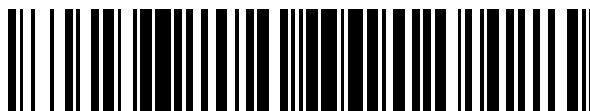


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 991**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2008 PCT/US2008/059125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2008 WO08124431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2008 E 08744931 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2134839**

54 Título: **Plantas de girasol resistentes a herbicidas con múltiples alelos resistentes a herbicidas de AHASL1 y métodos de uso**

30 Prioridad:

**04.04.2007 US 910041 P**  
**19.02.2008 US 29737**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.03.2018**

73 Titular/es:

**BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS, B.V. (50.0%)**  
**GRONINGENSINGEL 1**  
**6035 EA ARNHEM, NL y**  
**NIDERA SEMILLAS S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SALA, CARLOS;**  
**BULOS, MARIANO;**  
**ECHARTE, MARIEL;**  
**SINGH, BIJAY, K.;**  
**WESTON, BRIGITTE, J. y**  
**WHITT, SHERRY, R.**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 659 991 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 con múltiples alelos resistentes a herbicidas de *AHASL1* y métodos de uso

5

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la agricultura, particularmente a plantas de girasol resistentes a herbicidas que comprenden dos alelos resistentes a herbicidas diferentes del gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa 1 (*AHASL1*) de girasol, tal como se define adicionalmente a continuación en el presente documento. La invención se define en las reivindicaciones.

10

**Antecedentes de la invención**

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS; EC 4.1.3.18, también conocida como acetolactato sintasa o ALS) es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina y isoleucina (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", en *Plant Amino Acids*, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, Nueva York, págs. 227-247). AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicidas estructural y químicamente diversas incluyendo las sulfonilureas (Tan *et al.* (2005) *Pest Manag. Sci.* 61:246-57; Mallory-Smith y Retzinger (2003) *Weed Technology* 17:620-626; LaRossa y Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2:158-161), las imidazolinonas (Shaner *et al.* (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546), las triazolopirimidinas (Subramanian y Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines", en *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J.R. y Sonnet, P.E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., págs. 277-288) y los pirimidiniloxibenzoatos (Subramanian *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 94: 239-244). Los herbicidas de imidazolinona y de sulfonilurea se usan ampliamente en la agricultura moderna debido a su eficacia a tasas de aplicación muy bajas y su relativa ausencia de toxicidad en animales. Al inhibir la actividad AHAS, estas familias de herbicidas previenen el crecimiento y desarrollo adicionales de plantas sensibles, incluyendo muchas especies de malas hierbas. Varios ejemplos de herbicidas de imidazolinona comercialmente disponibles son PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) y ARSENAL® (imazapir). Ejemplos de herbicidas de sulfonilurea son clorsulfuron, metsulfuron-metilo, sulfometuron-metilo, clorimuron-etilo, tifensulfuron-metilo, tribenuron-metilo, bensulfuron-metilo, nicosulfuron, etametsulfuron-metilo, rimsulfuron, triflursulfuron-metilo, triasulfuron, primisulfuron-metilo, cinosulfuron, amidosulfuron, flazasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron-etilo y halosulfuron.

15

20

25

30

35

40

Debido a su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se ven favorecidos para su aplicación mediante pulverización por encima de una zona amplia de vegetación. La capacidad de pulverizar un herbicida por encima de un amplio alcance de vegetación reduce los costes asociados con el establecimiento y mantenimiento de plantas, y reduce la necesidad de preparación del sitio antes del uso de tales productos químicos. La pulverización por encima de una especie tolerante deseada también da como resultado la capacidad de lograr un máximo potencial de rendimiento de la especie deseada debido a la ausencia de especies competitivas. Sin embargo, la capacidad de usar tales técnicas de pulverización por encima depende de la presencia de especies resistentes a imidazolinona de la vegetación deseada en la zona pulverizada.

45

50

Entre los principales cultivos agrícolas, algunas especies leguminosas tales como semilla de soja son naturalmente resistentes a herbicidas de imidazolinona debido a su capacidad para metabolizar rápidamente los compuestos herbicidas (Shaner y Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471). Otros cultivos tales como el maíz (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) y el arroz (Barrett *et al.* (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, Nueva York, págs. 195-220) son algo sensibles a herbicidas de imidazolinona. La sensibilidad diferencial a los herbicidas de imidazolinona depende de la naturaleza química del herbicida particular y del 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 las plantas, tales como absorción y translocación, también desempeñan un papel importante en la sensibilidad (Shaner y Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

55

60

65

Se han producido satisfactoriamente plantas resistentes a imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas y pirimidiniloxibenzoatos usando mutagénesis en semillas, microesporas, polen y callos en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (es decir, canola) *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y *Oryza sativa* (Sebastian *et al.* (1989) *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson *et al.*, 1989 *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand *et al.* (1993) *J. Heredity* 84:91-96; Wright y Penner (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620; patente estadounidense n.º 5.545.822). En todos los casos, un único gen nuclear, parcialmente dominante, confirió resistencia. También se aislaron anteriormente cuatro plantas de trigo resistentes a imidazolinona tras la mutagénesis en semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Estudios sobre la herencia confirmaron que un único gen, parcialmente dominante, confirió resistencia. Basándose en estudios alélicos, los autores concluyeron que las mutaciones en las cuatro líneas identificadas estaban ubicadas en el mismo locus. Uno de los genes de resistencia del cultivar Fidel se denominó FS-4 (Newhouse *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886).

También se han usado poblaciones de plantas que se producen de manera natural, que se descubrió que eran resistentes a herbicidas de imidazolinona y/o sulfonilurea, para desarrollar líneas de cultivo de girasol resistentes a herbicidas. Recientemente, se desarrollaron dos líneas de girasol que son resistentes a un herbicida de sulfonilurea usando germoplasma que se originó de una población natural de girasol común (*Helianthus annuus*) como fuente del rasgo de resistencia a herbicidas (Miller y Al-Khatib (2004) Crop Sci. 44:1037-1038). Anteriormente, White *et al.* ((2002) Weed Sci. 50:432-437) habían notificado que individuos de una población natural de girasol común de Dakota del Sur, EE. UU. presentaban resistencia cruzada a un herbicida de imidazolinona y uno de sulfonilurea. El análisis de una parte de la región codificante de los genes de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa (AHASL) de individuos de esta población reveló una mutación puntual que da como resultado una sustitución de aminoácido de Ala por Val en la proteína AHASL de girasol que corresponde a Ala<sub>205</sub> en la proteína AHASL de *Arabidopsis thaliana* de tipo natural (White *et al.* (2003) Weed Sci. 51:845-853). Anteriormente, Al-Khatib y Miller ((2000) Crop Sci. 40:869) notificaron la producción de cuatro líneas de cultivo de girasol resistentes a imidazolinona.

La modelización por ordenador de la conformación tridimensional del complejo AHAS-inhibidor predice varios aminoácidos en la cavidad de unión del inhibidor propuesta como sitios en los que mutaciones inducidas conferirán probablemente resistencia selectiva a imidazolinonas (Ott *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263:359-368). De hecho, plantas de tabaco producidas con algunas de estas mutaciones diseñadas de manera racional en los sitios de unión propuestos de la enzima AHAS han mostrado resistencia específica a una única clase de herbicidas (Ott *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263:359-368).

También se ha notificado resistencia de plantas a herbicidas de imidazolinona en varias patentes. Las patentes estadounidenses n.ºs 4 761 373, 5 331 107, 5 304 732, 6 211 438, 6 211 439 y 6 222 100 describen de manera general el uso de un gen de AHAS alterado para provocar resistencia a herbicidas en plantas, y divulgan específicamente determinadas líneas de maíz resistentes a imidazolinona. La patente estadounidense n.º 5 013 659 divulga plantas que muestran resistencia a herbicidas debido a mutaciones en al menos un aminoácido en una o más regiones conservadas. Las mutaciones descritas en ese documento codifican o bien resistencia cruzada para imidazolinonas y sulfonilureas o bien resistencia específica a sulfonilurea, pero no se describe la resistencia específica a imidazolinona. La patente estadounidense n.º 5 731 180 y la patente estadounidense n.º 5 767 361 comentan un gen aislado que tiene una única sustitución de aminoácido en una secuencia de aminoácidos de AHAS de monocotiledónea de tipo natural que da como resultado resistencia específica a imidazolinona. Además, se han desarrollado plantas de arroz que son resistentes a herbicidas que interfieren con AHAS mediante selección por mutación y también mediante la selección de plantas resistentes a herbicidas de una combinación de plantas de arroz producidas mediante cultivo de anteras. Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5 545 822, 5 736 629, 5 773 703, 5 773 704, 5 952 553 y 6 274 796.

En plantas, como en todos los demás organismos examinados, la enzima AHAS está compuesta por dos subunidades: una subunidad grande (papel catalítico) y una subunidad pequeña (papel regulador) (Duggleby y Pang (2000) J. Biochem. Mol. Biol. 33:1-36). La subunidad grande de AHAS (también denominada en el presente documento AHASL) puede codificarse por un único gen como en el caso de *Arabidopsis* y la remolacha azucarera o por múltiples miembros de familia génica como en el maíz, canola y algodón. Sustituciones de un solo nucleótido específicas en la subunidad grande confieren a la enzima un grado de insensibilidad frente a una o más clases de herbicidas (Chang y Duggleby (1998) Biochem J. 333:765-777).

Por ejemplo, el trigo blando, *Triticum aestivum* L., contiene tres genes de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa homólogos. Cada uno de los genes muestra una expresión significativa basándose en datos bioquímicos y de respuesta a herbicidas de mutantes en cada uno de los tres genes (Ascenzi *et al.* (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, España, n.º de ref. S10-17). Las secuencias codificantes de los tres genes comparten una extensa homología a nivel de nucleótido (documento WO 03/014357). Mediante secuenciación de los genes AHASL a partir de diversas variedades de *Triticum aestivum*, se encontró que la base molecular de la tolerancia a herbicidas en la mayoría de las líneas tolerantes a IMI (tolerantes a imidazolinona) era la mutación S653(At)N, que indica una sustitución de serina por asparagina en una posición equivalente a la serina en el aminoácido 653 en *Arabidopsis thaliana* (documento WO 03/01436; documento WO 03/014357). Esta mutación se debe a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la secuencia de ADN que codifica la proteína AHASL.

También se sabe que se producen múltiples genes AHASL en especies de plantas dicotiledóneas. Recientemente, Kolkman *et al.* ((2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159) notificaron la identificación, clonación y secuenciación para tres genes AHASL (AHASL1, AHASL2 y AHASL3) a partir de genotipos resistentes a herbicidas y de tipo natural de girasol (*Helianthus annuus* L.). Kolkman *et al.* notificaron que la resistencia a herbicidas se debía o bien a la sustitución Pro197Leu (usando la nomenclatura de posiciones de aminoácido de AHASL de *Arabidopsis*) o bien a la sustitución Ala205Val en la proteína AHASL1 y que cada una de estas sustituciones proporcionaba resistencia a herbicidas tanto de imidazolinona como de sulfonilurea.

Dada su alta eficacia y baja toxicidad, los herbicidas de imidazolinona se ven favorecidos para su uso en agricultura. Sin embargo, la capacidad de usar herbicidas de imidazolinona en un sistema de producción de cultivo particular depende de la disponibilidad de variedades resistentes a imidazolinona de la planta de cultivo de interés. Para

producir tales variedades resistentes a imidazolinona, los obtentores de plantas necesitan desarrollar líneas de cultivo con el rasgo de resistencia a imidazolinona. Por tanto, se necesitan variedades de plantas de cultivo y líneas de cultivo resistentes a imidazolinona adicionales, así como métodos y composiciones para la producción y el uso de variedades y líneas de cultivo resistentes a imidazolinona.

5

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona una planta de girasol resistente a herbicidas que comprende dos alelos resistentes a herbicidas diferentes de un gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa 1 (*AHASL1*) de girasol en la que un primer alelo codifica una primera proteína *AHASL1* resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 7 de SEQ ID NO: 20 y un segundo alelo codifica una segunda proteína *AHASL1* resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por valina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 90 de SEQ ID NO: 20 o una sustitución de prolina por leucina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 82 de SEQ ID NO: 20; en la que dicha planta de girasol resistente a herbicidas es resistente a al menos un herbicida inhibidor de AHAS.

15

En las reivindicaciones se definen aspectos adicionales de la invención.

La presente divulgación se refiere a nuevas plantas de girasol resistentes a herbicidas que comprenden dos alelos resistentes a herbicidas diferentes del gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa 1 (*AHASL1*) de girasol. En particular, las plantas de girasol tienen resistencia aumentada a herbicidas inhibidores de acetohidroxiácido sintasa (AHAS), en comparación con una planta de girasol de tipo natural. Las plantas de girasol resistentes a herbicidas comprenden un primer alelo de *AHASL1* y un segundo alelo de *AHASL1*, en las que los alelos de *AHASL1* primer y segundo codifican una primera y una segunda proteína *AHASL1* de girasol resistente a herbicidas, respectivamente. Haciendo referencia a las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína *AHASL1* de *Arabidopsis thaliana*, el primer alelo de *AHASL1* codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A122T. El segundo alelo de *AHASL1* codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A205V o la sustitución de aminoácido P197L. También se proporcionan partes, tejidos, células y semillas de planta de girasol que comprenden los alelos de *AHASL1* primero y segundo.

20

La presente divulgación se refiere además a un método para producir una planta de girasol híbrida que comprende resistencia a al menos un herbicida inhibidor de AHAS. El método implica la polinización cruzada de una primera planta de girasol con una segunda planta de girasol para producir semillas de girasol híbridas que pueden sembrarse y dejarse crecer para dar una planta de girasol híbrida, particularmente una planta de girasol híbrida F1. La primera planta de girasol comprende en su genoma al menos una copia de un primer alelo de un gen *AHASL1*, y la segunda planta de girasol comprende en su genoma al menos una copia de un segundo alelo de un gen *AHASL1*. Preferiblemente, la primera planta de girasol es homocigota para el primer alelo, y la segunda planta de girasol es homocigota para el segundo alelo. El primer alelo codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A122T. El segundo alelo codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A205V o la sustitución de aminoácido P197L.

35

40

La presente divulgación se refiere adicionalmente a métodos para controlar malas hierbas o vegetación no deseada en las proximidades de una planta de girasol de la invención. Un método comprende aplicar una cantidad eficaz de herbicida inhibidor de AHAS, particularmente un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea, a las malas hierbas y a la planta de girasol. Otro método comprende poner en contacto una semilla de girasol de la presente invención antes de la siembra y/o después de la pregerminación con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS, particularmente un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea. La presente divulgación se refiere además a las semillas de girasol de la presente invención tratadas con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS. Las plantas y semillas de girasol para su uso en estos métodos comprenden en sus genomas un primer alelo de *AHASL1* y un segundo alelo de *AHASL1*. El primer alelo de *AHASL1* codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A122T. El segundo alelo de *AHASL1* codifica una proteína *AHASL1* de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A205V o la sustitución de aminoácido P197L.

45

50

La presente divulgación se refiere además a métodos para controlar las malas hierbas parasitarias *Orobanche cumana* y *Orobanche cernua*, también conocidas como orobanica, en plantas de girasol infectadas. El método comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y a la planta de girasol resistente a herbicidas de la presente divulgación, particularmente una planta de girasol que comprende dos alelos A122T o una planta de girasol que comprende un alelo A122T de *AHASL1* y un alelo A205V de *AHASL1*.

55

La presente divulgación se refiere a métodos de diagnóstico para identificar los alelos del gen *AHASL1* en girasol individual. Tales métodos de diagnóstico implican la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de regiones específicas del gen *AHASL1* de girasol usando cebadores diseñados para hibridarse con sitios específicos dentro del gen *AHASL1* de girasol tales como, por ejemplo, sitios en o en las proximidades de mutaciones en el gen *AHASL1*. Adicionalmente se divulgan los cebadores usados en estos métodos y kits para realizar los métodos.

65

**Breve descripción los dibujos**

La figura 1 es una representación gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre la altura de planta 14 días tras el tratamiento para materiales homocigóticos para los acontecimientos de mutación A122T y A205V y genotipos heterocigóticos A205 + A122T. La altura media (% de parcelas sin tratar) se representa mediante símbolos y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 2 es una representación gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre el índice de fitotoxicidad (PI) 14 días tras el tratamiento para materiales homocigóticos para los acontecimientos de mutación A122T y A205V y genotipos heterocigóticos A205 + A122T. El PI medio se representa mediante símbolos y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 3 es una representación gráfica del efecto de la aplicación foliar de imazapir sobre la acumulación de biomasa 14 días tras el tratamiento para materiales homocigóticos para los acontecimientos de mutación A122T y A205V y genotipos heterocigóticos A205 + A122T. La biomasa seca media (% de parcelas sin tratar) se representa mediante símbolos y las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

La figura 4 es una ilustración fotográfica de los productos de una amplificación por PCR reacción usando los cebadores p-AHAS18/pAHAS-19 tras electroforesis en gel de agarosa. Carril 1 GM40 (mutación A122T), carril 2: L1 (mutación A205V), carril 3 y 4: H3; carril 5 y 6: H4; carril 7 y 8: H1; carril 9 y 10: L2.

