La subunidad grande AHAS (también denominada aquí como AHASL) puede estar codificada por un gen individual como en el caso de *Arabidopsis*, arroz y remolacha dulce o de múltiples miembros de la familia de genes como en maíz, canola, y algodón. Específicamente, sustituciones de nucleótidos individuales 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 para pan, *Triticum aestivum* L., contiene tres genes de subunidad grande de acetohidroxiácido sintetasa homólogos. Cada uno de los genes exhibe expresión significativa basada en respuesta a herbicidas y datos bioquímicos de mutantes en cada uno de los tres genes (Ascenzi et al. (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, España, Ref. No. S10-17). Las secuencias que codifican de todos los tres genes comparten homología extensiva al nivel de nucleótido (WO 03/014357). A través de la secuenciación de genes AHASL de varias variedades de *Triticum aestivum*, la base molecular de tolerancia a herbicidas en la mayoría de líneas tolerantes a IMI (tolerantes a imidazolinona), se encontró que es una mutación S653(A)N, indicando una serina en sustitución de asparagina en una posición equivalente a la serina en el aminoácido 653 en *Arabidopsis thaliana* (WO 03/01436; WO 03/014357). Esta mutación se debe a un polimorfismo del nucleótido individual (SNP) en la secuencia de ADN codifica la proteína AHASL.

Múltiples genes AHASL son también conocidos por presentarse en especies de plantas dicotiledóneas. Recientemente, Kolkman et al. ((2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159) reportó la identificación, clonación, y secuenciación para tres genes AHASL (AHASL1, AHASL2, y AHASL3) de girasoles de genotipos resistentes a herbicidas y de tipo silvestre (*Helianthus annuus* L.). Kolkman et al. reportaron que la resistencia a herbicidas se debió ya sea a la sustitución Pro 197Leu (usando la nomenclatura de posición de aminoácido de *Arabidopsis* AHASL) o a la sustitución Ala₂₀₅Val en la proteína AHASL1 y que cada una de estas sustituciones proporcionó resistencia tanto a herbicidas de imidazolinona como de sulfonilurea.

Dada su alta efectividad y baja toxicidad, se favorecen los herbicidas de imidazolinona para uso en la agricultura. Sin embargo, la habilidad para usar herbicidas de imidazolinona en un sistema de producción de cultivo particular depende sobre la disponibilidad de variedades resistentes a imidazolinona de la planta de cultivo de interés. Para producir tales variedades resistentes a imidazolinona, los cultivadores de plantas necesitan desarrollar líneas de engendramiento con el rasgo de resistencia a imidazolinona. Así, se requieren líneas de engendramiento resistentes a imidazolinona adicionales y variedades de plantas de cultivo, así como métodos y composiciones para la producción y uso de líneas de engendramiento resistentes a imidazolinona y variedades.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona plantas de girasol que tienen aumento de resistencia a al menos un herbicida cuando se comparan con plantas de girasol de tipo silvestre. En particular, las plantas de girasol de la invención tienen aumento de resistencia a al menos un herbicida de imidazolinona, particularmente imazamox y/o imazapyr, cuando se comparan con una planta de girasol de tipo silvestre. Las plantas de girasol de la invención comprenden las características de tolerancia a herbicida de imidazolinona de la línea MUT31 y al menos un gen AHASL tolerante a herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante herbicida. A diferencia de plantas de girasol resistentes a imidazolinona descritas anteriormente, las plantas de girasol de la línea MUT31 comprenden un mecanismo novedoso de resistencia a herbicida que no involucra una mutación en el gen que codifica una proteína de subunidad grande de acetohidroxiácido sintetasa (AHASL). Las plantas de girasol de la invención también incluyen semillas y plantas de progenie que comprenden las características de tolerancia a herbicida de imidazolinona de la línea MUT31 y al menos un gen AHASL tolerante herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.

Una muestra de semillas de la línea MUT31 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) como Depósito de Patente ATCC No. PTA-7839. La presente invención proporciona semillas, plantas de progenie y otras plantas que comprenden características de resistencia a herbicidas de MUT31 y al menos un gen AHSL tolerante a herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.

La presente invención proporciona métodos para controlar malezas en la vecindad de plantas de girasol de la invención resistentes a herbicidas. Los métodos comprenden la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida a las malezas y a la planta de girasol resistente a herbicida, en la que la planta de girasol resistente a herbicida ha aumentado su resistencia a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona, más particularmente imazamox, cuando se compara con una planta de girasol de tipo silvestre. El herbicida puede ser, por ejemplo, aplicado al follaje de las plantas, a las semillas de las plantas antes de ser plantadas, y/o al suelo antes o después de la siembra.

Adicionalmente, son descritos aquí métodos para producir una planta de girasol resistente a herbicida. Los métodos involucran cruzar una primera planta de girasol que comprende resistencia a un herbicida con una segunda planta de girasol que no es resistente al herbicida, en los que la primera planta de girasol comprende las características de resistencia a herbicida de MUT31, particularmente una planta de girasol de MUT31 o cualquier descendiente de resistencia herbicida de MUT31. Tal resistente a herbicida de las mismas comprende las características de resistencia a herbicida de MUT31, semillas representativas de MUT 31 que han sido depositadas con el ATCC como Patente de Depósito Número PTA-7839. Los métodos adicionalmente involucran selección para una planta progenie que es resistente al herbicida.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de las características de tolerancia a herbicida de imidazolinona de la línea MUT31 en métodos para incrementar la resistencia a herbicida de una planta de girasol. Los métodos involucran cruzar una primera planta de girasol que comprende resistencia a un herbicida con una segunda planta de girasol, en los que la primera planta de girasol comprende las características de resistencia a herbicida de MUT31, particularmente una planta de girasol de MUT31 o cualquier descendiente resistente a herbicida de MUT31. La segunda planta de girasol puede, pero no está ligada a, comprender resistencia a al menos un herbicida. Los métodos adicionalmente involucran selección para una planta progenie que comprende incremento de resistencia a herbicida cuando se comparan con la resistencia a herbicida de la segunda planta de girasol. La segunda planta de girasol puede comprender al menos un gen AHASL de resistencia a herbicida. Tal segunda planta de girasol comprende resistencia mejorada a uno o más herbicidas que inhiben AHAS, particularmente un herbicida de imidazolinona.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica de los resultados de un experimento factorial 2 X 3 X 2 para evaluar los efectos del genotipo de girasol (RHA266 o MUT31), dosificación de herbicida (0, 0.25X, y, 0.50X; donde X = 50 g i.a./ha imazamox), y malatión (0 o 1000 g i.a./ha). Las plantas de girasol estaban en la etapa de crecimiento de hoja 3-4, al tiempo de atomización de malatión y de herbicida. El malatión fue atomizado en las plantas 30 minutos antes de la atomización de imazamox. Las plantas de girasol son evaluadas en 7 días después de la atomización del herbicida para determinar las calificaciones de daño. Los detalles adicionales son proporcionados abajo en el ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con plantas de girasol que tienen una mayor resistencia a al menos un herbicida cuando se comparan con planta de girasol de tipo silvestre. Las plantas de girasol de resistencia a herbicida se produjeron como se describe aquí abajo, por exposición de plantas de girasol (con respecto a la resistencia a herbicida) de tipo silvestre a un mutagen, permitiendo a las plantas madurar y reproducirse, y seleccionando plantas progenie que mostraron mejor resistencia al herbicida de imidazolinona, imazamox, cuando se comparó con la resistencia de una planta de girasol de tipo silvestre al herbicida de imidazolinona. La invención hace uso de la línea de girasol resistente a herbicida novedosa que es designada aquí como MUT31. Mientras la presente invención no está vinculada por cualquier mecanismo biológico particular, las plantas de girasol resistentes a herbicida de la invención comprenden un mecanismo de resistencia a herbicida novedoso que es independiente de una mutación o

mutaciones en uno o más genes AHASL. Así, la presente invención proporciona una nueva fuente de resistencia a imidazolinona que encuentra uso en métodos para controlar malezas y también métodos para producir plantas de girasol resistentes a herbicida, o aumentar la resistencia a herbicida de plantas de girasol que ya comprenden resistencia a herbicida incluyendo, pero no limitadas, a imidazolinona.

5 Para la presente invención, los términos "tolerante a herbicida" y "resistente a herbicida" son usados de manera intercambiable y pretenden tener un significado equivalente, y un alcance equivalente. De manera similar, los términos "tolerancia a herbicida" y "resistencia a herbicida" son usados de manera intercambiable y pretenden tener un significado equivalente y un alcance equivalente. Igualmente, los términos "resistente a imidazolinona" y "resistencia a imidazolinona" son usados de manera intercambiable y pretenden tener un significado equivalente y un alcance equivalente como los términos "tolerante a imidazolinona" y "tolerancia a imidazolinona", respectivamente.

La presente invención implica plantas tolerantes a herbicida o resistentes a herbicida y usos de los mismos. Una planta "tolerante a herbicida" o "resistente a herbicida" es una planta que es tolerante o resistente a al menos un herbicida a un nivel que normalmente mataría, o inhibiría el crecimiento de, una planta de tipo silvestre o normal.