La figura 5 es una ilustración fotográfica de los productos de una digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación por PCR con BmgB I tras electroforesis en gel de agarosa. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1: BTK47 (tipo natural); carril 2: GM40 (A122T); carril 3: planta F1 procedente del cruce cmsBTK47 x GM40; y carril 4: cmsGM40 (A122T).

La figura 6 es una ilustración fotográfica de productos de amplificación por PCR obtenidos usando la combinación p-AHAS NIDF / AHAS 122 TMU. Carril 1, marcador de peso molecular (marcador de 25 pb), carril 2, marcador de peso molecular (marcador de 100 pb), carril 3, individuo homocigótico 122, carril 4, individuo homocigótico 205, carril 5, individuo homocigótico 197, carril 6, WT (haplotipo 1), carril 7, individuo 122/WT, carril 8, individuo 122/205, carril 9, individuo 122/197, carril 10, agua (control negativo), carril 11, marcador de peso molecular (marcador de 25 pb), carril 12, marcador de peso molecular (marcador de 100 pb).

La figura 7 es una ilustración fotográfica de productos de amplificación por PCR obtenidos usando la combinación p-AHAS NIDF / AHAS 122 TWT. Carril 1, marcador de peso molecular (marcador de 25 pb), carril 2, marcador de peso molecular (marcador de 100 pb), carril 3, individuo homocigótico 122, carril 4, individuo homocigótico 205, carril 5, individuo homocigótico 197, carril 6, WT (haplotipo 1), carril 7, individuo 122/WT, carril 8, individuo 122/205, carril 9, individuo 122/197, carril 10, agua (control negativo), carril 11, marcador de peso molecular (marcador de 25 pb), carril 12, marcador de peso molecular (marcador de 100 pb).

La figura 8 es una alineación de secuencias que muestra diferencias en las secuencias de nucleótidos de los haplotipos de *AHASL1* de girasol cuando se amplifica ADN genómico de girasol de cada haplotipo (Hap) usando los pares de cebadores p-AHAS NIDF/AHAS122TWT o el par de cebadores p-AHAS NIDF/AHAS 122 TMU. Las posiciones de los cebadores se muestran con flechas. La ubicación de la secuencia de nucleótidos que codifica la repetición (ACC)<sub>n</sub> (codifica la región poli-Thr en el supuesto péptido de tránsito) e INDEL en la secuencia de nucleótidos de *AHASL1* están en negrita y resaltados, respectivamente. Se cree que la repetición (ACC)<sub>n</sub> y los INDEL corresponden a la parte de la secuencia de nucleótidos de *AHASL1* que codifica el péptido de tránsito de *AHASL1*. La ubicación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) A122T se indica mediante la cabeza de flecha (▼). Los números al final de las secuencias indican el tamaño de fragmento previsto de cada haplotipo cuando se amplifica con el par de cebadores o bien p-AHAS NIDF/AHAS122TWT (Hap1-5) o bien p-AHAS NIDF/AHAS 122 TMU (Hap6).

La figura 9 es una ilustración fotográfica de productos de amplificación por PCR obtenidos usando extractos de ADN de tejido de girasol de plantas que son heterocigóticas para el alelo A122T de *AHASL1* (HET), homocigóticas (mutantes) para el alelo A122T de *AHASL1* o de tipo natural en el locus de *AHASL1* (WT). La amplificación por PCR se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 7 y los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 2% (p/v).

La figura 10 es una representación gráfica del daño de cosecha (fitotoxicidad en % media) a 200 g de pa/ha de imazamox determinado a los 9-12 días tras el tratamiento (panel izquierdo) y 25-30 días tras el tratamiento (panel derecho) en cuatro ubicaciones en campo en 2007 para cuatro tipos diferente de híbridos. Los cuatro sitios son: Velva, ND, EE. UU.; Angers, FR; Saintes FR; y Formosa, AR. Los cuatro tipos diferente de híbridos representados en la figura 10 son homocigótico para A122T (CLHA-Plus homo), A122T/A205 (CLHA-Plus / IMISUN hetero), heterocigótico para A122T (CLHA-Plus hetero) y homocigótico para A205V (IMISUN homo). El panel izquierdo

La figura 11 es una representación gráfica del daño de cosecha de diferentes tipos de híbridos de girasol que portan

la mutación CLHA-Plus tras la aplicación de imazamox. Los cuatro tipos diferentes de híbridos representados en la figura 11 son homocigóticos para A122T (CLHA-Plus homo), A122T/A205 (CLHA-Plus / IMISUN hetero), heterocigótico para A122T (CLHA-Plus / WT hetero) y homocigótico para A205V (IMISUN homo).

5 La figura 12 es una representación gráfica del daño de cosecha de diferentes tipos de híbridos de girasol que portan la mutación CLHA-Plus tras la aplicación de imazapir (homocigótico CLHA-Plus:  $b = 0,20 \pm 0,06$ ,  $p < 0,048$ ; heterocigótico CLHA-Plus/IMISUN:  $b: 0,26 \pm 0,07$ ,  $p < 0,0019$ ; CLHA-Plus/WT:  $b: 0,55 \pm 0,18$ ,  $p < 0,0109$ ). Los cuatro tipos diferentes de híbridos representados en la figura 11 son homocigóticos para A122T (CLHA-Plus homo), A122T/A205 (CLHA-Plus / IMISUN hetero), heterocigóticos para A122T (CLHA-Plus / WT hetero) y homocigóticos para A205V (IMISUN homo).

15 La figura 13 es una representación gráfica de la actividad enzimática AHAS (expresada como porcentaje de controles sin tratar) de cuatro líneas de girasol en presencia de imazamox 100  $\mu$ M (panel izquierdo) o imazapir 100  $\mu$ M (panel derecho).

La figura 14 es una representación gráfica de actividad enzimática AHAS (expresada como porcentaje de controles sin tratar) de cinco líneas de girasol en presencia de niveles crecientes de imazamox.

### Lista de secuencias

20 Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos indicadas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases de nucleótidos y código de tres letras para aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico siguen el convenio convencional de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y avanzar (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo 3'. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida mediante cualquier referencia a la cadena presentada. Las secuencias de aminoácidos siguen el convenio convencional de comenzar en el extremo amino-terminal de la secuencia y avanzar (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo carboxilo-terminal.

30 SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de nucleótidos de p-AHAS18.

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de nucleótidos de p-AHAS19.

35 SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de nucleótidos de p-AHAS NIDF.

SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de nucleótidos de AHAS 122 TWT.

SEQ ID NO: 5 expone la secuencia de nucleótidos de AHAS 122 TMU.

40 SEQ ID NO: 6 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 1 (Hap1) que se muestra en la figura 8.

SEQ ID NO: 7 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 2 (Hap2) que se muestra en la figura 8.

45 SEQ ID NO: 8 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 3 (Hap3) que se muestra en la figura 8.

50 SEQ ID NO: 9 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 4 (Hap4) que se muestra en la figura 8.

SEQ ID NO: 10 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 5 (Hap5) que se muestra en la figura 8.

55 SEQ ID NO: 11 expone la secuencia de nucleótidos de la parte de AHASL1 del haplotipo de girasol 6 (Hap6) que se muestra en la figura 8.

60 SEQ ID NO: 12 expone la secuencia de nucleótidos correspondiente a la posición del cebador p-AHAS NIDF dentro de las secuencias de nucleótidos de AHASL1 mostradas en la figura 8 (véase la flecha superior en la figura 8). El cebador p-AHAS NIDF se hibrida con la secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 12.

65 SEQ ID NO: 13 expone la secuencia de nucleótidos del sitio de hibridación del cebador AHAS 122 TWT dentro de las secuencias de nucleótidos de AHASL1 de Hap1-Hap5 (SEQ ID NOS: 6-10, respectivamente) mostradas en la figura 8 (véase la flecha inferior en la figura 8).

SEQ ID NO: 14 expone la secuencia de nucleótidos del sitio de hibridación del cebador AHAS 122 TMU dentro de la secuencia de nucleótidos de *AHASL1* de Hap6 (SEQ ID NO: 11) mostrada en la figura 8 (véase la flecha inferior en la figura 8).

5 SEQ ID NO: 15 expone la secuencia de nucleótidos de HA122CF.

SEQ ID NO: 16 expone la secuencia de nucleótidos de HA122wt.

SEQ ID NO: 17 expone la secuencia de nucleótidos de HA122mut.

10

SEQ ID NO: 18 expone la secuencia de nucleótidos de HA122CR.

SEQ ID NO: 19 expone una secuencia de nucleótidos de longitud parcial que codifica una proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende la sustitución de aminoácido A122T de las líneas de girasol S4897 y GM40 tal como se describe en el documento WO 2007005581.

15

SEQ ID NO: 19 corresponde a SEQ ID NO: 1 del documento WO 2007005581.

SEQ ID NO: 20 expone una secuencia de aminoácidos de longitud parcial de la proteína AHASL1 resistente a herbicidas codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 19.

20

SEQ ID NO: 20 corresponde a SEQ ID NO: 2 del documento WO 2007005581.

SEQ ID NO: 21 expone la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL1 resistente a herbicidas madura que comprende la sustitución de aminoácido P197L de la línea de girasol MUT28 tal como se describe en el documento WO 2006024351.

25

SEQ ID NO: 21 corresponde a SEQ ID NO: 5 del documento WO 2006024351.

SEQ ID NO: 22 expone la secuencia de aminoácidos de la proteína AHASL1 resistente a herbicidas madura codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 21.

30

SEQ ID NO: 21 corresponde a SEQ ID NO: 6 del documento WO 2006024351.

SEQ ID NO: 23 expone la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL1 resistente a herbicidas madura que comprende la sustitución de aminoácido A205V del haplotipo de *Helianthus annuus* 5 tal como se describe en el n.º de registro de GenBank AY541455 y Kolkman *et al.* (2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159.

35

SEQ ID NO: 23 corresponde a los nucleótidos 244-1959 de la secuencia de nucleótidos del n.º de registro de GenBank AY541455.

40

SEQ ID NO: 24 expone la secuencia de aminoácidos de la proteína AHASL1 resistente a herbicidas madura codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 24 corresponde a los aminoácidos 82-652 de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del n.º de registro de GenBank AY541455.

45

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a plantas de girasol resistentes a herbicidas que comprenden en sus genomas dos alelos diferentes del gen *AHASL1* de girasol. Cada uno de los dos alelos diferentes codifica una proteína AHASL1 de girasol que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de una AHASL1 de girasol de tipo natural en uno o más aminoácidos. Se sabe que cada uno de los alelos de *AHASL1* confiere a una planta de girasol resistencia o tolerancia aumentada a herbicidas inhibidores de AHAS, particularmente herbicidas de imidazolinona y de sulfonilurea. La presente divulgación se refiere además a métodos de producción de estas plantas de girasol y a métodos para controlar malas hierbas o vegetación no deseada que crece en las proximidades de las plantas de girasol.

50

55

La presente invención, que se define en las reivindicaciones, se basa en el descubrimiento de que plantas de girasol híbridas F1 que comprenden una única copia de cada uno de dos alelos resistentes a herbicidas diferentes del *AHASL1* de girasol comprenden niveles comercialmente aceptables de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS. Por tanto, la presente invención encuentra uso en la producción de plantas de girasol híbridas permitiendo a un obtentor de plantas mantener, por ejemplo, una primera línea de girasol que es homocigótica para un primer alelo de *AHASL1* resistente a herbicidas y una segunda línea de girasol que es homocigótica para un segundo alelo de *AHASL1* resistente a herbicidas.

60

65

Determinados métodos implican el uso de plantas tolerantes a herbicidas o resistentes a herbicidas. Por planta

“tolerante a herbicidas” o “resistente a herbicidas”, quiere decirse 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 normal o de tipo natural. Algunas plantas tolerantes a herbicidas de la presente divulgación comprenden una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas. Por “proteína AHASL tolerante a herbicidas” o “proteína AHASL resistente a herbicida”, quiere decirse que una proteína AHASL de este tipo presenta una actividad AHAS superior, con respecto a la actividad AHAS de una proteína AHASL de tipo natural, cuando está en presencia de al menos un herbicida que se sabe que interfiere con la actividad AHAS y a una concentración o a un nivel del herbicida que se sabe que inhibe la actividad AHAS de la proteína AHASL de tipo natural. Además, la actividad AHAS de una proteína AHASL tolerante a herbicidas o resistente a herbicidas de este tipo puede denominarse en el presente documento actividad AHAS “tolerante a herbicidas” o “resistente a herbicidas”.

En la presente divulgación, los términos “tolerante a herbicidas” y “resistente a herbicidas” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. De manera similar, los términos “tolerancia a herbicidas” y “resistencia a herbicidas” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. Asimismo, los términos “resistente a imidazolinona” y “resistencia a imidazolinona” se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente a los términos “tolerante a imidazolinona” y “tolerancia a imidazolinona”, respectivamente.

La presente divulgación proporciona plantas, tejidos de planta, células de planta y células huésped con resistencia o tolerancia aumentadas a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea. La cantidad o concentración preferida del herbicida es una “cantidad eficaz” o “concentración eficaz”. Por “cantidad eficaz” y “concentración eficaz” quiere decirse una cantidad y concentración, respectivamente, que es suficiente para matar o inhibir el crecimiento de una planta, tejido de planta, célula de planta o célula huésped de tipo natural, similar, pero que dicha cantidad no mata ni inhibe de manera tan intensa el crecimiento de las plantas, tejidos de planta, células de planta y células huésped resistentes a herbicidas de la presente invención. Normalmente, la cantidad eficaz o concentración eficaz de un herbicida es una cantidad o concentración que se usa de manera rutinaria en sistemas de producción agrícolas para matar malas hierbas de interés. Una cantidad de este tipo la conocen, o la pueden determinar fácilmente, los expertos habituales en la técnica.

En determinados casos, la presente divulgación proporciona plantas de girasol que comprenden niveles comercialmente aceptables de resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS. A menos que se indique lo contrario en el presente documento o resulte obvio de otro modo a partir del contexto, las plantas de girasol que comprenden un nivel de este tipo de resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS son resistentes o tolerantes a una aplicación de una cantidad eficaz o concentración eficaz de al menos un herbicida inhibidor de AHAS. Tal como se indicó anteriormente, la cantidad eficaz o concentración de un herbicida es una cantidad o concentración que se usa de manera rutinaria en sistemas de producción agrícolas para matar una mala hierba o malas hierbas de interés y una cantidad de este tipo la conocen, o la pueden determinar fácilmente, los expertos habituales en la técnica.

Por “planta, tejido de planta, célula de planta o célula huésped de tipo natural, similar” quiere decirse una planta, tejido de planta, célula de planta o célula huésped, respectivamente, que carece de las características de resistencia a herbicidas y/o del polinucleótido particular de la invención que se divulgan en el presente documento. Por tanto, no se pretende que el uso del término “de tipo natural” implique que una planta, tejido de planta, célula de planta u otra célula huésped carece de ADN recombinante en su genoma y/o carece de características resistentes a herbicidas que son diferentes de las divulgadas en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique claramente lo contrario, se pretende que el término “planta” signifique una planta en cualquier fase de desarrollo, así como cualquier parte o partes de una planta que pueden estar unidas a, o separadas de, una planta intacta completa. Tales partes de una planta incluyen, pero no se limitan a, órganos, tejidos y células de una planta. Los ejemplos de partes de planta particulares incluyen un tallo, una hoja, una raíz, una inflorescencia, una flor, un cogollo, un fruto, un pedicelo, un pedúnculo, un estambre, una antera, un estigma, un estilo, un ovario, un pétalo, un sépalo, un carpelo, una punta de raíz, una cofia de raíz, una pelo radicular, un pelo de hoja, un pelo de semilla, un grano de polen, una microespora, un cotiledón, un hipocótilo, un epicótilo, xilema, floema, parénquima, endosperma, una célula anexa, una célula oclusiva y cualquier otro órgano, tejido y célula conocido de una planta. Además, se reconoce que una semilla es una planta.

En un aspecto, la divulgación proporciona plantas de girasol que comprenden en su genoma al menos una copia de un alelo mutante A122T de *AHASL1* y al menos una copia de un alelo mutante A205T de *AHASL1*. Una planta de girasol de este tipo comprende un nivel comercialmente aceptable de tolerancia a al menos un herbicida inhibidor de AHAS, particularmente un herbicida de imidazolinona. Tales plantas encuentran uso en agricultura, particularmente en métodos para controlar malas hierbas que implican el uso de herbicidas de imidazolinona tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, una planta de girasol comprende en su genoma al menos una copia de un alelo mutante A122T de *AHASL1* y al menos una copia de un alelo mutante P197L de *AHASL1*. Una planta de girasol de este tipo comprende un nivel comercialmente aceptable de tolerancia a al menos un herbicida inhibidor de AHAS,



particularmente un herbicida de sulfonilurea y/o de imidazolinona. Tales plantas encuentran uso en agricultura, particularmente en métodos para controlar malas hierbas que implican el uso de herbicidas de imidazolinona y/o de sulfonilurea tal como se describe en el presente documento.

5 La presente divulgación implica el uso de una planta de girasol que comprende un gen *AHASL1* que comprende la mutación A122T. Un gen *AHASL1* de este tipo codifica una proteína AHASL1 que comprende la sustitución de aminoácido A122T. La presente divulgación no depende del uso de una variedad, línea o planta de girasol particular que comprenda un gen *AHASL1* con la mutación A122T. Cualquier planta de girasol que comprenda al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación A122T puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. En un caso, el gen *AHASL1* con la mutación A122T comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 19 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.

15 Un ejemplo de una línea de girasol que comprende al menos una copia del alelo mutante A122T de *AHASL1* es GM40 (véanse el documento WO 2007005581 y la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 60/695.952; presentada el 1 de julio de 2005; ambos de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia). Se realizó un depósito de semillas del girasol GM40 en el depósito de patentes de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA 20110 EE. UU. el 17 de mayo de 2005, y se le asignó el número de depósito de patentes de ATCC PTA-6716. El depósito de la línea de girasol GM40 se realizó para un plazo de al menos 30 años y al menos 5 años tras recibirse en la ATCC la petición más reciente de proporcionar una muestra del depósito. Adicionalmente, los solicitantes han cumplido todos los requisitos del 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, incluyendo proporcionar una indicación de la viabilidad de la muestra.

25 Otro ejemplo de una línea de girasol que comprende al menos una copia del alelo mutante A122T de *AHASL1* es GM1606 (véase el documento WO 2007005581). Se realizó un depósito de semillas del girasol GM1606 en el depósito de patentes de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA 20110 EE. UU. el 19 de mayo de 2006, y se le asignó el número de depósito de patentes de ATCC PTA-7606. El depósito de girasol GM1606 se realizó para un plazo de al menos 30 años y al menos 5 años tras recibirse en la ATCC la petición más reciente de proporcionar una muestra del depósito. Adicionalmente, los solicitantes han cumplido todos los requisitos del 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, incluyendo proporcionar una indicación de la viabilidad de la muestra.

35 La presente divulgación implica el uso de una planta de girasol que comprende un gen *AHASL1* que comprende la mutación A205V. Un gen *AHASL1* de este tipo codifica una proteína AHASL1 que comprende la sustitución de aminoácido A205V. La presente divulgación no depende del uso de una variedad, línea o planta de girasol particular que comprenda un gen *AHASL1* con la mutación A205V. Cualquier planta de girasol que comprenda al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación A205V puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. En un caso, el gen *AHASL1* con la mutación A205V comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 23 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24.

40 Plantas de girasol que comprenden al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación A205V se usan ampliamente en la producción comercial de girasoles y están fácilmente disponibles. Cualquiera de tales variedades de plantas de girasol comercialmente disponibles puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. Tales variedades están disponibles de diversas fuentes de empresas de semillas comerciales (por ejemplo, Nidera S.A., Buenos Aires, Argentina; Dekalb Genetics Corporation, Dekalb, IL, EE. UU.; Mycogen Seeds, Indianápolis, IN, EE. UU.; Seeds 2000, Breckenridge, MN, EE. UU.; Triumph Seed Company, Ralls, TX, EE. UU.) e incluyen, pero no se limitan a, Paraiso 101CL, Paraiso 102CL, DKF38,-80CL, 8H429CL, 8H419CL, 8H386CL, 8H358CL, 629CL, 630,CL, 4682NS/CL, 4880NS/CL, Barracuda, Charger, Viper, 620CL, 650CL, y 660CL. Además, se mantienen semillas de plantas de girasol que comprenden al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación A205V en el National Center for Genetic Resources Preservation, Fort Collins, Colorado, y pueden obtenerse con los números de registro PI 633749 y PI 633750.

55 La presente divulgación implica el uso de una planta de girasol que comprende un gen *AHASL1* que comprende la mutación P197L. Un gen *AHASL1* de este tipo codifica una proteína AHASL1 que comprende la sustitución de aminoácido P197L. La presente divulgación no depende del uso de una variedad, línea o planta de girasol particular que comprenda un gen *AHASL1* con la mutación P197L. Cualquier planta de girasol que comprenda al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación P197L puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. Se han divulgado plantas de girasol que comprenden al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación P197L en el documento WO 2006024351 y la solicitud de patente en fase nacional estadounidense con n.º de serie 11/659.007, con fecha de presentación internacional del 29 de julio de 2005; ambos de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia. En un caso, el gen *AHASL1* con la mutación P197L comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

65 El servicio de investigación del departamento de agricultura de los Estados Unidos ha liberado al público tres líneas de girasol que comprenden al menos un alelo de un gen *AHASL1* con la mutación P197L. Las tres líneas son HA

469, RHA 470 y RHA 471. Pueden obtenerse semillas de cada una de las tres líneas de Seedstocks Project, Department of Plant Sciences, Loftsgard Hall, North Dakota State University, Fargo, ND 58105, EE. UU.

La presente divulgación implica plantas de girasol con mutaciones en el gen *AHASL1* de girasol. Estas mutaciones dan lugar a proteínas AHASL1 de girasol que comprenden sustituciones de aminoácido específicas en sus secuencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos de una proteína AHASL1 de girasol de tipo natural. Tales sustituciones de aminoácido incluyen, por ejemplo, A122T, A205V y P197L. Por "A122T" quiere decirse la sustitución por treonina de la alanina en la posición de la proteína AHASL1 de girasol que corresponde a la posición de aminoácido 122 en la proteína AHASL1 de *Arabidopsis thaliana*. Por "A205V" quiere decirse la sustitución por valina de la alanina en la posición de la proteína AHASL1 de girasol que corresponde a la posición de aminoácido 205 en la proteína AHASL1 de *Arabidopsis thaliana*. Por "P197L" quiere decirse la sustitución por leucina de la prolina en la posición de la proteína AHASL1 de girasol que corresponde a la posición de aminoácido 197 en la proteína AHASL1 de *Arabidopsis thaliana*.

A menos que se indique lo contrario o resulte obvio a partir del contexto, las posiciones de aminoácido en la proteína AHASL1 de girasol a las que se hace referencia en el presente documento son las posiciones correspondientes en la proteína AHASL1 bien estudiada de *Arabidopsis thaliana*. Las posiciones de aminoácido en la proteína AHASL1 de girasol que corresponden a posiciones de aminoácido de AHASL1 de *Arabidopsis thaliana* 122, 197 y 205 son 107, 182 y 190, respectivamente. Véase el documento WO 2007005581 (tabla 4 en el mismo) para información adicional sobre las posiciones de sustituciones de aminoácido conocidas que confieren resistencia a herbicidas a proteínas AHASL y sus posiciones correspondientes en las proteínas AHASL1 de girasol y de *Arabidopsis thaliana*.

La presente divulgación se refiere a proteínas AHASL con sustituciones de aminoácido en posiciones de aminoácido particulares dentro de regiones conservadas de las proteínas AHASL 1 de girasol divulgadas en el presente documento. Además, los expertos habituales reconocerán que tales posiciones de aminoácido pueden variar dependiendo de si se añaden o se eliminan aminoácidos, por ejemplo, del extremo N-terminal de una secuencia de aminoácidos. Por tanto, la divulgación abarca las sustituciones de aminoácido en la posición mencionada o posición equivalente. Por "posición equivalente" quiere decirse una posición que está dentro de la misma región conservada que la posición de aminoácido mostrada a modo de ejemplo. Tales regiones conservadas se conocen en la técnica (véase la tabla 4 en el documento WO 2007005581) o pueden determinarse mediante múltiples alineaciones de secuencias o mediante otros métodos conocidos en la técnica.

La presente divulgación se refiere además a un método para producir una planta de girasol híbrida que comprende resistencia a al menos un herbicida inhibidor de AHAS. El método implica la polinización cruzada de una primera planta de girasol con una segunda planta de girasol para producir semillas de girasol híbridas que pueden sembrarse y dejarse crecer para dar una planta de girasol híbrida, particularmente una planta de girasol híbrida F1. La primera planta de girasol comprende en su genoma al menos una copia de un primer alelo de un gen *AHASL1*, y la segunda planta de girasol comprende en su genoma al menos una copia de un segundo alelo de un gen *AHASL1*. Preferiblemente, la primera planta de girasol es homocigótica para el primer alelo, y la segunda planta de girasol es homocigótica para el segundo alelo. El primer alelo codifica una proteína AHASL1 de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A122T. El segundo alelo codifica una proteína AHASL1 de girasol que comprende la sustitución de aminoácido A205V o la sustitución de aminoácido P197L.

El método para producir una planta de girasol híbrida puede implicar además cosechar una semilla resultante de dicho cruce y seleccionar al menos una planta de girasol de progenie a partir de dicho cruce que comprende en su genoma dichos alelos primero y segundo. Una progenie de este tipo puede seleccionarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo amplificación por PCR de la totalidad o parte del gen *AHASL1* para determinar los alelos que están presentes en la planta. Puede obtenerse ADN para su uso en una amplificación por PCR de este tipo a partir de una parte de semilla de girasol resultante del cruce o una parte de una planta que se hace crecer a partir de una semilla de este tipo. En el ejemplo 2 a continuación, se proporciona un método preferido de la invención para seleccionar la planta de progenie deseada que implica la amplificación por PCR. Alternativamente, la planta de progenie puede seleccionarse evaluando el rendimiento de la planta de progenie en una prueba de resistencia a herbicidas en condiciones de invernadero o en campo tal como se describe a continuación en el presente documento.

Puede producirse una planta de girasol híbrida cruzando una primera planta de girasol que es homocigótica para el alelo A205V de *AHASL1* con una segunda planta de girasol que es homocigótica para el alelo A122T de *AHASL1*. Se espera que todas las semillas híbridas resultantes y plantas híbridas que crecen a partir de tal semilla comprendan en sus genomas un alelo A205V de *AHASL1* y un alelo A122T de *AHASL1*. O bien el primer o bien el segundo girasol pueden ser el donante de polen para el cruce.

En otro caso, una planta de girasol híbrida de la invención se produce cruzando una primera planta de girasol que es homocigótica para el alelo P197L de *AHASL1* con una segunda planta de girasol que es homocigótica para el alelo A122T de *AHASL1*. Se espera que todas las semillas híbridas y plantas híbridas que crecen a partir de tal semilla comprendan en sus genomas un alelo P197L de *AHASL1* y un alelo A122T de *AHASL1*. También en este caso, o bien el primer o bien el segundo girasol pueden ser el donante para el cruce.

Para los fines de la presente divulgación, a menos que se indique expresamente lo contrario o resulte evidente a partir del contexto, una "planta de progenie" es cualquier planta que es descendiente de al menos una planta e incluye, pero no se limita a, descendientes de primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena y décima generación de la planta.

Preferiblemente, tal progenie o descendientes comprenden resistencia aumentada a al menos un herbicida de imidazolinona en comparación con una planta de tipo natural y tal progenie o descendientes comprenden además al menos un alelo mutante de *AHASL1* seleccionado del grupo que consiste en los alelos A122T, A205V y P197L. Incluso más preferiblemente, tal progenie o descendientes comprenden resistencia aumentada a al menos un herbicida de imidazolinona en comparación con una planta de tipo natural y tal progenie o descendientes comprenden además dos alelos mutantes diferentes de *AHASL1* seleccionados del grupo que consiste en los alelos A122T, A205V y P197L.

Algunas plantas de girasol divulgadas en el presente documento comprenden el alelo A122T y producen semillas que comprenden un aceite de semilla extraíble que comprende al menos el 85 % (p/p) de ácido oleico u 850 g de ácido oleico/kg de aceite.

Preferiblemente, el contenido en ácido oleico en % del aceite de semilla de girasol de la presente invención se determina mediante métodos convencionales para el análisis de aceites vegetales tales como, por ejemplo, los métodos descritos en Official Methods of Analysis and Association of the Official Analytical Chemists (1990) W. Horwitz, ed., 14.<sup>a</sup> ed., Washington, D.C. y/o AOCS - American Oil Chemists' Society, Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society (1998), 5.<sup>a</sup> ed, Chicago, Illinois.

La presente divulgación se refiere a métodos para potenciar la tolerancia o resistencia de una planta, tejido de planta, célula de planta u otra célula huésped a al menos un herbicida que interfiere con la actividad de la enzima AHAS. Preferiblemente, un herbicida de este tipo es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriiazolinona o mezcla de los mismos. Más preferiblemente, un herbicida de este tipo es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea o mezcla de los mismos. Los herbicidas de imidazolinona incluyen, pero no se limitan a, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, y una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY®). Más específicamente, el herbicida de imidazolinona puede seleccionarse de, pero no se limita 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)-quinolin-3-carboxílico, ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, y una mezcla de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metilo. Se prefiere el uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico. Se prefiere particularmente el uso de ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

Los herbicidas de sulfonilurea incluyen, pero no se limitan a, clorsulfuron, metsulfuron-metilo, sulfometuron-metilo, clorimuron-etilo, tifensulfuron-metilo, tribenuron-metilo, bensulfuron-metilo, nicosulfuron, etametsulfuron-metilo, rimsulfuron, triflurosulfuron-metilo, triasulfuron, primisulfuron-metilo, cinosulfuron, amidosulfuron, flazasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron-etilo, halosulfuron, azimsulfuron, ciclosulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron-metilo, foramsulfuron, yodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron, tritosulfuron, 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 se limitan a, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam. Los herbicidas de pirimidiniloxibenzoato incluyen, pero no se limitan a, bispiribac, piritiobac, piriminobac, piribenzoxim y piriftalid. Los herbicidas de sulfonilamino-carboniltriiazolinona incluyen, pero no se limitan a, flucarbazona y propoxicarbazona.

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

Las plantas de girasol resistentes a herbicidas encuentran uso en métodos para controlar malas hierbas. Por tanto, la presente divulgación se refiere además a un método para controlar malas hierbas en las proximidades de una planta de girasol resistente a herbicidas.

El método comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida a las malas hierbas y a la planta de girasol resistente a herbicidas, en el que la planta tiene una resistencia aumentada a al menos un herbicida, particularmente un herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea, en comparación con una planta de girasol de tipo natural.

La presente divulgación proporciona métodos para controlar las malas hierbas parasitarias conocidas como orobanca (*Orobancha spp.*) en plantas de girasol infectadas. Tales *Orobancha spp.* incluyen, por ejemplo, *Orobancha cumana* y *Orobancha cernua*. El método comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida de imidazolinona a las malas hierbas y a la planta de girasol resistente a herbicidas de la presente invención, particularmente una planta de girasol que comprende dos copias del alelo A122T de *AHASL1* o una planta de girasol que comprende una copia del alelo A122T de *AHASL1* y una copia del alelo A205V de *AHASL1*. En una realización preferida, el herbicida de imidazolinona es imazapir. Preferiblemente, el herbicida inhibidor de AHAS se aplica en una fase vegetativa tardía y/o fase reproductiva temprana. Más preferiblemente, el herbicida se aplica en una fase reproductiva temprana. Lo más preferiblemente, el herbicida se aplica en la fase de crecimiento R1.

A menos que se indique lo contrario, los estados de crecimiento de girasol mencionados en el presente documento son las fases de crecimiento definidas en Schneiter y Miller (1981) *Crop Sci.* 21:901-903.

Al proporcionar plantas de girasol que tienen resistencia aumentada a herbicidas, particularmente herbicidas de imidazolinona y de sulfonilurea, puede emplearse una amplia variedad de formulaciones para proteger plantas frente a malas hierbas, para potenciar el crecimiento de plantas y reducir la competición por nutrientes. Puede usarse un herbicida por sí solo para el control antes de la emergencia, tras la emergencia, antes de la plantación y en la plantación de malas hierbas en zonas que rodean a las plantas descritas en el presente documento o puede usarse una formulación de herbicida de imidazolinona que contiene otros aditivos. El herbicida también puede usarse como tratamiento para semillas. Los aditivos encontrados en una formulación de herbicida de imidazolinona o de sulfonilurea incluyen otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de propagación, agentes de pegajosidad, agentes estabilizantes o similares. La formulación de herbicida puede ser una preparación húmeda o seca y puede incluir, pero no se limita a, polvos que pueden fluir, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida y las formulaciones de herbicida pueden aplicarse según métodos convencionales, por ejemplo, mediante pulverización, irrigación, espolvoreo o similares.

La presente divulgación se refiere a semillas transgénicas y no transgénicas con tolerancia aumentada a al menos un herbicida, particularmente un herbicida inhibidor de AHAS, más particularmente herbicidas de imidazolinona y de sulfonilurea. Tales semillas incluyen, por ejemplo, semillas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a herbicidas de la planta de girasol S4897, la planta de girasol GM40, la planta de girasol GM1606, la planta de girasol con número de depósito de patentes de ATCC PTA-6716, o la planta de girasol con número de depósito de patentes de ATCC PTA-7606, y semillas transgénicas que comprenden una molécula de polinucleótido de la invención que codifica una proteína AHASL resistente a herbicidas.