15 En una realización de la invención, los métodos de la presente invención para incremento de resistencia a herbicida de una planta involucran el uso de plantas de girasol que comprenden polinucleótidos AHASL resistentes a herbicida y proteína AHASL resistente a herbicida. Un "polinucleótido AHASL resistente a herbicida" es un polinucleótido que codifica una proteína AHASL resistente a herbicida, en la que la proteína comprende actividad AHAS resistente a herbicida. Una "proteína AHASL " es una proteína AHASL que muestra mayor actividad AHAS, relativa a la actividad AHAS de una proteína AHASL de tipo silvestre, cuando está en la presencia de al menos un herbicida que es conocido por interferir con la actividad AHAS y a una concentración o nivel de herbicida que es conocido por inhibir la actividad AHAS de la proteína AHASL de tipo silvestre. Adicionalmente, la actividad AHAS de dicha proteína AHAS tolerante a herbicida o resistente a herbicida puede ser indicada aquí como actividad AHAS "tolerante a herbicida" o " resistente a herbicida".

25 Adicionalmente se reconoce que una proteína AHASL tolerante a herbicida o resistente a herbicida puede ser introducida entre una planta por transformación de una planta o ancestro de la misma con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida o resistente a herbicida. Tales proteínas AHASL tolerante a herbicida o resistente a herbicida son codificadas por los polinucleótidos AHASL tolerante a herbicida o resistente a herbicida. Alternativamente, una proteína AHASL tolerante a herbicida o resistente a herbicida puede ocurrir en una planta como resultado de una mutación que ocurre naturalmente o inducida en un gen AHASL endógeno en el genoma de la planta o progenitor de la misma. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas AHASL resistentes a herbicidas y plantas resistentes a herbicidas que comprenden un gen endógeno que codifica una proteína AHASL resistentes a herbicidas son conocidas en la técnica. véanse, por ejemplo, los documentos U.S. Nos. 5,013,659, 5,731,180, 5,767,361, 5,545,822, 5,736,629, 5,773,703, 5,773,704, 5,952,553 y 6,274,796.

35 La presente invención proporciona plantas, tejidos de plantas, y células de planta con aumento de resistencia o tolerancia a al menos un herbicida, particularmente a un herbicida de imidazolinona, más particularmente imazamox, imazapyr, o tanto imazamox como imazapyr. La cantidad preferida de concentración del herbicida es una "cantidad efectiva" o "concentración efectiva". Por "cantidad efectiva" y "concentración efectiva" se pretende una cantidad y concentración, respectivamente, que es suficiente para matar o inhibir el crecimiento de una planta, tejido de planta, o célula de planta similar de tipo silvestre, pero dicha cantidad no mata o inhibe severamente el crecimiento de las plantas, tejidos de planta, y células de planta resistentes a herbicidas de la presente invención. Típicamente, la cantidad efectiva de un herbicida es una cantidad que es rutinariamente usada en los sistemas de producción de agricultura para matar malezas de interés. La cantidad es conocida por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, o puede ser determinada fácilmente usando métodos conocidos en la técnica.

45 Las características de tolerancia de herbicida de imidazolinona de la línea MUT31 encuentran uso en el incremento de la resistencia a herbicida de una planta de girasol, incluyendo una planta de girasol que comprende resistencia a uno o más herbicidas, tal como, por ejemplo, aquellos herbicidas que inhiben o de lo contrario interfieren o con la actividad de la enzima AHAS de tipo silvestre. Tales herbicidas pueden ser aquí también denominados como "herbicidas que inhiben AHAS" o simplemente "inhibidores de AHAS". Como es usado aquí, un "herbicida que inhibe AHAS" o un "inhibidor de AHAS " no pretende estar limitado a un herbicida individual que interfiere con la actividad de la enzima AHAS. Así, a menos que se indique lo contrario o sea evidente desde el contexto, un "herbicida que inhibe AHAS" o un "inhibidor de AHAS" puede ser un herbicida o una mezcla de dos, tres, cuatro o más herbicidas, cada uno de los cuales interfiere con la actividad de la enzima AHAS.

55 Por "planta de girasol, tejido planta o célula de planta de tipo silvestre" se pretende una planta de girasol, tejido de planta, o célula de planta, respectivamente, que carece de características de resistencia a herbicida de las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la presente invención, particularmente MUT31 y descendientes de resistentes a herbicidas de las mismas. El uso del término "de tipo silvestre" no tiene, por lo tanto, la intención de implicar que la planta de girasol, tejido planta, o célula de planta carece de ADN recombinante en su genoma, y/o carece de características de resistencia a herbicidas que son diferentes de aquellas divulgadas aquí.

- Como es usado aquí, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" pretende indicar una planta en cualquier etapa de desarrollo, así como cualquier parte o partes de una planta que puede estar vinculada a o separada de una planta completa intacta. Tales partes de una planta incluyen, pero no están limitadas a, órganos, tejidos, y células de una planta. Ejemplos de partes de planta particulares incluyen un tallo, una hoja, una raíz, una inflorescencia, una flor, un florete, una fruta, un pedículo, un pedúnculo, un estambre, una antera, polen, un estigma, un estilo, un ovario, un pétalo, sépalo, un carpelo, una punta de la raíz, una gorra de raíz, un pelo de raíz, un pelo de la hoja, un pelo de semilla, un grano de polen, una microespora, una cotiledónea, un hipocotilo, un epicotilo, xilema, floema, parénquima, endoesperma, una célula compañera, una célula de guardia, y cualquier otro órgano conocido, tejidos y células de una planta. Adicionalmente, se reconoce que una semilla es una planta.
- Las plantas de girasol de la presente invención incluyen tanto plantas no transgénicas como plantas transgénicas. Por "planta no transgénica" se pretende indicar una planta que carece de ADN recombinante en su genoma. Por "planta transgénica" se pretende indicar una planta que comprende ADN recombinante en su genoma. Dicha planta transgénica puede ser producida por introducción de ADN recombinante dentro del genoma de la planta. Cuando dicho ADN recombinante es incorporado dentro del genoma de la planta transgénica, la progenie de la planta también puede comprender el ADN recombinante. Una planta progenie que comprende al menos una porción del ADN recombinante de al menos una planta transgénica progenitora, es también una planta transgénica.
- Las plantas de girasol de la presente invención comprenden características de tolerancia a herbicida de imidazolinona de la línea de girasol resistente a herbicida que es indicada aquí como MUT31 y al menos un gen AHSL tolerante a herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida. Un depósito de al menos 2500 semillas de línea MUT31 de girasol (*Helianthus annuus* L.) con el Depósito de Patente de la American Type Culture Collection (ATCC), Mansassas, VA 20110 EEUU, fue hecho en agosto 22 de 2006 y se le asignó el ATCC Número de Depósito de Patente PTA-7839. El depósito de la línea MUT31 de girasol fue hecho a un término de al menos 30 años y fue recibido al menos 5 años después de la petición más reciente para el suministro de la muestra del depósito por el ATCC. El depósito será mantenido bajo los términos del Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. El depósito de la línea MUT31 de girasol fue hecho por un término de por lo menos 30 años y fue recibido por lo menos 5 años después de la petición más reciente para el suministro de la muestra del depósito por el ATCC. Adicionalmente, los solicitantes han cumplido con todos los requerimientos de 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, que incluye proporcionar una indicación de la viabilidad de la muestra.
- Las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la línea MUT31 se produjeron por engendramiento por mutación. Las plantas de girasol de tipo silvestre fueron mutagenizadas por exposición a un mutagen, particularmente a un mutagen químico, más particularmente etil metanosulfonato (EMS). Sin embargo, la presente invención no está limitada a plantas de girasol resistentes a herbicidas que son producidas por un método de mutagénesis que involucra al mutagen químico EMS. Cualquier método de mutagénesis conocido en la técnica puede ser usado para producir las plantas de girasol resistentes a herbicidas. Tales métodos de mutagénesis pueden implicar, por ejemplo, el uso de uno cualquiera o más de los siguientes mutagenes: radiación, tal como rayos X, rayos Gamma (por ejemplo, cobalto 60 o cesio 137), neutrones, (por ejemplo, el producto de la fisión nuclear por uranio 235 en un reactor atómico), radiación Beta (por ejemplo, emitida desde radioisótopos tales como fósforo 32 o carbono 14), y radiación ultravioleta (preferiblemente desde 2500 hasta 2900 nm), y mutagenes químicos tales como análogos de bases (por ejemplo, 5-bromo-uracil), compuestos relacionados (por ejemplo, cafeína 8-etoxi), antibióticos (por ejemplo, estreptonigrina), agentes de alquilación (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 ser producidas por uso de métodos de cultivo de tejido para seleccionar para células de planta que comprenden mutaciones de resistencia a herbicidas y después regenerando plantas de resistencia a herbicidas de las mismas. Véanse, por ejemplo, los documentos U.S. Nos. 5,773,702 y 5,859,348. Los detalles adicionales del engendramiento pueden ser encontrados en "Principals of Cultivar Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company.
- Las plantas de girasol y semillas de la presente invención comprenden las características de resistencia a herbicidas de MUT31. Tales plantas y semillas pueden ser denominadas aquí como que comprenden el rasgo MUT31. El rasgo confiere resistencia a herbicidas de imidazolinona a una planta o semilla que tiene este rasgo, el rasgo está ya sea en el estado homocigoto u heterocigoto en la planta. En particular, el rasgo MUT31 confiere a una planta o semilla de girasol resistencia a al menos un herbicida de imidazolinona, particularmente imazamox y/o imazapyr, en el que la resistencia a imidazolinona es reducida o inhibida por el insecticida organofosforado malatión. Como se describe aquí abajo, se encontró que se redujo o se inhibió la resistencia o tolerancia de plantas de girasol MUT31 al herbicida imazamox de imidazolinona siguiendo la aplicación de malatión a las plantas de girasol MUT31 antes de la aplicación de imazamox. Así, las plantas y semillas de girasol que comprenden el rasgo MUT31 comprenden resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión. Mientras la presente invención no está vinculada a un mecanismo biológico particular, se cree que la resistencia a herbicidas de plantas de girasol MUT31 o el rasgo MUT31 se debe a una mutación inducida en un gen individual dentro del genoma nuclear del girasol.
- Las plantas de girasol de la presente invención incluyen, por ejemplo, descendientes de la línea MUT31 que son heterocigotos u homocigotos para el rasgo MUT31. Se reconoce que dichos descendientes pueden ser producidos a través de reproducción sexual o cualquier método de reproducción asexual conocidos en la técnica tales como por

ejemplo, cultivo de tejido. Descendientes de la línea MUT31 que comprenden el rasgo MUT31 pueden ser identificados por determinar si una planta de girasol descendiente comprende resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión. La presente invención no depende de un método particular para determinar si una planta de girasol descendiente comprende resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión. Cualquier método conocido en la técnica puede ser usado incluyendo el método divulgado abajo en el ejemplo 3 para determinar si un descendiente de MUT31 comprende resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión. El método implica la aplicación de malatión a un descendiente de MUT31 antes de la aplicación del herbicida de imidazolinona y determinar ya sea si el malatión reduce o inhibe la resistencia del descendiente al herbicida de imidazolinona. Los descendientes que comprenden el rasgo MUT31 comprenden resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión. Así, las plantas de girasol de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellas plantas de girasol que son descendientes de MUT31 y comprenden resistencia a imidazolinona que puede ser inhibida por malatión.