La presente divulgación se refiere a métodos que implican el uso de al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste en herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de triazolpirimidina, herbicidas de pirimidiniloxibenzoato, herbicidas de sulfonilamino-carboniltriiazolinona y mezclas de los mismos. En estos métodos, el herbicida inhibidor de AHAS puede aplicarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, tratamiento de semillas, tratamiento de la tierra y tratamiento foliar.

Antes de la aplicación, el herbicida inhibidor de AHAS puede convertirse en formulaciones convencionales, por ejemplo disoluciones, emulsiones, suspensiones, polvos para espolvorear, polvos, pastas y gránulos. La forma de uso depende del propósito previsto particular; en cada caso, debe garantizarse una distribución fina y uniforme del compuesto.

Las formulaciones se preparan de una manera conocida (véanse por ejemplo para una 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*, 4.<sup>a</sup> Ed., McGraw-Hill, Nueva York, 1963, páginas 8-57 y siguientes, los documentos WO 91/13546, US 4 172 714, US 4 144 050, US 3 920 442, US 5 180 587, US 5 232 701, US 5 208 030, GB 2 095 558, US 3 299 566, Klingman, *Weed Control as a Science*, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1961, Hance *et al*, *Weed Control Handbook*, 8.<sup>a</sup> Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 y Mollet, H., Grubemann, A., *Formulation technology*, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania), 2001, 2. D. A. Knowles, *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8), por ejemplo diluyendo el compuesto activo con agentes auxiliares adecuados para la formulación de productos químicos para la agricultura, tales como disolventes y/o portadores, si se desea emulsionantes, tensioactivos y dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelantes, para la formulación de tratamiento de semillas también opcionalmente colorantes y/o aglutinantes y/o agentes gelificantes.

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

Ejemplos de portadores adecuados son minerales naturales triturados (por ejemplo caolines, arcillas, talco, yeso) y materiales sintéticos triturados (por ejemplo sílice altamente dispersa, silicatos).

5 Emulsionantes adecuados son emulsionantes aniónicos y no iónicos (por ejemplo éteres de alcoholes grasos de polioxietileno, alquilsulfonatos y arilsulfonatos).

Ejemplos de dispersantes son lejías residuales de sulfito-lignina y metilcelulosa.

10 Tensioactivos adecuados usados son sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de amonio de ácido lignosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalenosulfónico, alquilarilsulfonatos, alquilsulfatos, alquilsulfonatos, sulfatos de alcoholes grasos, ácidos grasos y éteres de glicol de alcoholes grasos sulfatados, además condensados de naftaleno sulfonado y derivados de naftaleno con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácido naftalenosulfónico con fenol y formaldehído, éter de octilfenol de polioxietileno, isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, éteres de poliglicol de alquilfenol, tributilfenil éter de poliglicol, triestearilfenil éter de poliglicol, poliéter alcoholes de alquilarilo, condensados de óxido de etileno de alcohol graso y alcohol, aceite de ricino etoxilado, alquil éteres de polioxietileno, polioxipropileno etoxilado, acetal de éter de poliglicol de alcohol laurílico, ésteres de sorbitol, lejías residuales de lignosulfito y metilcelulosa.

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

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

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

Conservantes adecuados son por ejemplo diclorofeno y hemiformal de alcohol bencílico.

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

40 Pueden añadirse aglutinantes para mejorar la adhesión de los materiales activos sobre las semillas tras el tratamiento. Aglutinantes adecuados son tensioactivos de copolímeros en bloque EO/PO pero también poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidonas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenaminas, polietilenamidas, polietileniminas (Lupazol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, poli(acetato de vinilo), tilosa y copolímeros derivados de estos polímeros.

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

50 Un ejemplo de agente gelificante adecuado es carragenano (Satiagel®).

55 Pueden prepararse polvos, materiales para propagar y productos para espolvorear mezclando o triturando de manera concomitante las sustancias activas con un portador sólido.

60 Pueden prepararse gránulos, por ejemplo gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, uniendo los compuestos activos a portadores sólidos. Ejemplos de portadores sólidos son tierras minerales tales como geles de sílice, silicatos, talcos, caolines, Attaclay, caliza, cal, yeso, bol, loess, arcilla, dolmomita, tierra de diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos triturados, fertilizantes, tales como, por ejemplo, sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, ureas, y productos de origen vegetal, tales como harina de cereal, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa y otros portadores sólidos.

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

RMN). Para fines de tratamiento de semillas, las formulaciones respectivas pueden diluirse de 2-10 veces llevando a concentraciones en las preparaciones listas para usar del 0,01 al 60 % en peso de compuesto activo en peso, preferiblemente del 0,1 al 40 % en peso.

5 El herbicida inhibidor de AHAS puede usarse como tal, en forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de las mismas, por ejemplo en forma de disoluciones directamente pulverizables, polvos, suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones en aceite, pastas, productos para espolvorear, materiales para propagar o gránulos, por medio de pulverización, atomización, espolvoreo, propagación o vertido. Las formas de uso dependen totalmente de los fines previstos; están previstas para garantizar en cada caso la distribución más  
10 fina posible del herbicida inhibidor de AHAS.

Las formas de uso acuosas pueden prepararse a partir de concentrados en emulsión, pastas o polvos humectables (polvos pulverizables, dispersiones en aceite) mediante adición de agua. Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones en aceite, las sustancias, como tales o disueltas en un aceite o disolvente, pueden homogeneizarse en  
15 agua por medio de un humectante, agente de pegajosidad, dispersante o emulsionantes. Sin embargo, también es posible preparar concentrados compuestos por sustancia activa, humectante, agente de pegajosidad, dispersante o emulsionante y, si es apropiado, disolvente o aceite, y tales concentrados son adecuados para dilución con agua.

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

El herbicida inhibidor de AHAS también puede usarse de manera satisfactoria en el procedimiento de volumen ultrabajo (ULV), siendo posible aplicar formulaciones que comprenden más del 95 % en peso de compuesto activo, o incluso aplicar el compuesto activo sin aditivos.  
25

Los siguientes son ejemplos de formulaciones:

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

A) Concentrados solubles en agua (SL, LS)

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

40 B) Concentrados dispersables (DC)

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

C) Concentrados emulsionables (EC)

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

D) Emulsiones (EW, EO, ES)

55 Se disuelven veinticinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS en 35 partes en peso de xileno con adición de dodecibencenosulfonato de calcio y etoxilato de aceite de ricino (en cada caso 5 partes en peso). Se introduce esta mezcla en 30 partes en peso de agua mediante una máquina emulsionadora (por ejemplo Ultraturax) y se convierte en una emulsión homogénea. La dilución con agua da una emulsión, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 25 % (p/p) de herbicida inhibidor de AHAS.  
60

E) Suspensiones (SC, OD, FS)

65 En un molino de bolas con agitación se trituran 20 partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS con adición de 10 partes en peso de dispersantes, humectantes y 70 partes en peso de agua o de un disolvente orgánico para dar una suspensión de herbicida inhibidor de AHAS fina. La dilución con agua da una suspensión estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el

20 % (p/p) de herbicida inhibidor de AHAS.

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

5 Se trituran finamente cincuenta partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS con adición de 50 partes en peso de dispersantes y humectantes y se convierte en gránulos dispersables en agua o solubles en agua gránulos por medio de aparatos técnicos (por ejemplo extrusión, torre de pulverización, lecho fluidizado). La dilución con agua da una dispersión estable o disolución del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 50 % (p/p) de herbicida inhibidor de AHAS.

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

15 Se trituran setenta y cinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS en un molino de rotor-estator con adición de 25 partes en peso de dispersantes, humectantes y gel de sílice. La dilución con agua da una dispersión estable o disolución del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con el 75 % (p/p) de herbicida inhibidor de AHAS.

I) Formulación de gel (GF)

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

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

30 A) Polvos para espolvorear (DP, DS)

35 Se trituran finamente cinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS y se mezclan de manera íntima con 95 partes en peso de caolín finamente dividido. Esto da un producto para espolvorear que tiene el 5 % (p/p) de herbicida inhibidor de AHAS.

B) Gránulos (GR, FG, GG, MG)

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

45 Las formulaciones para el tratamiento de semillas convencionales incluyen por ejemplo concentrados fluidos FS, disoluciones 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 aplicarse a la semilla diluidas o sin diluir. La aplicación a las semillas se lleva a cabo antes de la siembra o bien directamente en las semillas.

50 Una formulación FS puede usarse para el tratamiento de semillas. Normalmente, una formulación FS puede comprender 1-800 g/l de principio activo, 1-200 g/l de tensioactivo, de 0 a 200 g/l de agente anticongelante, de 0 a 400 g/l de aglutinante, de 0 a 200 g/l de un pigmento y hasta 1 litro de un disolvente, preferiblemente agua.

55 Para el tratamiento de semillas, se tratan plantas resistentes a herbicidas con herbicidas, preferiblemente herbicidas seleccionados del grupo que consiste en herbicidas inhibidores de AHAS tales como amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, yodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pirazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxisulfuron, triflurosulfuron, tritosulfuron, imazametabenz, imazamox, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piriftalid, piritiobac y mezclas de los mismos, o con una formulación que comprende un herbicida inhibidor de AHAS.

65 El término tratamiento de semillas comprende todas las técnicas de tratamiento de semillas adecuadas conocidas en la técnica, tales como preparación de semillas, recubrimiento de semillas, espolvoreo de semillas, remojo de semillas y granulación de semillas.

También se divulga un método de tratamiento de suelo mediante la aplicación, en particular en la sembradora: o bien de una formulación granular que contiene el herbicida inhibidor de AHAS como composición/formulación (por ejemplo una formulación granular, opcionalmente con uno o más portadores aceptables para agricultura sólidos o líquidos y/u opcionalmente con uno o más tensioactivos aceptables para la agricultura. Este método se emplea ventajosamente, por ejemplo, en semilleros de cereales, maíz, algodón y girasol.

La presente divulgación también comprende semillas recubiertas con o que contienen una formulación de tratamiento de semillas que comprende al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste en amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, yodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pirazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxisulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piriftalid y piritiobac.

El término semilla abarca semillas y propágulos de plantas de todos los tipos incluyendo, pero sin limitarse a, semillas verdaderas, fragmentos de semillas, retoños, cormos, bulbos, fruto, tubérculos, granos, esquejes, vástagos cortados y similares y significa en una realización preferida de semillas verdaderas.

El término "recubierto con y/o que contiene" significa generalmente que el principio activo está en su mayor parte sobre la superficie del producto de propagación en el momento de la aplicación, aunque una mayor o menor parte del componente puede penetrar dentro del producto de propagación, dependiendo del método de aplicación. Cuando el dicho producto de propagación se (re)planta, puede absorber el principio activo.

La aplicación del tratamiento de semillas con el herbicida inhibidor de AHAS o con una formulación que comprende el herbicida inhibidor de AHAS se lleva a cabo pulverizando o espolvoreando las semillas antes de la siembra de las plantas y antes de la emergencia de las plantas.

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

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

Se entiende que el control de vegetación no deseada significa matar las malas hierbas y/o retardar de otra forma o inhibir el crecimiento normal de las malas hierbas. Se entiende que malas hierbas, en el sentido más amplio, significa todas aquellas plantas que crecen en ubicaciones en las que no se desean.

Las malas hierbas incluyen, por ejemplo, malas hierbas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Las malas hierbas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, malas hierbas de los géneros: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* y *Taraxacum*. Las malas hierbas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, malas hierbas de los géneros: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* y *Apera*. Otras malas hierbas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, plantas parasitarias que infectan girasoles, particularmente, *Orobancha spp.* (orobanca), tales como, por ejemplo, *Orobancha cumana* y *Orobancha cernua*.

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

Las plantas de girasol pueden transformarse con uno o más genes de interés. Los genes de interés varían dependiendo del desenlace deseado. Por ejemplo, diversos cambios en el fenotipo pueden ser de interés incluyendo la modificación de la composición de ácido graso en una planta, alterando el contenido de aminoácidos de una



planta, alterando los mecanismos de defensa contra patógenos y/o insectos de una planta, y similares. Estos resultados pueden conseguirse proporcionando la expresión de productos heterólogos o el aumento de la expresión de productos endógenos en plantas. Alternativamente, los resultados pueden conseguirse proporcionando una reducción de la expresión de uno o más productos endógenos, particularmente enzimas o cofactores en la planta. Estos cambios dan como resultado un cambio en el fenotipo de la planta transformada.

Los genes de interés incluyen genes de resistencia a insectos tales como, por ejemplo, genes de la proteína de toxina de *Bacillus thuringiensis* (patentes estadounidenses n.ºs 5 366 892; 5 747 450; 5 736 514; 5 723 756; 5 593 881; y Geiser *et al.* (1986) Gene 48:109).

La presente divulgación incluye métodos de diagnóstico para identificar los alelos del gen *AHASL1* en girasoles individuales. Tales métodos de diagnóstico, que se describen a continuación, encuentran uso en métodos para el cultivo de variedades de girasol comerciales con resistencia aumentada a herbicidas de imidazolinona. A continuación se describen los siguientes términos usados en el presente documento en la descripción de estos métodos.

Un “cebador” es un oligonucleótido de cadena sencilla, que tiene un extremo 5’ y un extremo 3’, que es capaz de hibridarse a un sitio de hibridación en una cadena de ADN diana, y el cebador sirve como un punto de inicio para la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa, particularmente en una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tal cebador puede ser o no ser totalmente complementario a su sitio de hibridación en el ADN diana.

Un sitio de “hibridación” en una cadena de ADN diana es el sitio al cual es capaz de hibridarse un cebador en los métodos de la presente invención.

Generalmente para la amplificación de un fragmento de un gen por PCR, se emplean un par de cebadores que se hibridan con cadenas opuestas de una molécula de ADN de doble cadena. Por convenio convencional y usado en el presente documento a menos que se indique lo contrario o resulte evidente a partir del contexto, el “cebador directo” se hibrida con la cadena no codificante y el “cebador inverso” se hibrida con la cadena codificante.

A lo largo de la memoria descriptiva, los términos “alelo mutante”, “alelo de *AHASL1* mutante” o “gen *AHASL1* mutante”, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o resulte evidente a partir del contexto, estos términos se refieren a un polinucleótido que codifica una proteína AHSAL1 tolerante a imidazolinona que comprende una única sustitución de aminoácido en comparación con una proteína *AHASL1* de tipo natural. Tal sustitución de aminoácido única incluye, por ejemplo, A122T, A205V y P197L. Normalmente, tal sustitución de aminoácido es el resultado de una única sustitución de nucleótido en la secuencia codificante de *AHASL1*.

En cambio, a menos que se indique lo contrario, los términos “alelo de tipo natural”, “alelo de *AHASL1* de tipo natural” o alelo de “gen *AHASL1* de tipo natural” se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína *AHASL1*.

La divulgación incluye el uso de varios cebadores para amplificación por PCR. Estos cebadores se describen en detalle a continuación.

Un “cebador de *AHASL1* directo” es un cebador que puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento que implican la amplificación por PCR de un fragmento de un alelo de *AHASL1* de girasol, en el que el fragmento se extiende en un sentido 5’ desde el sitio de la mutación que da lugar a la sustitución de aminoácido A122T. Preferiblemente, el complemento del sitio de hibridación del “cebador de *AHASL1* directo” está en el lado 5’ de la repetición (ACC)<sub>n</sub> que se muestra en la figura 8.

Un “cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso” es un cebador inverso que puede usarse en los métodos que implican la amplificación por PCR de un fragmento de un alelo de *AHASL1* que no comprende la mutación que da lugar a la sustitución de aminoácido A122T. El sitio de hibridación del cebador inverso se muestra en la figura 8. El nucleótido 3’-terminal (o de extremo 3’) del cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso se hibrida con la G que está en el sitio del SNP en Hap1-Hap5 en la figura 8. El nucleótido 3’-terminal del cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso es una C.

Un “cebador de *AHASL1* mutante inverso” es un cebador inverso que puede usarse en los métodos que implican la amplificación por PCR de un fragmento de un alelo de *AHASL1* mutante que comprende la mutación que da lugar a la sustitución de aminoácido A122T. En la figura 8 se muestra el sitio de hibridación del cebador inverso. El nucleótido 3’-terminal (o de extremo 3’) del cebador de *AHASL1* mutante inverso se hibrida con la A en Hap6 que está en el sitio del SNP en la figura 8. El nucleótido 3’-terminal del cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso es una T.

La presente divulgación incluye métodos para genotipar *AHASL1* de girasol. El método implica obtener ADN genómico de una planta de girasol y usar el ADN genómico o muestra o parte del mismo como molde para una primera amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende el ADN genómico, polimerasa,

trifosfatos de desoxirribonucleótidos, un cebador de *AHASL1* directo y un cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso. El cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso comprende una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13, en la que el nucleótido que está en el extremo 3' de dicho cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso es el complemento del nucleótido que está en la posición 1 de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13. El método comprende además usar el ADN genómico o muestra o parte del mismo como molde para una segunda amplificación por PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, dicho cebador de *AHASL1* directo y un cebador de *AHASL1* inverso mutante. El cebador de *AHASL1* mutante inverso comprende una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14, en la que el nucleótido que está en el extremo 3' de dicho cebador de *AHASL1* mutante inverso es el complemento del nucleótido que está en la posición 1 de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14. El método comprende además detectar los productos de dichas amplificaciones por PCR primera y segunda.

Los cebadores de *AHASL1* de tipo natural inverso y de *AHASL1* mutante inverso se hibridan con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente, en condiciones adecuadas para la amplificación por PCR de las partes de los genes *AHASL1* o girasol mostradas en la figura 8. Los cebadores de *AHASL1* de tipo natural inverso y de *AHASL1* mutante inverso tienen adicionalmente un nucleótido de extremo 3' que consiste en un nucleótido que está en el sitio de la mutación que da lugar a la sustitución de aminoácido A122T. Cada uno de los cebadores inversos puede ser, pero no se requiere que sea, totalmente complementario a su sitio de hibridación y no necesita extenderse por toda la longitud del sitio de hibridación. Además, los cebadores de *AHASL1* de tipo natural y mutante inversos pueden comprender nucleótidos adicionales en sus extremos 5' más allá de sus sitios de hibridación. Tales nucleótidos adicionales pueden ser, pero no se requiere que sean, total o incluso parcialmente complementarios a una parte del gen *AHASL1* de girasol. Los nucleótidos en 5' adicionales pueden incluir, por ejemplo, secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción. En un caso, los cebadores de *AHASL1* de tipo natural inverso y de *AHASL1* mutante inverso comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

Los métodos para genotipar *AHASL1* de girasol implican el uso de un cebador de *AHASL1* directo. A diferencia de los cebadores de *AHASL1* de tipo natural inverso y de *AHASL1* mutante inverso que se hibridan en el sitio de la mutación que da lugar a la sustitución de aminoácido A122T, el sitio de hibridación del nucleótido de cebador de *AHASL1* directo corresponde a una región del gen *AHASL1* de girasol que está en sentido 5' de la región (ACC)<sub>n</sub> mostrada en la figura 8 de forma que pueden distinguirse los haplotipos 1-6 por diferencias en la longitud (es decir, pb) de los productos de PCR resultantes. Las secuencias de estos haplotipos en las proximidades del sitio de la mutación A122T se muestran en la figura 8. En un caso, el cebador de *AHASL1* directo se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 12. En algunos casos de la invención, el cebador de *AHASL1* directo comprende una molécula de nucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3, y en una realización incluso más preferida, el cebador de *AHASL1* directo tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 opcionalmente con nucleótidos adicionales en el extremo 5' del cebador. Tales nucleótidos adicionales pueden ser, pero no se requiere que sean, total o incluso parcialmente complementarios a una parte del gen *AHASL1* de girasol. Los nucleótidos en 5' adicionales pueden incluir, por ejemplo, secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción.

La presente divulgación se refiere además a un método para identificar alelos de *AHASL1* en una planta de girasol. El método implica obtener ADN genómico de una planta de girasol y usar el ADN genómico o muestra o parte del mismo en al menos una amplificación por PCR. La amplificación por PCR implica usar el ADN genómico como molde para una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa que comprende el ADN genómico, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, un primer cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15, un primer cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16, un segundo cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17, y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18. El método implica además detectar los productos de amplificación por PCR.

Alternativamente, pueden usarse dos o incluso tres amplificaciones por PCR separadas en los métodos divulgados en el presente documento. Cuando se usan dos amplificaciones por PCR separadas, la primera amplificación por PCR implica usar el ADN genómico como molde para una primera amplificación por reacción en cadena de la polimerasa que comprende el ADN genómico, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, un primer cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15, y un primer cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16. La segunda amplificación por PCR implica usar el ADN genómico como molde para una segunda amplificación por reacción en cadena de la polimerasa que comprende el ADN genómico, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, un segundo cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17, y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18. La primera amplificación por PCR puede comprender opcionalmente un tercer cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18, y la segunda amplificación por PCR puede comprender opcionalmente un tercer cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15. La adición de tal cebador opcional a una cualquiera o a ambas de las

amplificaciones por PCR primera y segunda permite la producción de una banda de control que se amplifica mediante el par de cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 15 y 18. El método implica además detectar los productos de las amplificaciones por PCR primera y segunda.

5 Cuando se usan tres amplificaciones por PCR separadas, las amplificaciones por PCR primera y segunda son las mismas que las descritas anteriormente. La tercera amplificación por PCR implica usar el ADN genómico como molde para una tercera amplificación por reacción en cadena de la polimerasa que comprende el ADN genómico, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, el primer cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15, y el segundo cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos  
10 expuesta en SEQ ID NO: 18. El método implica además detectar los productos de las amplificaciones por PCR primera, segunda y tercera.

En un caso, el primer cebador directo tiene una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 15, el primer cebador inverso tiene una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 16, el segundo cebador directo tiene una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 17 y/o el segundo cebador inverso tiene una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 18. Se pretende que un cebador “que consiste esencialmente en” una secuencia mostrada a modo de ejemplo signifique que el cebador consiste en la secuencia entera a modo de ejemplo pero puede incluir adicionalmente nucleótidos en el extremo 5' del cebador. Tales nucleótidos adicionales pueden ser, pero no se requiere que sean, total o  
15 parcialmente complementarios al gen diana para amplificación. Dado que la síntesis de ADN se inicia desde el extremo 3' de un cebador, tales nucleótidos adicionales no cambian el sitio de partida para la síntesis de ADN en comparación con un cebador que es idéntico excepto por los nucleótidos adicionales.

En un caso, el primer cebador directo tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 15, el primer cebador inverso tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 16, el segundo cebador directo tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 17 y/o el segundo cebador inverso tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 18.

A menos que se indique lo contrario en el presente documento, “polimerasa” se refiere a una ADN polimerasa, particularmente una ADN polimerasa que es adecuada para su uso en una o más de las amplificaciones por PCR de la presente invención.

En los métodos en el presente documento, los resultados de amplificaciones por PCR pueden detectarse, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR seguido por tinción con bromuro de etidio del ADN en el gel y visualización en presencia de luz UV.

Los métodos implican el uso de PCR para amplificar ADN. Pueden diseñarse cebadores de oligonucleótidos para usarse en reacciones de PCR para amplificar secuencias de ADN correspondientes a partir de ADN genómico o ADNc extraído de cualquier organismo de interés. En la técnica se conocen generalmente métodos para diseñar  
40 cebadores de PCR y se divulgan en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.<sup>a</sup> edición., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York); incorporado en el presente documento como referencia. Véase también, Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York); Dietmaier *et al.*, eds. (2002) *Rapid Cycle Real Time PCR - Methods and Applications*, (Springer Verlag, Nueva York); Theophilus and Raphley, eds. (2002) *PCR Mutation Detection Protocols* (Humana Press, Nueva York); y Bartlett and Stirling, eds. (2003) *PCR Protocols* (Humana Press, Nueva York). Otros métodos conocidos de PCR que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, métodos que usan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores  
45 específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores de ADN/ARN mixtos, cebadores específicos de vector, cebadores con apareamiento parcialmente erróneo y similares.

El uso en el presente documento del término “cebador” o “cebador de PCR” no se limita a cebadores que comprenden ADN. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que tales cebadores pueden estar compuestos, por ejemplo, por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y combinaciones de los mismos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas que se producen de manera natural como  
55 análogos sintéticos. Aunque la divulgación en el presente documento no depende de cebadores de PCR de ningún número particular de nucleótidos, se reconoce que la parte de un cebador de PCR que se hibrida con su diana complementaria en el ADN de molde tendrá generalmente entre aproximadamente 10 y 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos contiguos. Sin embargo, un cebador de PCR de la invención puede comprender además en su extremo 5' nucleótidos adicionales que no se pretende que se hibriden con la diana tales como, por ejemplo, una secuencia de  
60 ADN que comprende uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

Los métodos en el presente documento implican el uso de ADN polimerasas para amplificación por PCR de ADN. Cualquier ADN polimerasa conocida en la técnica que es capaz de amplificar un ADN diana por PCR puede usarse en los métodos de la invención. Los métodos de la invención no dependen de una ADN polimerasa particular para

amplificación por PCR de ADN, solo que tales polimerasas sean capaces de amplificar uno o más de los genes *AHASL* de la planta o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, las ADN polimerasas de la invención son ADN polimerasas termoestables, incluyendo, pero sin limitarse a: polimerasas *Taq*; polimerasas *Pfu*; ADN polimerasas termoestables de *Thermococcus gorgonarius* que también se conocen como ADN polimerasas *Tgo*; ADN polimerasas termoestables de *Thermococcus litoralis* tales como, por ejemplo, las que se conocen como ADN polimerasas Vent® (Perler, F. *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5577), ADN polimerasas termoestables de especies de *Pyrococcus* GB-D tales como, por ejemplo, las que se conocen como ADN polimerasas Deep Vent® (Xu, M. *et al.* (1993) Cell 75, 1371-1377); y versiones modificadas y mezclas de las mismas.

Los métodos implican la amplificación de una secuencia de ADN diana por PCR. En determinados casos, la secuencia de ADN diana se amplificará directamente a partir de una muestra que comprende ADN genómico aislada de al menos una planta o parte, órgano, tejido o célula de la misma. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que la cantidad o concentración de ADN genómico dependerá de varios de factores incluyendo, pero sin limitarse a, las condiciones de PCR (por ejemplo temperatura de hibridación, temperatura de desnaturalización, el número de ciclos, concentraciones de cebador, concentraciones de dNTP, y similares), la ADN polimerasa termoestable, la secuencia de los cebadores y la secuencia de la diana. Normalmente, en las realizaciones de la invención descritas en el presente documento, la concentración de ADN genómico es de al menos aproximadamente 5 ng/μl hasta aproximadamente 100 ng/μl.

Además de la amplificación por PCR, los métodos pueden implicar diversas técnicas de biología molecular incluyendo, por ejemplo, aislamiento de ADN, particularmente aislamiento de ADN genómico, digestión de ADN o productos de PCR por enzimas de restricción y nucleasas, ligación de ADN, secuenciación de ADN, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, electroforesis en gel en cualquier otra matriz adecuada para la separación electroforética de ADN, la detección de ADN por tinción con bromuro de etidio, y similares. Tales técnicas se conocen generalmente en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Los métodos implican el uso de ADN genómico aislado a partir de una planta. Los métodos no dependen de ADN genómico aislado por ningún método particular. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para aislar, o purificar, a partir de una planta, ADN genómico, que puede usarse como fuente de ADN de molde para las amplificaciones por PCR descritas anteriormente. Véase, por ejemplo, Stein *et al.* ((2001) Plant Breeding, 12:354-356); Clark, ed. ((1997) Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual, Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-15); Miller *et al.*, ((1988) Nucleic Acids Research, 16:1215); todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia. Preferiblemente, tales métodos para aislar ADN genómico de planta son adecuados, o pueden adaptarse por un experto habitual en la técnica, para el aislamiento de ADN genómico a partir de números relativamente grandes de muestras de tejido de plantas. En una realización de la invención, se aísla ADN genómico a partir de plantas de girasol usando un kit DNeasy® según las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA, EE. UU.). En otra realización, se aísla ADN genómico a partir de plantas de girasol usando un kit MagneSil® según las instrucciones del fabricante (Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.).

Para los métodos en el presente documento, puede aislarse ADN genómico a partir de plantas totales o cualquier parte, órgano, tejido o célula de las mismas. Por ejemplo, puede aislarse ADN genómico a partir de plantas de semillero, hojas, tallos, raíces, inflorescencias, semillas, embriones, brotes, coleóptilos, anteras, estigmas, células cultivadas y similares. Además, los métodos no dependen del aislamiento de ADN genómico a partir de plantas o partes, órganos, tejidos o células de las mismas que están en ningún estadio particular de desarrollo. Los métodos pueden emplear ADN genómico que se aísla, por ejemplo, a partir de plantas de semillero o plantas maduras, o cualquier parte, órgano, tejido o célula de las mismas. Además, los métodos no dependen de plantas que se hacen crecer en ninguna condición particular. Las plantas pueden hacerse crecer, por ejemplo, en condiciones de campo, en un invernadero, o un fitotrón, en cultivo, o incluso hidropónicamente en un invernadero o fitotrón. Normalmente, las plantas se harán crecer en condiciones de luz, temperatura, nutrientes y humedad que favorezcan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los métodos implican detectar los productos de las amplificaciones por PCR. Normalmente, los productos de PCR se detectan separando en primer lugar los productos en un sustrato basándose en el peso molecular y detectando después cada uno de los productos de PCR separados en el sustrato. En un caso, los productos de PCR se detectan por electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR seguido por tinción con bromuro de etidio del ADN en el gel y visualización en el gel por fluorescencia en presencia de luz UV. Sin embargo, puede usarse cualquier método de detección adecuado para separar polinucleótidos para detectar los productos de PCR incluyendo, pero sin limitarse a, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta resolución, electroforesis capilar y similares. Los sustratos para tales métodos incluyen, por ejemplo, agarosa, poliacrilamida, dietilaminoetilcelulosa, hidroxialquilcelulosa, sefarosa, polioxietileno y similares. Las amplificaciones por PCR pueden implicar el uso de uno o más cebadores que están marcados, por ejemplo, radiactivamente, o con un tinte fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador paramagnético o cualquier otro marcador adecuado para la detección de ácidos nucleicos. Cuando las amplificaciones por PCR implican uno o más de tales cebadores marcados, la etapa de detección puede incluir la detección del marcador radiactivo, fluorescente, luminiscente, paramagnético u otro por cualquier otro método conocido en la técnica para detectar tal marcador.

La presente divulgación también incluye kits para realizar los métodos para genotipar *AHASL1* de girasol tal como se describe en el presente documento. Tales kits comprenden cebadores, particularmente un cebador de *AHASL1* directo, un cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso y un cebador de *AHASL1* mutante inverso tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, el cebador de *AHASL1* directo comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a una región del gen *AHASL1* de girasol que está en sentido 5' de la región (ACC)<sub>n</sub> mostrada en la figura 8, el cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13, y el cebador de *AHASL1* mutante inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14. Más preferiblemente, el cebador de *AHASL1* directo comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a una región del gen *AHASL1* de girasol que está en sentido 5' de la región (ACC)<sub>n</sub> mostrada en la figura 8, el cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13, y el cebador de *AHASL1* mutante inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14. Más preferiblemente, el cebador de *AHASL1* directo, el cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso y el cebador de *AHASL1* mutante inverso comprenden moléculas de nucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. Los kits pueden comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: una polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos e instrucciones para realizar el método.

La presente divulgación incluye además kits para realizar los métodos para identificar alelos de *AHASL1* en una planta de girasol. Tales kits comprenden cebadores, particularmente un primer cebador directo, un primer cebador inverso, y un segundo cebador directo y un segundo cebador inverso tal como se describió anteriormente. El primer cebador directo comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15, el primer cebador inverso comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16, el segundo cebador directo comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17 y el segundo cebador inverso comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18. Los kits pueden comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: una polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos e instrucciones para realizar el método.

Además, la divulgación incluye los cebadores usados en los métodos que implican amplificación por PCR descritos en el presente documento. Tales cebadores comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 15, 16, 17 y 18.

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

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa mencionado, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente a modo de ilustración. La invención se define en las reivindicaciones.

#### EJEMPLO 1: Interacciones fenotípicas de las mutaciones resistentes a imidazolinona en *AHASL1* de girasol

GM40 y GM1606 son líneas de girasol derivadas por mutación que muestran altos niveles de tolerancia a imidazolinonas debido a una mutación puntual en el codón 122 (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*) de *AHASL1* (documento WO 2007005581 y solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 60/695.952; presentada el 1 de julio de 2005). Se demostró que la mutación A122T y líneas derivadas e híbridos homocigóticos para esta mutación muestran una mejor tolerancia a imazamox que los girasoles Clearfield, comercialmente disponibles, ya conocidos homocigóticos para la mutación A205V en *AHASL1* (documento WO 2007005581). Ambos mutantes muestran dominancia incompleta con respecto al alelo sensible de tipo natural, como en muchos otros ejemplos en la bibliografía. Esta presente invención se basa en el descubrimiento que la mutación A122T presenta una dominancia casi completa para la resistencia a imidazolinonas con respecto a A205V en un intervalo de aplicaciones de herbicida de desde 0,5x hasta 6x de la dosis comercial. La presente invención proporciona plantas de girasol heterocigóticas A122T/A205V que muestran el mismo nivel de tolerancia y patrón de respuesta a dosis aumentadas de imidazolinonas que las plantas de girasol homocigóticas A122T. Por tanto, puede obtenerse un mayor nivel de tolerancia a imidazolinonas por sustitución alélica de A205V por A122T en solo una de las líneas parentales de un girasol Clearfield, lo que a su vez permite un despliegue más rápido de este nuevo alelo en el cultivo de girasol.