La presente invención proporciona métodos para mejorar la tolerancia o resistencia de una planta, tejido de planta, célula de planta, u otra célula anfitriona de girasol a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona o mezcla de dos o más herbicidas de imidazolinona. Para la presente invención, los herbicidas de imidazolinona incluyen, pero no están limitados a, PURSUIT® (imazetapyr), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapyr), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, y una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo, imazapyr/imazamox (ODYSEY®). Más específicamente, los herbicidas de imidazolinona pueden ser seleccionados de, pero no están limitados a, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinecarboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)- nicotínico, ácido 2-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, y una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato. El uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)- nicotínico es preferido. El uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)- nicotínico es particularmente preferido.

Las plantas resistentes a herbicidas de la invención encuentran uso en los métodos para controlar malezas. Así, la presente invención proporciona adicionalmente un método para controlar malezas en la vecindad de una planta de girasol resistente a herbicida de la invención. El método comprende la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida a las malezas y a la planta de girasol resistente a herbicida, en la que la planta tiene un aumento de resistencia a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona o sulfonilurea, cuando se compara con una planta de tipo silvestre.

Para suministrar plantas que tienen un aumento de resistencia a herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona y sulfonilurea, puede ser empleada una gran variedad de formulaciones para proteger plantas de malezas, con el fin de mejorar el crecimiento de la planta y reducir la competencia por nutrientes. Un herbicida puede ser usado por sí mismo para controles antes de la emergencia, después de la emergencia, antes de sembrar y en el sembrado de malezas en áreas alrededor de las plantas descritas aquí o puede ser usado en una formulación de herbicida de imidazolinona que contiene otros aditivos. El herbicida también puede ser usado como un tratamiento de semilla. Esto es, una concentración efectiva o una cantidad efectiva del herbicida, o una composición que comprende una concentración efectiva o una cantidad efectiva del herbicida, puede ser aplicada directamente en las semillas antes o después o durante el sembrado de las semillas. Los aditivos encontrados en una formulación de herbicida de imidazolinona o sulfonilurea incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de extensión, agentes de adherencia, agentes estabilizantes, o similares. La formulación de herbicida puede ser una preparación húmeda o seca y puede incluir, pero no está limitada a, polvos fluidos, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida y formulaciones de herbicidas pueden ser aplicadas de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, mediante pulverización, riego, espolvoreo, recubrimiento, y similares.

La presente invención proporciona semillas con aumento de resistencia a por lo menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona. Tales semillas incluyen, por ejemplo, semillas de girasol que son descendientes resistentes a herbicidas de la línea girasol MUT31.

Un "descendiente" de la línea girasol MUT31 comprende cualquier planta, célula de planta, o parte de planta que es derivada por propagación sexual y/o asexual de MUT31, semillas representativas de MUT31 que han sido depositadas con el ATCC y se les asignó número ATCC de Depósito de Patente PTA-7839. Por ejemplo, tal descendiente incluye una planta producida cruzando una primera planta con una segunda planta para producir una semilla de la tercera planta (es decir, un descendiente), en el que la primera planta es una planta de girasol MUT31 y la segunda es otra planta de girasol que no es una planta de girasol MUT31. Tal descendiente incluye cualquier planta que es descendiente de la tercera planta ya sea producida por propagación sexual y/o asexual. Por ejemplo, se pueden usar células, tejido o un órgano de una tercera planta para producir una cuarta planta por un método de propagación asexual que incluye, pero no está limitado a, célula de planta in vitro, tejido, y métodos de cultivo de órgano y métodos que implican el enraizamiento de esquejes de tallos.

Para la presente invención, un descendiente resistente a herbicidas de MUT31 es un descendiente de MUT31 que comprende las características de resistencia a herbicidas de MUT31 por medio de ser descendiente de una o más plantas de girasol MUT31. En otras palabras, tal descendiente resistente a herbicidas ha heredado las características de resistencia a herbicidas de una planta de girasol MUT31 por reproducción sexual, reproducción asexual, o combinaciones de las mismas.

A menos que se indique claramente de otro modo o sea evidente por el contexto, la "progenie" de una planta incluye una planta de cualquier creación subsecuente cuya ascendencia se puede remontar a esa planta. De manera similar, a menos que se indique claramente de otro modo por el contexto, la "progenie resistente a herbicidas" de MUT31 incluye una planta de cualquier generación subsecuente cuya ascendencia se puede remontar a MUT31, comprende las características de resistencia herbicidas de MUT31 por medio de tal ascendencia.

Los métodos para producir una planta de girasol resistente a herbicidas, particularmente una planta de girasol resistente a herbicidas, a través de engendramiento de planta convencional que implica reproducción sexual se describen aquí. Los métodos comprenden cruzar una primera planta que comprende resistencia a un herbicida con una segunda planta que no es resistente al herbicida. La primera planta puede ser cualquiera de las plantas resistentes a herbicidas de la presente invención que incluyen, por ejemplo, plantas de girasol que comprenden las características de resistencia herbicidas de la planta de girasol MUT31, particularmente MUT31 plantas de girasol y descendientes resistentes a herbicidas de MUT31. La segunda planta puede ser cualquier planta que es capaz de producir plantas de progenie viable (es decir, semillas) cuando se cruza con la primera planta. Típicamente, pero no necesariamente, las primeras y segundas plantas son de la misma especie. Los métodos pueden implicar adicionalmente una o más generaciones de retroentrecruzamiento de las plantas progenie del primer cruce con una planta de la misma línea o genotipo como la primera o la segunda planta. Alternativamente, la progenie del primer cruce o cualquier cruce subsecuente puede ser cruzada con una tercera planta que es de una línea o genotipo diferente a cualquiera de la primera o segunda planta. Los métodos pueden implicar adicionalmente selección de plantas que comprenden las características de resistencia herbicidas de la primera planta.

Los métodos adicionales para incrementar la resistencia de una planta a herbicidas, particularmente una planta de girasol resistente a herbicidas, a través de engendramiento de planta convencional que implica reproducción sexual se describen aquí. Los métodos comprenden cruzar una primera planta que comprende resistencia a un herbicida con una segunda planta que puede o puede no ser resistente al herbicida o puede ser resistente a un herbicida o herbicidas diferentes de los de la primera planta. La primera planta puede ser cualquiera de las plantas de girasol resistentes a herbicidas de la presente invención que incluyen, por ejemplo, una planta de girasol MUT31 y un descendiente resistente a herbicidas de las mismas. La segunda planta puede ser cualquier planta que es capaz de producir plantas de progenie viables (es decir, semillas) cuando se cruzan con la primera planta. Típicamente, pero no necesariamente, las primeras y segundas plantas son de las mismas especies. Las plantas progenie producidas por este método tiene resistencia mejorada o aumentada a un herbicida cuando se comparan ya sea con la primera o segunda planta o ambas. Cuando las primeras y segundas plantas son resistentes a diferentes herbicidas, las plantas progenie tendrán las características de resistencia a herbicidas combinadas de las primeras y segundas plantas. Los métodos pueden implicar adicionalmente una o más generaciones de retroentrecruzamiento de las plantas progenie del primer cruce con una planta de la misma línea o genotipo ya sea la primera o segunda planta. Alternativamente, la progenie del primer cruce o cualquier cruce subsecuente puede ser cruzada con una tercera planta que es de una línea o genotipo diferente a cualquiera de la primera o segunda planta. Los métodos pueden implicar adicionalmente selección de plantas que comprenden las características de resistencia a herbicidas de la primera planta, o ya sean la primera y segunda planta.

La presente invención proporciona el uso de características de tolerancia a herbicidas de imidazolinona de la línea MUT31 en métodos para mejorar o incrementar la resistencia de una planta de girasol a al menos un herbicida de imidazolinona. Los herbicidas de imidazolinona son conocidos como herbicidas que inhiben AHAS por su reconocida habilidad para inhibir actividad AHAS in vivo e in vitro. Adicionalmente a herbicidas de imidazolinona, los herbicidas que inhiben AHAS incluyen, por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de pirimidiniloxibenzoato, y herbicidas de sulfonilamino-carboniltriaolinona.