Para determinar las interacciones fenotípicas del gen de resistencia A122T y el gen *Imr1* (A205V) ya descrito en girasoles IMI-R (HA425), se evaluaron poblaciones F1, F2 y BC1F1 del cruce GM40 (A122T)/HA425 (A205V) a dos tasas de aplicación de herbicida (80 y 320 g.p.a.ha<sup>-1</sup> de imazapir). No se observó ninguna planta sensible en las poblaciones F2 y BC1F1 poblaciones resultantes de este cruce cuando se evaluó la progenie a la tasa de herbicida menor, indicando que los genes resistentes en GM40 y HA425 son alelos del mismo locus y que ambos de ellos muestran el mismo nivel de resistencia a imidazolinonas a una tasa de aplicación de herbicida de 1x. Cuando se

puntuaron las poblaciones F2 y BC1F1 a la tasa de herbicida mayor (320 g.p.a.ha<sup>-1</sup>), que distingue ambos progenitores, se observó segregación en cuanto a la sensibilidad. Solo pudieron detectarse dos clases fenotípicas, una clase resistente con plantas sin ninguna lesión o ligeros síntomas y un fenotipo sensible que se mató como la línea de control HA425. Las razones de segregación observadas con más de 450 plantas F2 examinadas no fueron significativamente diferentes de una razón de segregación de 3:1. Para confirmar estos resultados, se retrocruzaron plantas F1 con HA425 y se examinaron las plantas BC1F1 resultantes a 320 g.p.a.ha<sup>-1</sup> de imazapir. Las razones de segregación observadas dieron un buen ajuste a una razón 1:1 de R:S, confirmado que el gen resistente en GM40 mostró una dominancia completa con respecto al gen resistente en HA425 y que ambos de ellos son alelos del mismo locus, *AHASL1*.

Para confirmar adicionalmente estos resultados, se usó un enfoque de marcador molecular. El gen *AHASL1* en girasol presenta un polimorfismo de repetición de secuencia simple (SSR) que distingue líneas que portan el alelo *Imr1* de cualquier otro genotipo de girasol (Kolkman *et al.* (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159). La amplificación por PCR del fragmento de gen *AHASL1* que contiene esta SSR usando los cebadores p-AHAS18 y p-AHAS19 produjo un producto de 321 pb para GM40 y BTK47 (línea de mutagénesis original) y un fragmento de 312 pb para HA425. Este polimorfismo de longitud variante detectado en GM40 y HA425 se aprovechó para investigar la segregación en las poblaciones F2 y BC1F1 derivadas de cruzar ambas líneas. Se recogieron al azar ochenta plantas de la población F2 y 50 plantas de la población BC1F1, se muestrearon para aislamiento de ADN, es expusieron a una tasa de aplicación de imazapir de 320 g.p.a.ha<sup>-1</sup> y se genotiparon usando este marcador. En la población F2, se mataron 22 plantas por el herbicida (S) y 58 no mostraron síntomas o mostraron una ligera lesión (R). La razón de segregación observada para resistencia no fue significativamente diferente ( $p < 0,61$ ) de la razón de segregación esperada para un factor completamente dominante que segrega en F2 (3R:1S). La segregación observada para el marcador de SSR de *AHASL1* (19 A/A:39 A/B:22 B/B) se ajusta a una razón de segregación esperada para un marcador codominante que segrega en F2 (1:2:1,  $p < 0,87$ ). Todas las plantas sensibles genotipadas para SSR de *AHASL1* eran homocigóticas para el haplotipo HA425(B/B), mientras que las plantas R eran o bien heterocigóticas (A/B) o bien homocigóticas (A/A) para el haplotipo GM40 (tabla 4, figura 1). Se sometió adicionalmente a ensayo La cosegregación de fenotipos de resistencia a herbicidas y haplotipos de *AHASL1* en 50 progenies de BC1F1 que segregan para la resistencia. Las razones de segregación observadas para la resistencia se ajustan a una razón 1:1 ( $p < 0,78$ ) tal como se esperaba para la segregación de un locus en BC1. Se cosegregaron completamente los haplotipos de SSR de *AHASL1* con fenotipos para reacción a herbicida, 23 A/B:27 B/B. La progenie sensible era homocigótica para el haplotipo HA425 (B/B), mientras que la progenie resistente era heterocigótica para haplotipos HA425 y GM40 (A/B).

Estos resultados confirman que el gen resistente en GM40 es diferente del gen de resistencia en HA425, que ambos de ellos son variantes alélicas del locus de *AHASL1* y, finalmente, que el gen presente en GM40 es completamente dominante con respecto al alelo *Imr1*.

Ejemplo 2: Respuesta de acontecimientos homocigóticos A122T/A122T y A205V/A205V y heterocigóticos A122T/A205V frente a imazapir a nivel de planta completa

Se llevó a cabo este experimento para cuantificar y contrastar la sensibilidad a imazapir de híbridos de girasol que portaban las mutaciones A122T y A205V en estados homocigótico (A122T/A122T o A205V/A205V) y heterocigótico (A122T/A205V) en diferentes contextos genéticos y a nivel de planta completa.

#### 45 Materiales

Se obtuvieron semillas de las diferentes líneas de girasol (tabla 1) en condiciones de campo.

Tabla 1. Materiales de girasol usados, su genealogía y tipo de acontecimiento de mutación

Código	Genealogía	Línea (L) o híbrido (H)	Acontecimiento(s) de mutación
L1		L	A205V
L2		L	A205V
H1	L1 x L2	H	A205V
L3	cmsGM40	L	A122T
L4		L	A122T
H2	L3 x L4	H	A122T
L5	BTK 47	L	sensible
H3	L3 x L2	H	A205V + A122T
H4	L1 x L4	H	A205V + A122T

Las líneas L1 y L2 son líneas de cultivo estéril macho y restauradora, respectivamente, que portan el alelo A205V en condición homocigótica. L5, BTK 47, es una línea mantenedora que se usó como material inicial para desarrollar la línea GM40. GM40 es la línea original que porta la mutación A122T en el estado homocigótico (número de depósito para patente de ATCC PTA-6716; véase el documento WO 2007005581). L4 es una línea restauradora BC2F4

derivada del cruce R701\*3/GM40 usando un retrocruce asistido por marcador para seleccionar la planta más similar al progenitor recurrente en cada generación de retrocruce. R701 es una línea restauradora sensible con buena capacidad de combinación. Tras dos generaciones de retrocruce se autofecundó la planta más similar a R701 y se seleccionó su progenie para determinar la resistencia a imazapir. Se seleccionaron plantas homocigóticas A122T entre la progenie resistente usando un diagnóstico de marcador molecular de la mutación A122T que se describe a continuación en el presente documento. CMS GM40 es la versión estéril macho de GM40 que se desarrolló a partir de la generación BC1F1 del cruce cmsBTK47/\*2 GM40 usando el mismo marcador de diagnóstico para distinguir plantas homo y heterocigóticas para el alelo A122T.

10 Métodos

*Marcador de diagnóstico para la mutación A122T*

Se describe un ensayo de PCR específica de alelo para genotipado de alto rendimiento de plantas de girasol que portan la mutación A122T en AHASL1. El ensayo permite: (1) detectar individuos que portan la mutación; (2) determinar la cigosidad de estos individuos; y (3) distinguir plantas resistentes que portan esta mutación de plantas que contienen la mutación A205V.

Se tomaron cebadores de PCR de los proporcionados por Kolkman *et al.* ((2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159) para amplificar un fragmento de la secuencia de AHASL1 de girasol que incluye la mutación A122T y un polimorfismo de inserción-delección ("INDEL") y que puede usarse para distinguir la secuencia de mutación A122T de la secuencia de la mutación A205V ya conocida.

Los nombres y las secuencias de estos cebadores son:

p-AHAS18 5'-ttcctccccgttctgcattac-3' (SEQ ID NO: 1)

p-AHAS19 5'-cgccgcctgttcgtgac-3' (SEQ ID NO: 2)

La mezcla de reacción fue la siguiente: 1 U de ADN polimerasa Taq, 70 ng de ADN de girasol genómico, 25 µg de BSA, y tiene una concentración final de 100 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada cebador, Tris-HCl 90 mM pH8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM. El programa de PCR consiste en una etapa de desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 30 s a 72 °C, seguido por una etapa de elongación final a 72 °C durante 10 min.

El tamaño de fragmento predicho para BTK47 (o GM40) usando los cebadores anteriormente mencionados es de 321 pb y el tamaño de fragmento predicho basándose en el n.º de registro de GenBank AY541455 para el haplotipo de girasol que porta la mutación A205V es de 312 pb. La figura 4 muestra que la reacción de PCR descrita permite distinguir ambos mutantes A122T y A205V basándose en la presencia de un polimorfismo INDEL entre sus secuencias.

Se restringieron los productos amplificados y se resolvieron los fragmentos resultantes en un gel de agarosa. La reacción de restricción consiste en 10 µl del producto de amplificación, BSA 1X (100 µg/ml), NEBuffer 3 1X (NaCl 100 mM, Tris HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól 1 mM pH 7,9) y 2,5 U de BmgB I. Se incubó esta mezcla a 37 °C durante 3 horas. El tamaño de fragmento predicho tras la restricción para plantas de tipo natural y A122T son los siguientes:

El tipo natural mostrará fragmentos de 183 + 138 pb. GM40 (A122T): muestra fragmentos de 183 + 76 + 62 pb. Los individuos heterocigóticos mostrarán fragmentos de 183 + 138 + 76 + 62 pb. La figura 5 muestra que usando este método se obtienen fragmentos del tamaño esperado y que es posible detectar portadores de A122T de plantas de tipo natural y, además, que es posible distinguir entre individuos homo y heterocigóticos para la mutación A122T.

*Tratamientos con herbicida*

Se sembraron semillas en placas de Petri y, tras la germinación, se trasplantaron plántulas a macetas de 10 cm de diámetro en un medio de siembra en maceta que consistía en partes iguales de vermiculita, tierra y arena. Se hicieron crecer las plantas en un invernadero en condiciones de luz natural complementada con lámparas de haluro de sodio de 400 W para proporcionar una duración de día de 16 h. Las temperaturas de día/noche fueron de 25 °C y 20 °C, respectivamente. En el estadio V2-V4 (Schneiter & Miller (1981) Crop Sci. 21:901-903) se asignaron aleatoriamente 10 plantas de cada genotipo a cada tratamiento que consistía en ocho dosis de imazapir (0, 40, 80, 160, 240, 320, 400 y 480 g de pa/ha, correspondiente a sin tratamiento, 0,5x, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x y 6x, respectivamente), y a una determinación de biomasa a tiempo cero. Se dispuso el experimento como un diseño en bloques aleatorizado con una disposición factorial completa (línea de girasol x tratamiento) de tratamientos y 10 repeticiones.

En el día de la aplicación de herbicida se cortaron diez plantas de cada genotipo en el nodo cotiledóneo y se secó a

60 °C durante 48 h para una determinación del peso seco a tiempo cero.

Se mantuvieron las plantas restantes durante 14 días tras el tratamiento con imazapir (DAT) y se determinó su altura, índice de fitotoxicidad (PI) y biomasa seca por encima del suelo. Se determinó la altura como la distancia entre el nodo cotiledóneo y el vértice de cada planta. Se convirtieron los datos de biomasa por encima del suelo de cada línea en acumulación de biomasa tras la aplicación restando la biomasa a tiempo cero promedio apropiada de cada muestra. Se convirtieron los datos de biomasa seca en porcentajes de plantas de control sin tratar dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos. PI es una escala fenotípica de desde 0 hasta 9 que se evaluó para planta por inspección visual. Las plantas sin ningún síntoma se registraron como "0", niveles crecientes de crecimiento reducido y clorosis con respecto a las plantas de control sin tratar se registraron como de "1" a "4", niveles crecientes de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas se registraron desde "5" hasta "8", y plantas muertas con necrosis total del vértice se registraron como "9".

## Resultados

### *Altura*

La reducción de la altura de la línea sensible fue del 85 % a la tasa menor de aplicación de imazapir (0,5x). Desde 1x hasta 6x la reducción de la altura en esta línea fue de aproximadamente el 85 % de las plantas de control sin tratar. La altura de las líneas de girasol y del híbrido que portaba la mutación A205V en condición homocigótica no se diferenciaron de los controles sin tratar cuando se aplicó una tasa de 0,5x o 1x de imazapir. Desde 2x hasta 6x, estas líneas mostraron una reducción significativa en la altura que alcanzó el 69,6 % +/- 3,9 de los controles sin tratar (tabla 2 y figura 1). En cambio, líneas de girasol que portaban la mutación A122T en condición homocigótica mostraron una reducción de la altura reducida (desde 0,1 % hasta 18,8 % de los controles sin tratar para una tasa de imazapir de 0,5x y 6x, respectivamente). Ambos grupos de líneas mostraron una diferencia significativa entre ellos con respecto a su respuesta a un aumento en la tasa de herbicida de desde 2x hasta 6x (tabla 2 y figura 1).

Los materiales con ambos alelos mutantes en *AHASL1* (heterocigotos A122T/A205V) mostraron una reducción de la altura de desde el 0,6 % hasta el 38,2 % +/- 2,7 de los controles sin tratar para una tasa de aplicación de herbicida de 0,5x a 6x. Esta reducción en la altura para materiales heterocigóticos no difirió de la reducción observada para homocigotos A122T/A122T pero era menor que la registrada para homocigotos A205V/A205V (figura 1). De hecho, la reducción de altura media en materiales heterocigóticos no era diferente de la que se observó en plantas homocigóticas A122T/A122T a ninguna dosis de aplicación de herbicida, pero era estadísticamente diferente de la observada en plantas homocigóticas A205V/A205V a tasas de aplicación de herbicida de desde 2x a 6x (tabla 2).

### *Índice de fitotoxicidad*

Ambos mutantes en condición homocigótica mostraron grandes diferencias en su respuesta al aumento en la tasa de herbicida desde 0,5x hasta 6x (figura 2). Las líneas de girasol que portaban la mutación A122T en condición homocigótica mostraron una ligera reducción en el tamaño de hoja y un color verde más claro que las plantas de control a medida que aumentó la tasa de herbicida (tabla 3). En cambio, las plantas que portaban la mutación A205V no mostraron ninguna lesión a una tasa de herbicida de 0,5x o 1x, pero el nivel de lesión (clorosis, deformación de la hoja y necrosis en las hojas) aumentó rápidamente desde 2x hasta 6x (tabla 3). Los dos mutantes en condición homocigótica difirieron significativamente uno de otro para el índice de fitotoxicidad desde 2x hasta 6x (tabla 3). Los materiales heterocigóticos A122T/A205V mostraron el mismo patrón de respuesta que los materiales homocigóticos A122T/A122T. De hecho, solo mostraron un color verde más claro que las plantas de control a cualquier tasa de aplicación de herbicida y un tamaño de hoja menor que las plantas de control a tasas de 5x y 6x que solo determinaron un PI de 1 a la dosis más alta (figura 2).

### *Biomasa en peso seco por encima del suelo*

Las curvas de dosis-respuesta para el peso seco de mutantes A122T y A205V se muestran en la figura 3. El peso de biomasa del acontecimiento A122T en condición homocigótica se redujo con respecto a las plantas de control a tasas de 4x, 5x y 6x, y esta reducción alcanzó el 25 % para la dosis mayor. Mientras tanto, el peso seco del acontecimiento A205V se redujo con respecto a las plantas de control desde 0,5x (40 g de pa/ha) hasta 6x. Ambos mutantes mostraron diferencias significativas entre ellos con respecto a esta variable desde 0,5x hasta 6x (tabla 4). Los materiales heterocigóticos A122T/A205V mostraron exactamente la misma tendencia que los materiales homocigóticos A122T (figura 3, tabla 4). Mostraron una reducción en el peso de biomasa de desde el 0,3 % hasta el 33 % para tasas de aplicación de herbicida de 0,5x a 6x que no se diferenció de la registrada para individuos homocigóticos A122T a cualquier tasa. Sin embargo, los materiales heterocigóticos mostraron diferencias significativas con respecto a individuos homocigóticos A205V para la acumulación de materia seca a tasas de aplicación de herbicida de desde 3x hasta 6x (tabla 4).

## Conclusiones

Los materiales heterocigóticos que portaban ambos alelos mutantes en el locus de *AHASL1* mostraron el mismo



nivel de tolerancia y patrón de respuesta para la altura de planta, índice de fitotoxicidad y acumulación de materia seca, para tasas aumentadas de aplicación de imazapir que los materiales homogóticos A122T y este nivel de tolerancia es mejor que el expresado por materiales homogóticos A205V.

Tabla 2. Efecto de diferentes dosis de imazapir sobre la altura de la planta 14 días tras el tratamiento para tres genotipos de girasol que portan el acontecimiento de mutación A205V, tres genotipos que portan el acontecimiento de mutación A122T, dos genotipos que portan el acontecimiento de mutación A205V/A122T y una línea sensible.