En una realización de la invención, los métodos implican mejoramiento o incremento de resistencia de una planta de girasol resistente a herbicidas que comprende resistencia a un herbicida que inhibe AHAS, en los que la resistencia al herbicida que inhibe AHAS se debe a una o más proteínas AHASL resistentes a herbicidas. Tal planta de girasol resistente a herbicidas puede ser resistente a uno o más herbicidas que inhiben AHAS tal como, por ejemplo, un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriaolinona, o mezclas de los mismos. Ejemplos de algunos herbicidas de imidazolinona adecuados son descritos anteriormente. Los herbicidas de sulfonilurea incluyen, pero no están limitados a, clorosulfurona, metsulfurona metil, sulfometurona metil, cloroimuronaetil, thifensulfurona metil, tribenurona metil, bensulfurona metil, nicosulfurona, etametsulfurona metil, rimsulfurona, triflurosulfurona metil, triasulfurona, primisulfurona metil, cinosulfurona, amidosulfurona, flazasulfurona, imazosulfurona, pirazosulfuronaetil, halosulfurona, azimsulfurona, ciclosulfurona, etoxisulfurona, flazasulfurona, flupirsulfurona metil, foramsulfurona, iodosulfurona, oxasulfurona, mesosulfurona, prosulfurona, sulfosulfurona, trifloxisulfurona, tritosulfurona, 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 incluyen, pero no están limitados a, cloransulam,

diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam. Los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato incluyen, pero no están limitados a, bispyribac, pyritiobac, piriminobac, pyribenzoxim y pyriftalid. Los herbicidas de sulfonilamino-carboniltriazolinona incluyen, pero no están limitados a, flucarbazona y propoxycarbazona.

5 Es reconocido que los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato están relacionados cercanamente con los herbicidas de pirimidiniltiobenzoato y se generalizan en el epígrafe de este último nombre por la Weed Science Society of America. Por consiguiente, los herbicidas que pueden ser usados de acuerdo con la presente invención incluyen adicionalmente herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, que incluyen, pero no están limitados a, los herbicidas de the pirimidiniloxibenzoato descritos anteriormente.

10 Las plantas de girasol de la presente invención pueden ser no transgénicas o transgénicas. Ejemplos de plantas de girasol no transgénicas que tienen un aumento de resistencia a al menos un herbicida de imidazolinona incluyen la planta de girasol MUT31, semillas representativas de MUT31 que han sido depositadas con la ATCC como Depósito de Patente No. PTA-7839; o mutante, recombinante, o un derivado producido por ingeniería genética de MUT31; o de cualquier progenie de MUT31; o una planta que es progenie de cualquiera de estas plantas; o una planta que
15 comprende las características de resistencia a herbicidas de MUT31, particularmente un descendiente resistente a herbicidas de MUT31. Un ejemplo de una planta de girasol transgénica que tiene un aumento de resistencia a al menos un herbicida de imidazolinona, es una planta de girasol que es un derivado producido por ingeniería genética de MUT31 que comprende las características de resistencia a herbicidas de MUT31. Tal derivado producido por ingeniería genética puede comprender en su genoma, por ejemplo, un transgen de interés que incluye, pero está
20 limitado a, un gen AHASL resistente a herbicidas, un gen que confiere resistencia a enfermedades, y un gen que confiere resistencia a insectos.

La presente invención proporciona métodos que implican el uso de un herbicida de imidazolinona. En estos métodos, el herbicida de imidazolinona puede ser aplicado por cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no está limitado a, tratamiento de semilla, tratamiento de suelo, y tratamiento foliar.

25 Antes de la aplicación, el herbicida de imidazolinona puede ser convertido en las formulaciones acostumbradas, por ejemplo soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos finos, polvos, pastas y gránulos. La forma de uso depende en el propósito pretendido particular; en cada caso, debe garantizar una distribución buena y uniforme del compuesto de acuerdo con la invención.

30 Las formulaciones son preparadas en una forma conocida (véanse por ejemplo para revisión los documentos US 3,060,084, EP-A 707 445 (para concentrados líquidos), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, 4 de Diciembre de 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4ta Ed., McGraw-Hill, Nueva York, 1963, páginas 8-57 y los siguientes 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, 8ta Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 y Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH,
35 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 por extensión del compuesto activo con auxiliares adecuados para la formulación de compuestos agroquímicos, tal como disolventes y/o vehículos, si se desea emulsificantes, tensoactivos y dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelantes, para formulación de tratamiento de semillas también colorantes y/o aglutinantes, opcionalmente, y/o agentes
40 gelificantes.

[Ejemplos de solventes adecuados son agua, solventes aromáticos (por ejemplo productos de Solvesso, xilileno), parafinas (por ejemplo fracciones de aceite mineral), alcoholes (por ejemplo metanol, butanol, pentanol, bencil alcohol), cetonas (por ejemplo ciclohexanona, gamma-butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP), acetatos (glicol diacetato), glicoles, dimetilamidas de ácidos grasos, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. En principio, también
45 se pueden usar mezclas de solventes.

Ejemplos de vehículos adecuados son harinas minerales naturales (por ejemplo caolines, arcillas, talco, creta), y harinas minerales sintéticas (por ejemplo sílice altamente dispersa, silicatos).

50 Emulsificantes adecuados son emulsificantes no iónicos y aniónicos (por ejemplo éteres de polioxoetileno y alcoholes grasos, alquilsulfonatos y arilsulfonatos).

Ejemplos de dispersantes son licores residuales de sulfito de lignina y metilcelulosa.

55 Surfactantes adecuados usados son sales de metales alcalinos, metales alcalinoterreos y de amonio de ácido lignosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalenosulfónico, alquilarilsulfonatos, alquil sulfatos, alquilsulfonatos, sulfatos de alcoholes grasos, ácidos grasos y glicol éteres de alcoholes grasos sulfatados, adicionalmente condensados de derivados de naftaleno y naftaleno sulfonado con formaldehído, condensados de naftaleno o bien del ácido naftalenosulfónico con fenol y formaldehído, polioxitetileno octilfenol éter, etoxilado isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, alquifenol poliglicol éteres, tributilfenil poliglicol éter, triesteirilfenil poliglicol éter, alquilaril politéter alcoholes, condensado de alcohol óxido de etileno de alcohol graso,

aceite de ricino etoxilado, polioxitetileno alquil éteres, polioxipropileno etoxilado, lauril alcohol poliglicol éter acetal, ésteres de sorbitol, licores residuales de lignina y metilcelulosa.

5 Sustancias que son adecuadas para la preparación de soluciones atomizables directamente, emulsiones, pastas o dispersiones en aceite, son fracciones de aceite mineral de punto de ebullición medio a alto, tal como queroseno o aceite diésel, además aceites de alquitrán de hulla y aceites de origen vegetal o animal, alifáticos, hidrocarburos cíclicos y aromáticos, por ejemplo tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftaleno con grupos alquilo o sus derivados, metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, solventes altamente polares, por ejemplo dimetil sulfóxido, N-metilpirrolidona o agua.

10 También agentes anticongelantes como glicerina, etilenglicol, propilenglicol y bacterias como tales pueden ser añadidas a la formulación.

Agentes antiespumantes adecuados son por ejemplo agentes antiespumantes basados en silicona o estearato de magnesio.

Preservativos adecuados son por ejemplo diclorofeno y enzilalcoholhemiformal.

15 Las formulaciones de tratamiento de semilla pueden comprender adicionalmente aglutinantes y opcionalmente colorantes.

20 Los aglutinantes pueden ser añadidos para mejorar la adhesión de los materiales activos en las semillas después del tratamiento. Aglutinantes adecuados son surfactantes EO/PO de copolímeros de bloque pero también polivinilalcoholes, polivinilpirrolidonas, poliácridatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenoaminas, polietilenoamidas, polietilenoiminas (Lupasol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, polivinilacetato, tilosa y copolímeros derivados de estos polímeros.

25 Opcionalmente, también pueden ser incluidos colorantes en la formulación. Los colorantes adecuados o tintes para formulaciones para tratamiento de semillas son rodamina B, C.I. Pigmento rojo 112, C.I. Solvente Rojo 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 pardo 25, violeta básico 10, violeta básico 49, ácido rojo 51, ácido rojo 52, ácido rojo 14, ácido azul 9, ácido amarillo 23, básico rojo 10, básico rojo 108.

Un ejemplo de un agente gelificante adecuado es carragenina (Satiagel®)

30 Polvos, materiales para ser esparcidos, y productos espolvoreables se pueden preparar mediante la mezcla o moliendo de forma concomitante las sustancias activas con un vehículo sólido.

35 Gránulos, por ejemplo gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, se pueden preparar mediante la unión de los compuestos activos a vehículos sólidos. Ejemplos de vehículos sólidos son minerales de tierra tales como geles de sílice, silicatos, talco, caolín, arcilla de atapulgita, piedra caliza, cal, tiza, bole, loess, arcilla, dolomita, 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, tales como harina de cereales, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa y otros portadores sólidos.

40 En general, las formulaciones comprenden desde 0.01 a 95% en peso, preferiblemente desde 0.1 a 90% en peso, del herbicida de imidazolinona. En este caso, los herbicidas de imidazolinona son empleados en una pureza desde 90% a 100% en peso, preferiblemente 95% a 100% en peso (de acuerdo con el espectro de RMN). Para propósitos de tratamiento de semilla, las formulaciones respectivas pueden ser diluidas 2-10 veces conduciendo a concentraciones en las preparaciones listas para el uso de 0.01 a 60% en peso de compuesto activo en peso, preferiblemente 0.1 a 40% en peso.

45 El herbicida de imidazolinona puede ser usado como tal, en la forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de estas, por ejemplo en la forma de soluciones atomizables directamente, polvos, suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones en aceite, pastas, productos espolvoreables, materiales para esparcir, o gránulos, por medio de pulverización, atomización, espolvoreo, dispersión o riego. Las formas de uso dependen enteramente de los propósitos pretendidos; éstas pretenden asegurar en cada caso la distribución más fina posible del herbicida de imidazolinona de acuerdo con la invención.

50 Las formas de uso acuosas pueden ser preparados de concentrados de emulsión, pastas o polvos que se pueden humectar (polvos atomizables, dispersiones en aceite) por adición de agua. Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones en aceite, las sustancias, tales como, o disueltas en un aceite o solvente, pueden ser homogenizadas en agua por medio un humectante, adherente, dispersante o emulsificante. Sin embargo, también es posible preparar concentrados compuestos de sustancia activa, humectante, adherente, dispersante o emulsificante y, si es apropiado, solvente o aceite, y tales concentrados son adecuados para dilución con agua.

55

Las concentraciones de compuesto activo en las preparaciones listas para ser usadas pueden variar dentro de rangos relativamente amplios. En general, éstas están desde 0.0001 a 10%, preferiblemente desde 0.01 a 1% en peso.

- 5 El herbicida de imidazolinona puede ser usado también satisfactoriamente en el proceso de volumen ultra bajo (ULV), siendo posible aplicar formulaciones que comprenden por encima del 95% en peso del compuesto activo, o incluso aplicar el compuesto activo sin aditivos.

Los siguientes son ejemplos de formulaciones:

1. Productos para dilución con agua para aplicaciones foliares. Para propósitos de tratamiento de semilla, tales productos pueden ser aplicados a la semilla diluida o no diluida.

- 10 A) Concentrados solubles en agua (SL, LS)

Se disuelven 10 partes en peso del herbicida de imidazolinona en 90 partes en peso de agua o un solvente soluble en agua. Como una alternativa, se añaden humectantes u otros agentes auxiliares. El herbicida de imidazolinona se disuelve durante la dilución con agua, en la que se obtiene la formulación con 10% (p/p) del herbicida de imidazolinona.

- 15 B) Concentrados dispersables (DC)

Se disuelven veinte partes en peso del herbicida de imidazolinona en 70 partes en peso de ciclohexanona con adición de 10 partes en peso de un dispersante, por ejemplo polivinilpirrolidona. La dilución con agua puede dar una dispersión, por lo cual se obtiene una formulación con 20% (p/p) de herbicida de imidazolinona.

C) Concentrados emulsificables (EC)

- 20 Se disuelven quince partes en peso del herbicida de imidazolinona en 7 partes en peso de xileno con adición de calcio dodecilbencenosulfonato y aceite de castor etoxilado (en cada caso 5 partes en peso). La dilución con agua da una emulsión, por lo cual se obtiene una formulación con 15% (p/p) de herbicida de imidazolinona.

D) Emulsiones (EW, EO, ES)

- 25 Se disuelven veinticinco partes en peso del herbicida de imidazolinona en 35 partes en peso de xileno con adición de calcio dodecilbencenosulfonato y etoxilado de aceite de castor (en cada caso 5 partes en peso). Esta mezcla es introducida dentro de 30 partes en peso de agua por medio de una máquina emulsificante (por ejemplo Ultraturax) y hecha dentro una emulsión homogénea. La dilución con agua da una emulsión, por lo cual se obtiene una formulación con 25% (p/p) del herbicida de imidazolinona.

E) Suspensiones (SC, OD, FS)

- 30 En un molino de bolas de agitado, 20 partes en peso del herbicida de imidazolinona se trituran con adición de 10 partes en peso de dispersantes, humectantes y 70 partes en peso de agua o de un solvente orgánico para dar una suspensión de herbicida de imidazolinona fina. La dilución con agua da una suspensión estable del herbicida de imidazolinona, por lo cual se obtiene una formulación con 20% (p/p) del herbicida de imidazolinona.

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

- 35 Se muelen finamente cincuenta partes en peso del herbicida de imidazolinona con adición de 50 partes en peso de dispersantes y humectantes, y hechos como gránulos dispersables en agua o solubles en agua por medio de aparatos técnicos (por ejemplo extrusión, torre de pulverización, lecho fluidizado). La dilución con agua da una dispersión o solución estable del herbicida de imidazolinona, por lo cual se obtiene una formulación con 50% (p/p) del herbicida de imidazolinona.

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

Se muelen setenta y cinco partes en peso del herbicida de imidazolinona en un molino de rotor estator de 25 partes en peso de dispersantes, humectantes y gel de sílice. La dilución con agua da una dispersión o solución estable del herbicida de imidazolinona, por lo cual se obtiene una formulación con 75% (p/p) del herbicida de imidazolinona.

I) formulación de gel (GF)

- 45 En un molino de bolas de agitado, 20 partes en peso del herbicida de imidazolinona se trituran con adición de 10 partes en peso de dispersantes, 1 parte en peso de un agente gelificante húmedo y 70 partes en peso de agua o de un solvente orgánico para dar una suspensión de herbicida de imidazolinona fina. La dilución con agua da una suspensión del herbicida de imidazolinona estable, en la que se obtiene una formulación con 20% (p/p) del herbicida de imidazolinona. Esta formulación de gel es adecuado como un tratamiento de semilla.

2. Productos para ser aplicados sin diluir para aplicaciones foliares. Para propósitos de tratamiento de semilla, tales productos pueden ser aplicados a la semilla diluida.

A) Polvos espolvoreables (DP, DS)

5 Se muelen cinco partes en peso del herbicida de imidazolinona y se mezclan íntimamente con 95 partes en peso caolín dividida finamente. Esto da un producto espolvoreable que tiene 5%) (p/p) del herbicida de imidazolinona.

B) Gránulos (GR, FG, GG, MG)

10 Se muele finamente una mitad de parte en peso del herbicida de imidazolinona y se asocia con 95.5 partes en peso de vehículos, por lo cual se obtiene una formulación con 0.5%) (p/p) del herbicida de imidazolinona. Los métodos actuales son extrusión, secado por pulverización o el lecho fluidizado. Esto da gránulos para ser aplicados sin diluir para uso foliar.

15 Las formulaciones de tratamiento de semilla convencional incluyen por ejemplo concentrados fluidos FS, soluciones LS, polvos para tratamiento en seco DS, polvos dispersables en agua para tratamiento en suspensión WS, polvos solubles en agua SS y emulsión ES y EC y formulación de gel GF. Estas formulaciones pueden ser aplicadas a la semilla diluida o no diluida. La aplicación a las semillas es llevada a cabo antes de la siembra, ya sea directamente en las semillas.

En una realización preferida se usa una formulación FS para tratamiento de semilla. Típicamente, una formulación puede comprender 1-800 g/l de ingrediente activo, 1-200 g/l de surfactante, 0 a 200 g/l de agente anticongelante, 0 a 400 g/l de aglutinante, 0 a 200 g/l o de un pigmento y hasta 1 litro de un solvente, preferiblemente agua.

20 La presente invención proporciona semillas de las plantas resistentes a herbicidas de la presente invención, particularmente semillas que son descendientes de resistentes a herbicidas de MUT31. Para el tratamiento de semilla, las semillas de la presente invención son tratadas con herbicidas, preferiblemente herbicidas seleccionados del grupo que consiste en herbicidas que inhiben AHAS tales como amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfurona, cloroimurona, clorosulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfurona, etoxisulfurona, flazasulfurona, flupirsulfurona, foramsulfurona, halosulfurona, imazosulfurona, iodosulfurona, mesosulfurona, metsulfurona, nicosulfurona, oxasulfurona, primisulfurona, prosulfurona, pirazosulfurona, rimsulfurona, sulfometurona, sulfosulfurona, tifensulfurona, triasulfurona, tribenurona, trifloxisulfurona, triflusulfurona, tritosulfurona, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piritalid, piriitobac, y mezclas de los mismos, o con una formulación que comprende un herbicida que inhibe AHAS.

30 Preferiblemente, los herbicidas que inhiben AHAS que pueden ser usados de acuerdo con la presente invención son herbicidas de imidazolinona.

El término tratamiento de semilla comprende todas las técnicas de tratamiento de semillas adecuados conocidos en la técnica, tales como la desinfección de semillas, recubrimiento de semillas, espolvoreo de semillas, semillas en remojo, y granulación de las semillas.

35 De acuerdo con una variante de la presente divulgación, el suelo puede ser tratado por la aplicación, en particular en la sembradora: ya sea de una formulación granulada que contiene el herbicida de imidazolinona como una composición/formulación (por ejemplo una formulación granulada) con opcionalmente uno o más sólidos o líquidos, vehículo aceptables en agricultura y/u opcionalmente con uno o más surfactantes aceptables en agricultura. Éste método es empleado ventajosamente, por ejemplo, en los semilleros de cereales, maíz, algodón y girasol.

40 La presente divulgación también comprende semillas recubiertas con o que contienen una formulación de tratamiento de semillas que comprende al menos un inhibidor ALS seleccionado del grupo que consiste en amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfurona, cloroimurona, clorosulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfurona, etoxisulfurona, flazasulfurona, flupirsulfurona, foramsulfurona, halosulfurona, imazosulfurona, iodosulfurona, mesosulfurona, metsulfurona, nicosulfurona, oxasulfurona, primisulfurona, prosulfurona, pirazosulfurona, rimsulfurona, sulfometurona, sulfosulfurona, tifensulfurona, triasulfurona, tribenurona, trifloxisulfurona, triflusulfurona, tritosulfurona, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsularri, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piritalid y piriitobac.

45

50 El término semilla abarca semillas y propagúlos de plantas de todas las clases que incluyen pero no están limitadas a verdaderas semillas, trozos de semillas, retoños, cormos, bulbos, tubérculos, frutas, granos, esquejes, brotes cortados y similares, e indica en una realización preferida semillas verdaderas.