Dosis	WT	A205V						A122T						A122T/A205V			Diferencia entre A205V frente a A205V/A122T		Diferencia entre A122T frente a A205V/A122T	
		H1	L1	L2	Media	DE	H2	L3	L4	Media	DE	H3	H4	Media	DE	Valor P	Valor P	Valor P		
0	100,00	100	100	100	100	0,0	100	100	100	0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	-	0,00	0,00		
0,5	20,14	99,5	100,0	99,2	99,6	0,4	99,2	100,4	99,9	0,6	98,7	100,0	99,4	99,4	0,5	0,803	0,21	0,49		
1	14,58	99,5	100,0	98,1	99,2	1,0	98,6	99,9	99,5	0,8	97,0	99,6	98,3	98,3	0,9	0,613	0,89	1,21		
2	14,58	78,6	78,9	63,6	73,7**	8,8	100,3	92,0	98,0	5,3	96,7	100,0	98,3	98,3	1,2	0,031	-24,63	-0,32		
3	14,58	48,4	50,0	51,9	50,1**	1,8	99,6	90,5	95,7*	4,7	93,8	100,0	96,9	96,9	2,2	0,026	-46,79	-1,22		
4	14,58	28,9	38,1	27,5	31,5**	5,8	101,0	90,8	92,1	5,6	92,0	95,0	93,5**	93,5**	1,1	0,001	-62,01	1,15		
5	14,58	25,3	31,8	26,0	27,7**	3,6	87,0	84,4	84,8	1,4	65,4	87,2	76,3**	76,3**	7,7	0,130	-48,59	9,12		
6	14,58	27,1	34,7	29,3	30,4**	3,9	79,6	84,4	79,8	2,7	58,0	65,5	61,8**	61,8**	2,7	0,027	-31,39	19,49		

\*, \*\*, \*\*\*: Las medias son estadísticamente diferentes de controles sin tratar a un nivel de significación 0,05 y 0,01, respectivamente

Tabla 3. Efecto de diferentes dosis de imazapir sobre el índice de fitotoxicidad tras 14 días para tres genotipos de girasol que portan el acontecimiento de mutación A205V, tres genotipos que portan el acontecimiento de mutación A122T, dos genotipos que portan el acontecimiento de mutación A205V/A122T y una línea sensible.

Dosis	WT	A205V						A122T						A122T/A205V			Diferencia entre A205V frente a A205V/A122T		Diferencia entre A122T frente a A205V/A122T			
		I1	I1	I2	Media	DE		I1	I2	I3	I4	Media	DE		H1	H2	H3	H4	Media	DE	Valor P	Valor P
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
0.5	9	0	0	0	0	0	0.5	0.4	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	ns	-0.21
1	9	0	0	0	0	0	0.5	0.4	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	ns	-0.21
2	9	1.8	1.6	3.1	2.2*	0.8	0.5	0.4	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	1.66	0.075	-0.20
3	9	6.4	5.1	3.9	5.1**	1.2	0.5	0.5	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	4.65	0.022	-0.17
4	9	8.0	8.4	5.9	7.4**	1.3	0.5	1.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	6.92	0.012	0.00
5	9	8.9	8.9	6.9	8.2**	1.1	0.5	2.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.6	0.2	0.2	0.6	0.2	0.6	0.2	7.59	0.006	0.21
6	9	9.0	8.9	6.7	8.2**	1.3	0.5	2.5	0.5	1.2	1.2	1.2	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	7.19	0.010	0.17

\*, \*\*: Las medias son estadísticamente diferentes de controles sin tratar a un nivel de significación de 0.05 y 0.01, respectivamente.

Tabla 4. Efecto de diferentes dosis de imazapir sobre la acumulación de biomasa tras 14 días de tratamiento para tres genotipos de girasol que portan el acontecimiento de mutación A205V, tres genotipos que portan el acontecimiento de mutación A122T, dos genotipos que portan el acontecimiento de mutación A205V/A122T y una línea sensible.

Dosis	WT	A205V						A122T						A122T/A205V				Diferencia entre A205V frente a A122T		Diferencia entre A122T frente a A205V/A122T	
		I.5	I.1	I.2	Media	DE	I.12	I.3	I.4	Media	DE	I.13	I.4	Media	DE	I.14	I.15	Media	DE	Valor P	Valor P
0	100.0	100	100	100	100	0.0	100	100	100	100	0	100	100	100.0	0.0	100	100	100.0	0.0	-	0.00
0.5	18.3	95.0	91.7	99.2	95.3*	3.7	100	96.6	100.0	98.9	2.0	99.804	99.479	99.6	0.2	99.6	99.6	99.6	0.2	0.771	-0.76
1	15.0	89.6	81.7	85.0	85.5**	4.0	97.2	93.9	99.1	96.7*	2.6	100.0	97.8	98.9	1.6	97.8	98.9	98.9	1.6	0.241	-2.17
2	15.0	75.5	54.7	58.1	62.8**	11.2	97.9	81.6	97.0	92.2**	9.2	94.3	92.2	93.2**	1.5	92.2	93.2**	93.2**	1.5	0.063	-1.07
3	15.0	60.4	35.7	48.1	48.1**	12.4	98.2	75.8	96.1	90.0**	12.4	90.8	88.2	89.5**	1.9	88.2	89.5**	89.5**	1.9	0.049	0.55
4	15.0	46.5	25.3	28.8	33.5**	11.3	97.8	75.0	84.3	85.7**	11.5	87.8	85.0	86.4**	2.0	85.0	86.4**	86.4**	2.0	0.029	-0.73
5	15.0	38.9	19.8	27.4	28.7**	9.6	85.1	60.1	77.5	74.3**	12.8	72.1	78.7	75.4**	4.7	72.1	75.4**	75.4**	4.7	0.013	-1.14
6	15.0	33.9	19.5	24.9	26.1**	7.2	79.5	59.6	70.7	69.9**	10.0	63.2	71.8	67.5**	6.0	63.2	67.5**	67.5**	6.0	0.012	2.41

\* \*\*, Las medias son estadísticamente diferentes de controles sin tratar a un nivel de significación de 0.05 y 0.01, respectivamente.

EJEMPLO 3: Tolerancia a herbicida de líneas homocigóticas y heterocigóticas para A122T y A205V frente a líneas heterocigóticas para ambas mutaciones (A122T/A205V) en condiciones de campo

5 Se llevó a cabo este experimento para comparar la tolerancia a herbicida de híbridos y líneas de girasol en diferentes genotipos que portaban las mutaciones A122T y A205V en estados homocigótico (A122T/A122T o A205V/A205V), heterocigótico (A122T/- o A205V/-) y heterocigótico doble apilado (A122T/A205V) en condiciones de campo.

10 Materiales

Los materiales de girasol que se usaron se indican en la tabla 5.

Tabla 5: Lista de entrada

Tipo de material	Acontecimiento de mut.	Cigoidad	Producto	Descripción de entrada	Número de entrada
Restaurador WT x IMI	A205V	hetero	híbrido	híbrido-1	1
Restaurador WT x IMI	A205V	hetero	híbrido	híbrido-3	2
Restaurador WT-CMS x IMI	A205V	hetero	híbrido	híbrido-7	3
Restaurador IMI	A205V	homo	restaurador	línea-4	4
Restaurador IMI CMS x IMI	A205V	homo	híbrido	híbrido-6	5
Restaurador WT X GM40	A122T	hetero	híbrido	híbrido-8	6
Restaurador WT X GM40	A122T	hetero	híbrido	híbrido-15	7
Restaurador WT X GM40	A122T	hetero	híbrido	híbrido-16	8
Restaurador GM40	A122T	homo	restaurador	línea-9	9
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122T	homo	híbrido	híbrido-13	10
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122T	homo	híbrido	híbrido-14	11
Restaurador IMI CMS x GM40	A205V/A122T	hetero/doble	híbrido	híbrido-10	12
Restaurador GM40 CMS x IMI	A205V/A122T	hetero/doble	híbrido	híbrido-11	13
Restaurador IMI CMS x GM40	A205V/A122T	hetero/doble	híbrido	híbrido-12	14
WT	-	-	línea B	WT-5	15

15 Métodos

Se produjeron semillas de cada entrada en la tabla 5 en condiciones de producción de semillas óptimas en Sudamérica durante el periodo de crecimiento 2005-2006. La prueba en campo se llevó a cabo en una ubicación en Dakota del Norte, EE. UU. en 2006. Las entradas se organizaron en un bloque completo aleatorizado usando un diseño de parcelas divididas que consistía en 3 repeticiones para cada combinación de tratamiento. El factor A (tabla 6) era el tratamiento con herbicida y el factor B era la entrada de girasol. El tamaño de parcela era de 4 filas x 12 pies y la tasa de siembra fue compatible con las prácticas agrícolas locales.

25 Tabla 6: Factor A - Lista de tratamiento con herbicida

N.º de tratamiento	Tratamiento
1	Sin tratar
2	imazamox 50 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)
3	imazamox 100 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)
4	imazamox 200 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)
5	imazapir 160 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)

NIS = tensioactivo no iónico

5 Volumen de pulverización: 10 galones por acre (GPA) (o 100 litros/ha) para pulverizador de mochila o 20 GPA (o 200 litros/ha) para pluma montada en tractor.

Estadio de crecimiento a la aplicación de herbicida: 2-4 hojas.

10 Se dejó la entrada 15 (línea mantenedora WT) sin pulverizar en todos los bloques de tratamiento.

Se evaluaron clasificaciones de fitotoxicidad a los 7 y 21 días tras la aplicación de herbicida. Se registró la fitotoxicidad como la cantidad de daño en la plata (en porcentaje), en la que una clasificación de "0" indicaba ningún daño a las plantas en la parcela con respecto a la parcela sin tratar. Una clasificación de "100" indicaba necrosis completa (muerte) de las plantas en la parcela con respecto a la parcela sin tratar.

15 Se sometieron los datos a un análisis ANOVA y las medias de las 3 repeticiones se presentan en la tabla 7 (fitotoxicidad a los 7 días tras el tratamiento) y la tabla 8 (fitotoxicidad a los 21 días tras el tratamiento).

20 Resultados

A 160 g de pa/ha de imazapir no había diferencias significativas en la fitotoxicidad entre las entradas heterocigóticas dobles A205V/A122T y las entradas homocigóticas A205V y A122T ni a los 7 días ni a los 21 días tras el tratamiento (DAT). La fitotoxicidad en las entradas heterocigóticas A205V fue significativamente mayor que en las entradas heterocigóticas doble A205V/A122T y homocigóticas para las clasificaciones tanto a los 7 como a los 21 DAT (en el intervalo del 20-43 % para las entradas heterocigóticas A205V para 21 DAT). La fitotoxicidad en las entradas heterocigóticas también aumentó desde el momento en el que se realizó la evaluación a los 7 DAT hasta el momento en el que se realizó aquella a los 21 DAT. No hubo un aumento significativo en la fitotoxicidad desde 7 DAT hasta 21 DAT para las entradas heterocigóticas doble A205V/A122T y homocigóticas A122T/A122T y A205V/A205V.

30 Se sometieron a prueba tres niveles de imazamox, 50 g de pa, 100 g de pa y 200 g de pa/ha, en todas las entradas (excepto la entrada 15). A 200 g de pa/ha de imazamox, las líneas heterocigóticas A205V/A122T (fitotoxicidad del 2 - 3 % a los 21 DAT) demostraron fitotoxicidad significativamente menor que las líneas homocigóticas A205V/A205V (fitotoxicidad del 15-22 % a los 21 DAT) y fitotoxicidad equivalente a las líneas homocigóticas A122T/A122T (fitotoxicidad del 3-5 % a los 21 DAT).

35 Discusión

Las entradas heterocigóticas dobles A205V/A122T demostraron una tolerancia a herbicida equivalente a las entradas homocigóticas A122T/A122T y una tolerancia a herbicida superior a las entradas homocigóticas A205V/A205V, tal como se demostró por el nivel de tratamiento con imazamox más alto (200 g de pa/ha).

45 El único nivel de tratamiento de imazapir, 160 g de pa/ha, no fue lo suficientemente alto como para mostrar diferencias significativas en la fitotoxicidad entre las entradas heterocigóticas dobles A205V/A122T y las entradas homocigóticas, aunque fue suficiente para ilustrar la tolerancia mayor obtenida apilando juntas las dos mutaciones heterocigóticas A205V/A122T frente a cada mutación heterocigótica por sí sola.

50 Basándose en los datos de tratamiento con imazamox, cuando se apila la mutación A122T con la mutación A205V en el estado heterocigótico, se proporciona una tolerancia a herbicida más fuerte que la mutación A205V en el estado homocigótico.

El experimento descrito anteriormente divulga las interacciones entre dos mutantes de alelo de *AHASL1* en girasol. La mutación en el codón 122 tiene una tolerancia a herbicida significativamente mayor que cualquier mutación de *AHAS* anteriormente notificada en girasol, mientras que la mutación en el codón 205 confiere niveles de resistencia intermedios. Como el alelo 122 muestra dominancia con respecto a su alelo 205, los genotipos heterocigóticos que portan ambos mutantes tienen el mismo nivel de tolerancia que el homocigótico 122.

60 Debido a la tolerancia a herbicida aumentada, la presente divulgación se refiere a métodos que permiten el desarrollo de productos de herbicida nuevos y altamente eficaces para la producción de girasol. Dado que la presente divulgación proporciona plantas de girasol con niveles comerciales de tolerancia a herbicida producidas realizando una única sustitución de gen en los híbridos de girasol Clearfield actuales, que son A205V/A205V, la presente invención tal como se define en las reivindicaciones encuentra uso en el aumento de la eficiencia del cultivo para la producción de híbridos de girasol tolerantes a herbicida y también proporciona para un despliegue más rápido de la mutación A122T en híbridos de girasol comerciales.

65 Tabla 7. Clasificaciones de fitotoxicidad (% de daño de cosecha) registradas 7 días tras el tratamiento (DAT)

ES 2 659 991 T3

Tipo de material	Acontecimiento de mut.	Cigosidad	Producto	Descripción de entrada	7 DAT 50 g de imazamox	7 DAT 100 g de imazamox	7 DAT 200 g de imazamox	7 DAT 160 g de imazapir	7 DAT sin tratar
Restaurador WT x IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-1	8,3	35,0	48,3	16,7	0,0
Restaurador WT x IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-3	11,7	46,7	60,0	35,0	0,0
Restaurador WT-CMS x IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-7	13,3	43,3	56,7	21,7	0,0
Restaurador IMI	A205	homo	restaurador	línea-4	6,7	6,7	18,3	11,7	0,0
Restaurador IMI CMS x IMI	A205	homo	híbrido	híbrido-6	5,0	8,3	26,7	8,3	0,0
Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-8	13,3	13,3	25,0	13,3	0,0
Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-15	10,0	11,7	16,7	8,3	0,0
Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-16	10,0	15,0	23,3	10,0	0,0
Restaurador GM40	A122	homo	restaurador	línea-9	1,7	5,0	10,0	8,3	0,0
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122	homo	híbrido	híbrido-13	3,3	5,0	10,0	5,0	0,0
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122	homo	híbrido	híbrido-14	5,0	6,7	11,7	8,3	0,0
Restaurador IMI CMS x GM40	A205/ A122	hetero / doble	híbrido	híbrido-10	3,3	3,3	10,0	3,3	0,0
Restaurador GM40 CMS x IMI	A205/ A122	hetero / doble	híbrido	híbrido-11	0,0	3,3	11,7	3,3	0,0
Restaurador IMI CMS x GM40	A205/ A122	hetero / doble	híbrido	híbrido-12	10,0	10,0	11,7	5,0	0,0
WT	-	-	Línea B	WT-5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

LSD = 9,64  
Des. Est. = 6,03

CV = 54,70  
Media global = 11,02

5

Tabla 8. Clasificaciones de fitotoxicidad (% de daño de cosecha) registradas 21 días tras el tratamiento (DAT)

Tipo de material	Acontecimiento de mut.	Cigosidad	Producto	Descripción de entrada	21 DAT 50 g de imazamox	21 DAT 100 g de imazamox	21 DAT 200 g de imazamox	21 DAT 160 g de imazapir	21 DAT sin tratar
Restaurador WT IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-1	6,7	25,0	73,3	20,0	0,0
Restaurador WT x IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-3	11,7	46,7	76,7	43,3	0,0
Restaurador WT-CMS x IMI	A205	hetero	híbrido	híbrido-7	3,3	40,0	78,3	36,7	0,0
Restaurador IMI	A205	homo	restaurador	línea-4	5,0	6,7	15,0	6,7	0,0
Restaurador IMI CMS x IMI	A205	homo	híbrido	híbrido-6	0,0	3,3	21,7	3,3	0,0
Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-8	6,7	11,7	28,3	11,7	0,0
Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-15	6,7	11,7	30,0	21,7	0,0

Restaurador WT X GM40	A122	hetero	híbrido	híbrido-16	6,7	16,7	31,7	23,3	0,0
Restaurador GM40	A122	homo	restaurador	línea-9	0,0	0,0	3,3	5,0	0,0
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122	homo	híbrido	híbrido-13	0,0	1,7	3,3	1,7	0,0
Restaurador GM40 CMS x GM40	A122	homo	híbrido	híbrido-14	0,0	3,3	5,0	3,3	0,0
Restaurador IMI CMS x GM40	A205/A122	hetero/doble	híbrido	híbrido-10	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0
Restaurador GM40 CMS x IMI	A205/A122	hetero/doble	híbrido	híbrido-11	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0
Restaurador IMI CMS x GM40	A205/A122	hetero/doble	híbrido	híbrido-12	3,3	3,3	3,3	1,7	0,0
WT	-	-	B línea	WT-5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

LSD = 8,89

Des. Est. = 5,55

CV = 56,78

Media global = 9,78

- 5 EJEMPLO 4: Tolerancia a herbicida de acontecimientos de homocigóticos A122T/A122T o A205V/A205V y heterocigóticos A122T/A205V frente a aplicación foliar de imazapir en estadios vegetativo tardío o reproductivo temprano de desarrollo de planta para el control de orobanca

10 *Orobanche cumana* y *Orobanche cernua* (orobanca) son dos plantas parasitarias que infectan girasoles en muchas zonas de producción del mundo. Ambas especies infectan secuencialmente plantas de girasol desde V6 hasta el estadio de floración (R5). Se ha propuesto usar un herbicida de imidazolinona, tal como imazetapir, para controlar orobanca aplicando el herbicida a plantas de girasol que contienen A205 en el estadio de desarrollo V10 a R1 (documento WO 1999065312). Usando este enfoque, el control de *Orobanche* fue satisfactorio y la fitotoxicidad fue despreciable.