55 El término "recubierto con y/o que contiene" generalmente indica que el ingrediente activo está en su mayoría en la superficie de producto de propagación en el tiempo de la aplicación, aunque una parte mayor o menor del ingrediente puede penetrar dentro del producto de propagación, que depende del método de aplicación. Cuando dicho producto de propagación es replantado, puede absorber el ingrediente activo.

La aplicación de tratamiento de semilla con el herbicida de imidazolinona o con una formulación que comprende el herbicida de imidazolinona se lleva a cabo por atomización o espolvoreo de las semillas antes de sembrar y antes de la emergencia de la planta.

5 En el tratamiento de semillas, las formulaciones que corresponden son aplicadas por tratamiento de semillas con una cantidad efectiva del herbicida de imidazolinona o una formulación que comprende el herbicida de imidazolinona. Aquí, las tasas de aplicación son generalmente de 0.1 g a 10 kg del ingrediente activo (o de la mezcla del ingrediente activo o de la formulación) por 100 kg de semilla, preferiblemente desde 1 g a 5 kg por 100 kg de semilla, en particular desde 1 g a 2.5 kg por 100 kg de semilla. Para cultivos específicos tales como lechuga la tasa puede ser más alta.

10 La presente invención proporciona un método para combatir vegetación indeseada o controlar malezas que comprenden el contacto de semillas de las plantas resistentes de acuerdo con la presente invención antes de sembrar y/o después de la pregerminación con un herbicida de imidazolinona. El método puede comprender adicionalmente la siembra de semillas, por ejemplo, en el suelo en un campo o en un medio para macetas en invernadero. El método encuentra uso particular en combatir vegetación indeseada o controlar malezas en la vecindad inmediata de la semilla.

15 El control de vegetación indeseada se entiende que indica la muerte de malezas y/o de lo contrario retardo o inhibición del crecimiento normal de las malezas. Malezas, en el sentido más amplio, se entiende que indican todas aquellas plantas que crecen en lugares donde no son deseadas.

20 Las malezas que pueden ser combatidas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Las malezas dicotiledóneas incluyen, pero no están limitadas a, malezas del género: 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 malezas monocotiledóneas incluyen, pero no están limitados a, malezas del género: 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.

25 Adicionalmente, las malezas que pueden ser combatidas de acuerdo con la presente invención pueden incluir, por ejemplo, plantas de cultivo que está creciendo en una locación indeseada. Por ejemplo, una planta de maíz voluntario que está en el campo que predominantemente comprende plantas de soja, puede ser considerada una maleza, si la planta de maíz es indeseada en el campo de plantas de soja.

30 Los artículos "uno" y "una" son usados aquí para indicar uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" indica uno o más elementos.

35 Como es usado aquí, la palabra "que comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento declarado, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o paso, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no a modo de limitación.

40 **Ejemplo 1:** Mutagénesis de Línea RHA266 de *Helianthus annuus* y Selección de Plantas Resistentes a Imidazolinona

45 En la primavera de la primera temporada de crecimiento, cuarenta filas de línea RHA266 de girasol (*Helianthus annuus*) fueron sembradas al aire libre en el Advanta Semillas Biotech Research Station en Balcarce, Buenos Aires, Argentina y luego la porción de las plantas fue tratada con etil metanesulfonato (EMS, también indicado como etil éster de ácido metanosulfónico). EMS es un mutagen conocido típicamente que induce transiciones G·G a A·T en ADN (Jander et al. (2003) Plant Physiol. 131:139-146). Las plantas fueron tratadas con una solución que comprende 0.5%, 5%, o 10%, (p/v) EMS. Para cada tratamiento EMS, se trataron 13 columnas de plantas de girasol. Antes del florecimiento, todas las plantas M₀ se colocaron en bolsas con el fin de asegurar que las semillas M₁ resultantes fueran el producto de autopolinización. Las cabezas de las semillas de cada tratamiento EMS fueron cosechadas y trilladas al por mayor. En la siguiente temporada de crecimiento, las semillas M₁ fueron sembradas al aire libre con cada tratamiento en una parcela separada. Veinte días después, cuando las plantas estaban en la etapa de crecimiento par de 2-4 hojas, todas las plantas tratadas con EMS fueron atomizadas con 2 dosificaciones de SWEEPER 70DG (100 g i.a./ha). El ingrediente activo en SWEEPER es imazamox. Después de la atomización del herbicida, un total de 54 plantas sobrevivió y fueron seleccionadas como resistentes putativos. Cuarenta y cuatro plantas resistentes alcanzaron el florecimiento, produjeron polen, y semilla M₂. La distribución de las cuarenta y 55 cuatro plantas resistentes fértiles por tratamiento EMS es indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de Plantas de Girasol Resistentes a Imidazolinona M1 Recuperadas de Cada Tratamiento EMS

Concentración EMS (%)	No. De Plantas Resistentes Recuperadas
0.5	19
5.0	9
10	16

Las muestras de tejido fueron tomadas de cada planta M₁ sobreviviente y el ADN de cada planta fue extraído por amplificación de PCR y estudios de secuenciamiento descritos abajo en el Ejemplo 2.

- 5 Las semillas M₂ que fueron producidas por cada una de las cuarenta y cuatro plantas M₁ fértiles se sembraron en parcelas individuales en Fargo, ND después fue atomizado con 0.5 dosificaciones de SWEEPER 70DG (25 g i.a./ha imazamox) en la etapa de crecimiento del par de 2-4 hojas. Una de las parcelas fue seleccionada y designada como MUT31. Se cosecharon diez y nueve plantas M₂ de MUT31, sus M_{2:3} progenies sembradas en Balcarce en el verano de 2003-2004, y las plantas resultantes permitieron la maduración y después ser auto fecundadas. La semilla de una parcela fue cosechada M₄ y declarada semilla criadora en la base de observaciones fenotípicas. (La semilla criadora es una semilla producida por el control directo de la planta criadora y es la base del primer y recurrente incremento de semillas de fundación.)

Ejemplo 2: Amplificación de PCR y Secuenciamiento de Polinucleótidos de Girasol que Codifican Proteínas AHASL1 Resistentes a Imidazolinona y de Tipo Silvestre

- 15 Para tratar de determinar el origen de la tolerancia a imidazolinona en las plantas de girasol del Ejemplo 1, la amplificación de reacción de cadena de polimerasa (PCR) del ADN genómico fue empleada para amplificar las regiones completas que codifican para cada uno de los genes de girasol AHASL1, AHASL2, y AHASL3. Para las amplificaciones de PCR, se aisló el ADN genómico del tejido de la planta de girasol M₁ MUT31. Control, el ADN genómico de tipo silvestre también fue aislado del tejido de una planta de girasol RHA266 para amplificaciones de PCR de cada uno de los genes AHASL de tipo silvestre. Los productos resultantes de PCR fueron secuenciados para determinar las secuencias de DNA de los genes AHASL1, AHASL2, y AHASL3 de las plantas MUT31 y RHA266.

- 25 Sorprendentemente, cuando las secuencias de ADN de los genes AHASL1, AHASL2, y AHASL3 de MUT31 fueron alineadas y comparadas con sus correspondientes secuencias de ADN de RHA266, no se detectaron diferencias (datos no mostrados). Mientras la presente invención no está vinculada por cualquier mecanismo biológico particular, estos resultados indican que las plantas de girasol del MUT31 comprenden un mecanismo de resistencia a herbicidas novedoso que es independiente de una mutación o mutaciones en uno o más genes AHASL.

Ejemplo 3: Análisis de Desintoxicación de Herbicida por MUT31

- 30 Para evaluar la capacidad de desintoxicación de plantas de girasol MUT31, se realizó un experimento en el invernadero. El objetivo del experimento fue determinar si la tolerancia a imazamox de plantas MUT31 está asociada con el mecanismo de desintoxicación que es mediado por una enzima monooxigenasa P450 (indicada aquí como "enzima P450"). Se reportó previamente que el insecticida de organofosfato malatión (dietil-dimetoxitiofosforiltiosuccinato) específicamente inhibe enzimas P450 por bloqueo de la actividad de desintoxicación del herbicida (Yu et al. (2004) Pest. Biochem. Physiol. 78:21-30). Así, plantas que comprenden tolerancia a herbicida mejorada que es debida a una enzima P450 alterada, se espera que se conviertan en menos tolerantes o susceptibles al herbicida cuando el malatión es aplicado a las plantas antes de ser tratadas con el herbicida.

- 40 Un experimento factorial con tres factores: genotipos (MUT31 y RHA266), dosificación de herbicida (Control, 0.25X, y 0.50X; donde X = 50 g ia/ha de imazamox) y malatión (con o sin malatión) fue organizado en un diseño de bloques al azar en parcelas divididas-divididas. Se atomizó imazamox (SWEEPER) en la etapa de crecimiento de 3-4 hojas. El malatión inhibidor P450 fue atomizado a una rata de 1000 g ia/ha 30 minutos antes de la atomización del herbicida. La evaluación de las plantas fue llevada a cabo siete días después de la atomización del herbicida, usando los criterios establecidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios para Resultados de Daño por Herbicida para Evaluaciones de Planta

Síntoma	Resultado de daño
Clorosis, amarillo instantáneo	5 - 10%
Reducción de rata de crecimiento, acortamiento de entrenudos	10 - 20%
Deformaciones de hoja	20 - 30%
Necrosis	30 - 45%
Planta muerta	+ 50%

La aplicación de malatión en la ausencia del herbicida no tuvo efecto en la respuesta de las líneas de girasol MUT31 y RHA266; tanto la media como la varianza fueron cero (Tabla 3). Ambas líneas fueron más tolerantes (resultado % de daño más bajo) cuando el malatión no fue atomizado antes del imazamox. Cuando las plantas fueron tratadas únicamente con 0.5X de imazamox, MUT31 mostró un incremento significativo en la tolerancia al herbicida con respecto al control RHA266. La tolerancia a herbicidas MUT31 disminuyó significativamente (resultado superior) después del tratamiento de malatión (Tabla 3, Figura 1). Los resultados del análisis estadístico son presentados en la Tabla 4.

Los resultados del experimento factorial indicaron que el malatión inhibió la tolerancia al herbicida exhibido por MUT31 y sugieren que el fenotipo tolerante a herbicidas de MUT31 puede ser debido a un mecanismo de desintoxicación mediado por una o más enzimas P450 alteradas. Aunque la presente invención no depende de un mecanismo biológico particular para mejorar la resistencia a herbicidas, estos resultados sugieren adicionalmente que la planta de girasol MUT31 comprende en su genoma una o más mutaciones en uno o más genes que codifican enzimas P450.

Tabla 3. Media de Resultados de Daño de Herbicida

Dosificación de herbicida	0X (control)		0.25X		0.50X	
	No	Si	No	Si	No	Si
Malatión MUT31.	0.00	0.00	9.50	30.35	20.13	40.31
RHA266	0.00	0.00	27.95	45.30	42.35	45.50

Tabla 4. Análisis Estadístico del Experimento Factorial

MUT-31 y RHA266						
Fuente	Df	MediaSq	F	Pr(>F)	Significado	
Réplicas	3	38.2				
Malatión	1	1893.43	122.01	0.001589	**	
Error (a)	3	15.52				
Dosificación de herbicida	1	619.08	34.966	0.001041	**	
Malatión x dosificación	1	110.45	6.2381	0.046678	*	
Error (b)	6	17.71				
Línea	1	1849.08	101.6794	3.27E-07	***	
Malatión x línea	1	210.89	11.5969	0.005217	**	
Dosificación x línea	1	17.93	0.9857	0.340397		
Malatión x Dosificación x Línea	1	91.63	5.0388	0.044418	*	
Residuales	12	18.19				

Ejemplo 4: Tolerancia a Herbicidas de Líneas de Girasol con MUT31 y un Gen AHASL Tolerante a Herbicidas.

Se realizó un ensayo de campo para comparar la tolerancia a herbicidas de híbridos de girasol que llevan el rasgo MUT31 y la mutación A205V en un gen AHASL de girasol (A205V/A205V). Un gen AHASL de girasol con la mutación A205V que codifica una proteína AHASL que tiene una valina en el aminoácido que corresponde a la posición 205 del aminoácido en la proteína AHASL de *Arabidopsis thaliana*. El aminoácido en la misma posición en una proteína AHASL de girasol de tipo silvestre es alanina. En la secuencia del aminoácido de la proteína AHASL de girasol, esta sustitución de aminoácido de alanina a valina es en la posición 190 del aminoácido. Por convención, los sitios de las sustituciones de aminoácido son conocidos por dar aumento a la resistencia a herbicidas en proteínas AHASL de planta, son típicamente indicados por la posición de la explosión en la secuencia de aminoácido de la proteína AHASL de *Arabidopsis*.

Tabla 5. Descripción de las Líneas de Girasol Evaluadas

Entrada	Tipo de Material	Evento mut	Cigoidad	Descripción de la Entrada
1	Restaurador IMI	A205V	homo	hibrido
2	cms IMI x restaurador IMI	A205V	homo	hibrido
3	WT x restaurador IMI	A205V	hetero	hibrido
4	WT x restaurador IMI	A205V	hetero	hibrido
5	cms A837 x restaurador IMI	A205V	hetero	hibrido
6	cms IMI x restaurador MUT31	A205V/MUT31	hetero	hibrido

Entrada	Tipo de Material	Evento mut	Cigoidad	Descripción de la Entrada
7	WT	---	---	línea
8	Restaurador MUT31	MUT31	homo	línea

5 La semilla de cada entrada se produce en condiciones óptimas de producción de semillas en Suramérica en 2005/2006. El ensayo de campo se lleva a cabo en una locación en Dakota del Norte, EEUU en 2006. Las entradas se organizaron en bloques completos al azar usando un diseño de parcelas divididas que consiste en 3 replicaciones para cada combinación del tratamiento. El factor A fue el tratamiento de herbicida, y el factor B fue la entrada de girasol. El tamaño de la parcela fue de 4 filas x 12 pies y la rata de sembrado fue consistente con las prácticas agronómicas locales. Las ratas de herbicidas para cada tratamiento para las entradas 1-6 se muestran en la Tabla 6. Las ratas de herbicidas para cada tratamiento para las entradas 8 se muestran en la Tabla 7. El volumen de aerosol fue de 10 galones por acre (GPA) (o 100 litros/ha) para un atomizador de morral o 20 GPA (o 200 litros/ha) para un reactor montado boom. Los tratamientos de herbicidas fueron aplicados en la etapa de crecimiento de 2-4 hojas.

Tabla 6. Factor A, Lista de Tratamientos de Herbicidas de las Entradas 1 - 6:

Tratamiento No.	Tratamiento
1	No tratado
2	50 g ia/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
3	100 g ia/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
4	200 g ia/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
5	160 g ia/ha imazapyr + 0.25% (v/v) NIS

NIS = surfactante no iónico

Tabla 7. Factor A, Tratamiento de Herbicidas para la Entrada 8:

Tratamiento No.	Tratamiento
1	No tratado
2	12.5 g ai/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
3	25 g ai/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
4	37.5 g ai/ha imazamox + 0.25% (v/v) NIS
5	80 g ai/ha imazapyr + 0.25% (v/v) NIS

NIS = surfactante no iónico

15 La entrada 7 (línea que mantiene WT) se dejó sin atomización en todos los bloques del tratamiento. Cada tratamiento de herbicida fue probado en una parcela frontera WT para asegurar la eficacia del producto (100% de daño al cultivo en 21 días después de la atomización).

20 Se evaluaron las clasificaciones de fitotoxicidad en 7 días y 21 días siguientes a la aplicación del herbicida. Se registró la fitotoxicidad como la cantidad de planta dañada (en porcentaje), donde una clasificación de '0' indica ningún daño a las plantas de la parcela correspondiente a la parcela no tratada. Una clasificación de '100' indicó necrosis completa (muerte) de las plantas en la parcela correspondiente a la parcela no tratada.

Los datos fueron sometidos a un análisis ANOVA y las medias en las 3 repeticiones son presentadas en la Tabla 8 (fitotoxicidad a 21 días después del tratamiento).

Tabla 8. Clasificación de Fitotoxicidad (% de Daño de Cultivo) registro del Tratamiento 21 días después (DAT)

Entrada	Tipo de Material	Evento mut	Cigiosidad	21DAT		21DAT		21DAT		21 DAT	
				50 G	IMAZAMOX	100 G	IMAZAMOX	200 G	IMAZAMOX	160 G	IMAZAPYR
1	Restaurador IMI	A205	homo	5.00	6.67	6.67	15.00	6.67	6.67	0.00	0.00
2	cms IMI x restaurador IMI	A205	homo	0.00	3.33	3.33	21.67	3.33	3.33	0.00	0.00
3	WT x restaurador IMI	A205	hetero	6.67	25.00	25.00	73.33	20.00	20.00	0.00	0.00
4	WT x restaurador IMI	A205	hetero	11.67	46.67	46.67	76.67	43.33	43.33	0.00	0.00
5	cms A837 x restaurador IMI	A205	hetero	3.33	40.00	40.00	78.33	36.67	36.67	0.00	0.00
6	cms IMI x restaurador MUT31	A205/MUT31	hetero	1.67	10.00	10.00	43.33	10.00	10.00	0.00	0.00
7	WT			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Entrada	Tipo de Material	Evento mut	Cigiosidad	21DAT	21DAT	21DAT	21DAT	21DAT	21DAT	21 DAT	21 DAT
				12.5 G	25 G	37.5 G	80 G	80 G	80 G	NO TRATADO	NO TRATADO
8	Restaurador MUT31	MUT31	homo	15.00	25.00	46.67	46.67	88.33	88.33	0.00	0.00
			LSD =	CV = 56.78							
			8.89								
			Desv. Est								
			= 5.55								

5 La fitotoxicidad en las entradas A205V heterocigóticas (entradas 3-5) fue significativamente más alta que el doble de la entrada A205V/MUT31 heterocigótica (entrada 6) a 21 días después del tratamiento con imazamox e imazapyr. Las entradas A205V homocigóticas (entradas 1-2) demostraron los niveles más bajos de fitotoxicidad o daño de cultivo (Tabla 1). A 100 g de ia/ha de imazamox, el intervalo de fitotoxicidad de las entradas A205V heterocigóticas estuvo entre 25% y 47% comparado con un intervalo de 10% para la entrada A205V/MUT31 heterocigótica. A 200 g de ia/ha de imazamox, el intervalo de fitotoxicidad de las entradas A205V heterocigóticas estuvo entre 73% y 78% de daño comparado con una clasificación de daño de 43% para la entrada A205V/MUT31 heterocigótica. Con 160 g de ia/ha de imazapyr, el intervalo de fitotoxicidad de las entradas A205V heterocigóticas estuvo entre 20% y 43% de daño comparado con una clasificación de daño de 10% para la entrada A205V/MUT31 heterocigótica.

10 Cuando el MUT31 individual (entrada 8) fue desafiado con 37.5 g de ia/ha de imazamox, demostró una clasificación de daño de 47% a 21 días después de tratamiento. A partir de estudios anteriores (datos no mostrados), MUT31 demostró 100% de daño de cultivo en ratas de 75 g de ia de imazamox por hectárea y 100 g ia de imazapyr por hectárea.

15 Las entradas dobles A205V/MUT31 heterocigóticas demostraron tolerancia a herbicida significativamente más alta que ambos tratamientos de imazamox e imazapyr versus las entradas A205V heterocigóticas y versus la entrada MUT31 en sí misma.

20 Basado en estos datos, cuando MUT31 se apila con la mutación A205V en el estado heterocigótico proporciona tolerancia herbicida más fuerte (mejorada) que la mutación A205V en el estado heterocigótico. Que tiene un producto que funciona en el estado heterocigótico a 2x la rata de producción comercial (100 g de ia de imazamox/ha y 160 g de ia de imazapyr/ha) es una gran ventaja para criadores de planta de híbrido de girasol sobre el producto homocigoto A205V/A205V actual, ahorrando tiempo y recursos en la cría de girasoles tolerantes a imidazolinona.

Todos los documentos y solicitudes de patente mencionados en la especificación indican el nivel de aquellos expertos en la técnica a las cuales ésta invención pertenece.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de girasol, o parte de la misma, que comprende las características de tolerancia a herbicida de imidazolinona de la línea MUT31, una muestra representativa de dicha línea MUT31 que ha sido depositada bajo el número ATCC Depósito de Patente No. PTA- 7839, en la que la tolerancia a herbicida de imidazolinona de MUT31 se puede reducir o inhabilitar por malatión; en la que dicha planta de girasol es seleccionada del grupo consiste en:
- 5 a) plantas de girasol que son progenie de MUT31;
b) plantas de girasol que son mutantes, recombinantes, o derivados de ingeniería genética de MUT31; y
c) plantas de girasol que son progenie de cualquiera de (a)-(b);
- 10 en la que dicha planta de girasol comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante herbicida; y
- en la que dichas características de tolerancia a herbicida de la línea MUT31 son capaces de mejorar la tolerancia al herbicida de imidazolinona de una planta de girasol tolerante herbicida que comprende una o más proteínas AHASL tolerantes a herbicidas.
- 15 2. La planta de girasol de la reivindicación 1, en la que dicho herbicida de imidazolinona es 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-quinolincarboxílico, 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, una mezcla de metil 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin- 2-il)-p-
- 20 toluato, o una mezcla de cualquiera de los anteriores.
3. La planta de girasol de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que dicho herbicida de imidazolinona es imazamox.
- 25 4. Una semilla o una semilla capaz de producir la planta de girasol de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha semilla comprende las características de tolerancia al herbicida de imidazolinona de la línea MUT31, una muestra representativa de la semilla de dicha línea MUT31 que ha sido depositada bajo el número ATCC Depósito de Patente PTA-7839, en la que la tolerancia al herbicida de imidazolinona de MUT31 se puede reducir o inhibir por malatión, y en la que dicha semilla comprende al menos un gen AHASL tolerante herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.
- 30 5. La semilla de la reivindicación 4, en la que dicha semilla es tratada con el herbicida de imidazolinona.
6. Una célula de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha célula comprende las características de tolerancia al herbicida de imidazolinona de la línea MUT31, una muestra representativa de dicha semilla de dicha línea MUT31 que ha sido depositada bajo el número ATCC Depósito de Patente PTA-7839, en la que la tolerancia al herbicida de imidazolinona de MUT31 se puede reducir o inhibir por malatión, en la que dicha célula comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicida que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.
- 35 7. La célula de la reivindicación 6, en la que dicha célula es una célula de polen o una célula semilla.
8. Un método de control de malezas en la vecindad de una planta de girasol, donde dicho método comprende:
- 45 aplicar una cantidad efectiva de un herbicida de imidazolinona a las malezas y a la planta de girasol de este modo controlar las malezas,
- en la que dicha planta de girasol es una planta de una cualquiera de reivindicaciones 1-3.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho herbicida de imidazolinona es 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-quinolincarboxílico, 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, una mezcla de metil 6-(4- isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2- il)-p-toluato, o una mezcla de cualquiera de las anteriores.
- 50 10. Un método para combatir vegetación indeseada que comprende el contacto a una semilla de la reivindicación 4 o reivindicación 5 antes de sembrar y/o después de la pregerminación con el herbicida de imidazolinona.
- 55 11. Un cultivo de tejido de células regenerables producido de la planta o parte de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células comprenden las características de tolerancia al herbicida de imidazolinona de la línea MUT31, una muestra representativa de la semilla de dicha línea MUT31 que ha sido depositada bajo el número ATCC Depósito de Patente PTA-7839, en la que la tolerancia al herbicida de imidazolinona de MUT31 se
- 60

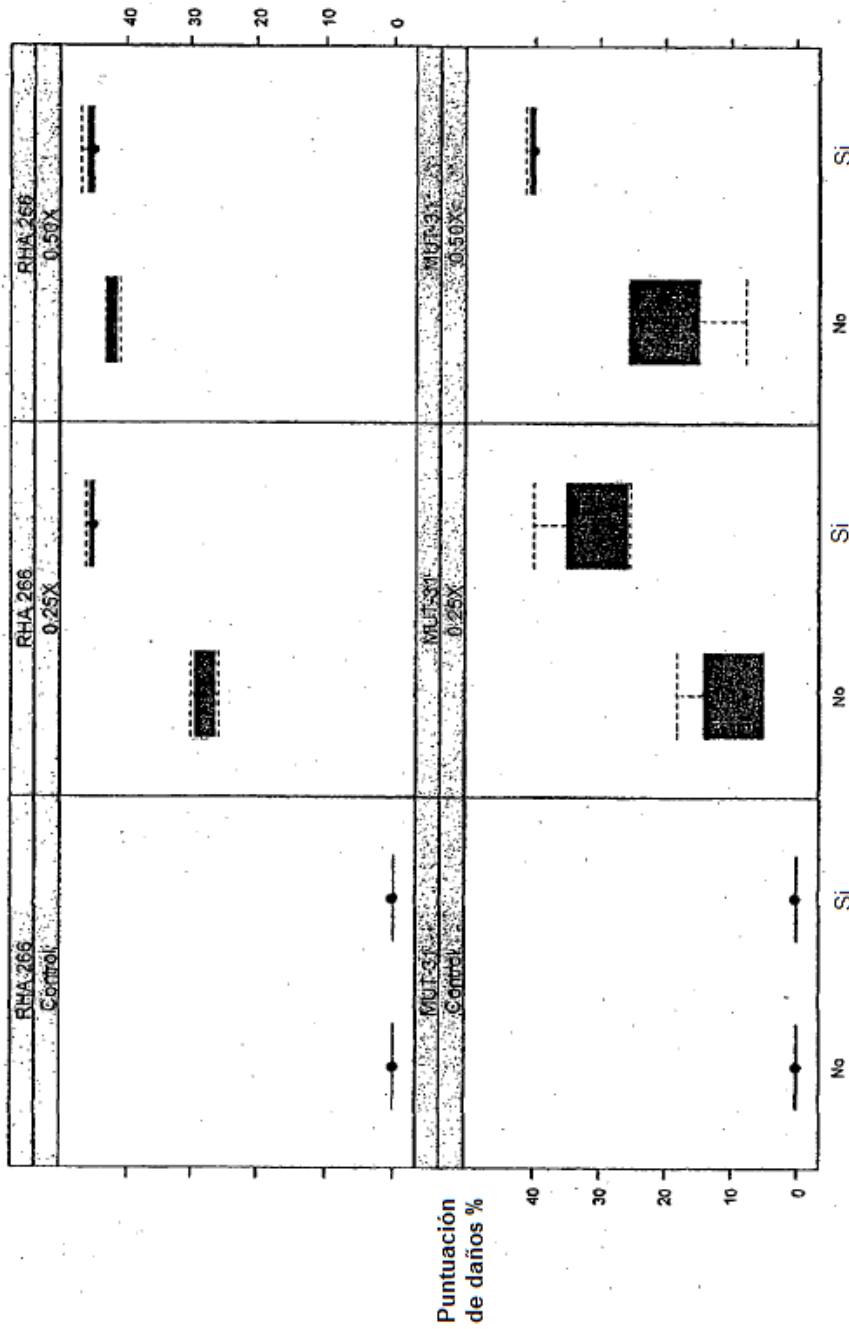
puede reducir o inhibir por malatión, y en la que las células comprenden al menos un gen AHASL tolerante al herbicida de imidazolinona que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.

5 12. El cultivo de tejido de la reivindicación 11, en el que células del cultivo de tejido son de un tejido seleccionado del grupo que consiste en hoja, polen, embriones, cotiledónea, hipocotilo, raíces, puntas de las raíces, anteras, tallo, y la flor.

10 13. La planta de girasol de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha planta de girasol comprende tolerancia a glifosato.

15 14. Uso de las características de tolerancia al herbicida de imidazolinona de la línea MUT31, una muestra representativa de semilla de dicha línea MUT31 que ha sido depositada bajo el número ATCC Depósito de Patente PTA-7839, para incrementar la tolerancia al herbicida de imidazolinona de una planta de girasol, o parte de la misma, que comprende al menos un gen AHASL tolerante al herbicida de imidazolinona que codifica una proteína AHASL tolerante a herbicida.

FIGURA 1



No=sin tratamiento previo con malación Si=tratamiento previo con malación
 Dosis de herbicida: 0 (control), 0.25X, y 0.50X; donde X = 50 g a/ha imazamox