15 Aquí se demostró que la tolerancia de los híbridos A122T/A122T o A122T/A205V es mejor que la tolerancia de plantas homocigóticas A205V cuando se aplica un herbicida de imidazolinona, tal como imazapir, a una tasa de aplicación 2x, durante los estadios de desarrollo reproductivos tempranos (R1). En este informe, se demuestra la utilidad de A122T/A122T y A122T/A205V para el control de *Orobanche* en girasoles.

20 **Materiales**

Las líneas H1, H2 y H3 son tal como se describen en la tabla 9. El híbrido H5 es un F1 que se origina de un cruce entre L3 x R701, y el híbrido H6 es un F1 que se origina de un cruce entre L1 x R701.

25 **Métodos**

30 Se produjeron semillas de cada entrada en condiciones de producción de semillas óptimas en Laguna Blanca (Formosa, Argentina) en 2005. Se llevó a cabo el ensayo en campo en una ubicación en Venado Tuerto (Santa Fe, Argentina) en 2006. Se organizaron las entradas en un diseño de bloque completo aleatorizado que consistía en 3 repeticiones para cada combinación de tratamiento. El factor A era el estadio ontogenético de desarrollo de girasol (V8 y R1) y el factor B era la entrada de girasol. El tamaño de la parcela era de 5 filas x 6 metros, con plantas distribuidas cada 25 cm dentro de cada fila. En el estadio V8 o R1 se aplicó imazapir 160 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v) con un volumen de pulverización de 100 litros/ha usando un pulverizador de mochila.

35 Se evaluaron las clasificaciones de fitotoxicidad a los 14 días y a los 21 días tras la aplicación de herbicida. Se registró la fitotoxicidad como la cantidad de daño en la plata, en la que una clasificación de "0" indicaba ningún daño a las plantas en la parcela con respecto a las parcelas de control sin tratar. Una clasificación de 1 a 15 indicaba un nivel creciente de clorosis en la parcela, en la que "15" indicaba un amarilleamiento generalizado de la parcela. Las clasificaciones de "20" a "49" indicaban un nivel creciente de crecimiento reducido, deformaciones y necrosis. Una de clasificación de "50", indicaba muerte (necrosis completa) de las plantas.

45 Se sometieron los datos a un análisis ANOVA. Se compararon las medias de cada entrada usando la prueba de LSD al nivel de probabilidad de 0,01.

**Resultados**



En las tablas 9 y 10 se presenta la puntuación de índice de fitotoxicidad medio (PI) obtenida a los 14 y 21 días tras el tratamiento (DAT).

- 5 Casi todos los híbridos mostraron ligeros síntomas de clorosis cuando se pulverizaron en el estadio V8 de desarrollo de la planta. La única excepción fue el híbrido heterocigótico 122/WT que demostró un amarilleamiento completo a los 14 DAT (tabla 9). Este amarilleamiento desapareció a los 21 DAT (tabla 10). Además, a los 21 DAT, no había ninguna diferencia entre las líneas con respecto a PI (tabla 10).
- 10 Por otro lado, cuando se pulverizaron los híbridos en el estadio R1 de desarrollo de la planta y se evaluaron a los 14 DAT, se reconocieron dos grupos bien definidos de materiales. Un grupo solo mostró síntomas de clorosis (PI menor de 11,7) mientras que el segundo grupo mostró síntomas de clorosis junto con crecimiento reducido y deformación (PI mayor de 35). El primer grupo estaba compuesto por líneas que portaban al menos un alelo A122T (es decir: híbridos A122T/A122T, A122T/A205V y A122/WT) y el segundo grupo consistía en híbridos que portaban el acontecimiento de mutación A205V en los estados tanto homocigótico como heterocigótico (A205V/A205V, A205V/WT). Las diferencias en PI entre ambos grupos fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ; tabla 9). Sin embargo, a los 21 DAT el híbrido A122/WT aumentó su puntuación de PI (desde 11,7 hasta 23,3), mientras que los híbridos A122T/A122T y A122T/A205V disminuyeron sus puntuaciones de PI desde 2,3- 4,3 hasta 1,7-0,7. Las diferencias entre estos dos últimos híbridos y el híbrido A122T/WT fueron altamente significativas a los 21 DAT (tabla 10). Las líneas que contenían A205/A205V y A205V/WT también mostraron puntuaciones de PI muy altas, mostrando muchas plantas síntomas de quemadura de vértice y daño en los puntos de crecimiento (tabla 10).

Conclusión

- 25 Los resultados indican que los híbridos A205V/A205V o A205V/WT no pueden pulverizarse con imazapir tras V8 porque mostraron fitotoxicidad aumentada y daño intenso tras la aplicación. Los híbridos A122T/A122T y A122T/A205V solo mostraron ligeros síntomas de clorosis tras la aplicación de imazapir. Esto confirmó que las plantas de girasol A122T/A122T y A122T/A205V demostraron un mejor nivel de tolerancia a herbicidas de imidazolinona cuando se aplicaban en el estadio R1, que el material A205V/A205V o A205V/WT. En resumen, las
- 30 líneas que contienen el apilamiento A122T/A122T y A122T/A205V pueden usarse para el control de *Orobanche* con imazapir aplicando el herbicida en el estadio R1 (vegetativo tardío o reproductivo temprano) de desarrollo de la planta.

- 35 Tabla 9. Puntuación de índice de fitotoxicidad medio obtenida a los 14 días tras el tratamiento (DAT) con imazapir (160 g de pa/ha) aplicado en dos estadios diferentes de desarrollo de la planta (V8 y R1) para los acontecimientos de mutación A122T y A205V y genotipos heterocigóticos A122/A205, A122/WT y A205/WT. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,01$ .

Evaluación a los 14 DAT						
Genotipo	Alelo(s) de AHASL1	Sin tratamiento	V8		R1	
H2 (L3*L4)	122/122	0	5	ab	2,3	a
H1 (L1*L2)	205/205	0	6	ab	35	b
H3 (L3*L2)	122/205	0	3	a	4,3	a
H5 (L3 x WT)	122/tipo natural	0	15	b	11,7	a
H6 (L1* WT)	205/tipo natural	0	5	ab	40	b

- 40 Valor de LSD ( $p < 0,01$ )= 10,04

Media cuadrática residual =20,0

Media cuadrática del genotipo = 476,22 ( $p < 2,2 e^{-16}$ )

- 45 Tabla 10. Puntuación de índice de toxicidad medio obtenida a los 21 días tras el tratamiento (DAT) con imazapir (160 g de pa/ha) aplicado en dos estadios diferentes de desarrollo de la planta (V8 y R1) para los acontecimientos de mutación A122T y A205V y genotipos heterocigóticos A122/A205, A122/WT y A205/WT. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,01$ .

Evaluación a los 21 DAT						
Genotipo	Alelo(s) de <i>AHASL1</i>	Sin tratamiento	V8		R1	
H2 (L3*L4)	122/122	0	1	a	1,7	a
H1 (L1*L2)	205/205	0	3	a	37,7	bc
H3 (L3*L2)	122/205	0	0	a	0,7	a
H5 (L3 x WT)	122/tipo natural	0	5	a	23,3	b
H6 (L1* WT)	205/tipo natural	0	5	a	48,3	c

Valor de LSD ( $p < 0,01$ )= 16,39

5 Media cuadrática residual = 53,3

Media cuadrática del genotipo = 806,33 ( $p < 2,2 e^{-16}$ )

10 EJEMPLO 5: Respuesta de acontecimientos de homocigóticos A122T/A122T o P197L/P197L y heterocigóticos A122T/P197L frente a un herbicida de sulfonilurea a nivel de planta completa

15 La resistencia a sulfonilureas en girasol se descubrió en poblaciones silvestres de *Helianthus* de Kansas (EE. UU.), (Al-Khatib *et al.* (1998) *Weed Sci.* 46:403-407). El gen para la resistencia (Ar-kan) se introgresionó a partir de una población silvestre para dar líneas consanguíneas de élite con el propósito de desarrollar y desplegar variedades e híbridos resistentes a herbicidas (Al-Khatib y Miller (2000) *Crop Sci.* 40:869; Miller y Al-Khatib (2002) 42:988-989; Miller y Al-Khatib (2004) *Crop Sci.* 44:1037-1038). Se ha demostrado que *AHASL1* a partir de genotipos resistentes a sulfonilurea alberga una mutación de C a T en el codón 197 que conduce a un cambio de Pro a Leu en esta posición (Kolkman *et al.* (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159).

20 Metsulfuron-metil (2-E[C[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazil-2-il)aminocarbonil]amino]sulfonil]benzoato] de metilo) es un herbicida de sulfonilurea registrado para su uso en trigo y cebada y en tierras no agrícolas tales como tierras de derecho de paso (EPA Pesticide Fact Sheet Metsulfuron methyl (1986) Collection of pesticide chemistry, US Government Printing Office 461-221/24041).

25 El objetivo de este estudio era cuantificar y contrastar la sensibilidad a metsulfuron de híbridos de girasol que portaban las mutaciones A122T y P197L en estados homocigóticos (A122T/A122T o P197L/ P197L) y heterocigóticos (A122T/P197L) a nivel de planta completa en condiciones de invernadero.

#### 30 Materiales

35 Se emplearon los siguientes materiales: B770, GM1606, GM40, L4, cms GM40 x L4, cms GM40 x BTSu-R1 y BTSu-R1. B770 es una línea de girasol sensible que se usó como fuente parental para la línea de mutagénesis GM1606. GM1606 es homocigótica para la mutación A122T, y GM1606 y B770 son isolíneas que solo difieren en el locus de *AHASL1*. GM40, L4 y cmsGM40 x L4 se describieron anteriormente. BTSu-R1 es una línea restauradora desarrollada en el laboratorio mediante selección de pedigrí a partir de la población compuesta SURES-2, que se publicó por Miller y Al-Khatib (2004) *Crop Sci.* 44:1037-1038.

#### Métodos

40 Se plantaron semillas en placas de Petri y, tras germinación, se trasplantaron las plántulas a macetas de 10 cm que contenían medio de siembra en macetas que consistía en partes iguales de vermiculita, tierra y arena. Se hicieron crecer las plantas en el invernadero en condiciones de luz natural complementada con lámparas de haluro de sodio de 400 W para proporcionar una duración de día de 16 h. Las temperaturas día/noche fueron de 25 °C y 20 °C, respectivamente. En el estadio V2-V4 (Schneiter & Miller, 1981) se asignaron aleatoriamente 20 plantas de cada genotipo a cada tratamiento que consistía en tres dosis de metsulfuron-metilo (0 o sin tratamiento, 5 g de pa/ha o una tasa de 1x, y 10 g de pa/ha o una tasa de 2x). También se llevó a cabo una determinación de la biomasa a tiempo cero. Se organizó el experimento como un diseño de bloque completo aleatorizado (RCBD) con una disposición factorial completa de tratamientos y 20 repeticiones (línea de girasol x tratamiento).

Para la determinación de peso seco a tiempo cero, se cortaron diez plantas de cada genotipo en el nodo cotiledóneo en el día de aplicación de herbicida y se secaron a 60 °C durante 48 h. El resto de las plantas se mantuvieron durante 14 días tras el tratamiento con herbicida (DAT) y se registraron su altura, índice de fitotoxicidad (PI) y biomasa seca por encima del suelo. Se determinó la altura como la distancia entre el nodo cotiledóneo y el vértice de cada planta. Se convirtieron los datos de biomasa por encima del suelo de cada línea en acumulación de biomasa tras la aplicación restando la biomasa a tiempo cero promedio apropiada de cada muestra. Se convirtieron la altura y la biomasa seca en un porcentaje de control sin tratar dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos. PI es una escala fenotípica de desde 0 hasta 9 que evalúa la fitotoxicidad para cada planta mediante inspección visual. Las plantas sin ningún síntoma se registraron como "0". Niveles crecientes de crecimiento reducido y clorosis con respecto a las plantas de control sin tratar se registraron en el intervalo de "1" a "4". Niveles crecientes de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas se registraron en el intervalo de "5" a "8". Las plantas muertas con necrosis total del vértice se registraron como "9".

Se sometieron los datos a un ANOVA y se compararon las medias mediante una prueba de LSD.

### Resultados

La altura, acumulación de materia seca y PI de las plantas de tipo natural y homocigóticas A122T/A122T reflejaron la gran sensibilidad de girasol convencional y el acontecimiento mutante A122T a sulfonilureas a ambas tasas de aplicación (tabla 11). En cambio, el acontecimiento de mutación P197L presentó un mayor nivel de tolerancia, con casi el 80 % de la altura de los controles sin tratar a ambas tasas de herbicida. Asimismo, la acumulación de materia seca para este acontecimiento fue del 88 % y el 77 % a tasas de metsulfuron de 1x y 2x, respectivamente. Finalmente, el PI de la línea homocigótica P197L/P197L fue de 0 y 0,1 a ambas tasas de herbicida, reflejando que las plantas no tenían prácticamente ningún síntoma fitotóxico (tabla 11).

El híbrido apilado A122T/P197L mostró el mismo patrón de tolerancia que la línea homocigótica P197 y presentó un mejor rendimiento que todos los materiales homocigóticos A122T para todas las variables analizadas (tabla 11). Para ilustrar esto, la línea A122T/P197L, cuando se trató con metsulfuron 1x, mostró el mismo PI y reducción de la altura que la línea resistente homocigótica P197L. A una tasa de metsulfuron de 2x, A122T/P197L demostró la misma acumulación de materia seca que la línea homocigótica P197L. El híbrido heterocigótico P197L/A122T se diferenciaba significativamente de la línea resistente P197L para los siguientes parámetros: DMA a 1x (74,4 frente a 88,1, respectivamente), PH (el 62 frente al 80,9 %) y PI a 2x (1 frente a 0,1). Sin embargo, la magnitud de estas diferencias era muy baja en comparación con las diferencias observadas entre el material heterocigótico A122T/P197L heterocigótica material y todas las líneas homocigóticas A122T y de tipo natural.

### Conclusión

Basándose en estos resultados, el material heterocigótico doble A122T/P197L demostró una resistencia a metsulfuron mayor que los materiales homocigótico A122T/A122T y de tipo natural, y casi el mismo nivel de tolerancia que la línea homocigótica P197L/P197L.

Tabla 11. Reducción de la altura media (PH), acumulación de materia seca (DMA) e índice de fitotoxicidad (PI) de materiales homocigóticos A122T/A122T, P197L/P197L, heterocigótico P197L/A122T y de tipo natural tras la aplicación foliar de dos tasas de metsulfuron.

Material genético	Genotipo de AHAS	Tasa de metsulfuron					
		1X (5 g de pa/ha)			2X (10 g de pa/ha)		
		PH	DMA	PI	PH	DMA	PI
B770	WT	21,73 <sup>ab*</sup>	28,43 <sup>b</sup>	8,50 <sup>bc</sup>	18,20 <sup>a</sup>	28,77 <sup>b</sup>	9,00 <sup>d</sup>
GM1606	A122T/A122T	21,55 <sup>a</sup>	30,39 <sup>b</sup>	8,70 <sup>d</sup>	21,70 <sup>a</sup>	20,45 <sup>a</sup>	9,00 <sup>d</sup>
GM40	A122T/A122T	21,39 <sup>a</sup>	25,73 <sup>ab</sup>	9,00 <sup>d</sup>	21,17 <sup>a</sup>	20,69 <sup>a</sup>	9,00 <sup>d</sup>
L4	A122T/A122T	19,47 <sup>a</sup>	25,40 <sup>ab</sup>	8,25 <sup>b</sup>	18,73 <sup>a</sup>	18,80 <sup>a</sup>	8,5 <sup>c</sup>
cmsGM40xL4	A122T/A122T	22,45 <sup>a</sup>	19,90 <sup>a</sup>	8,67 <sup>d</sup>	20,56 <sup>a</sup>	18,23 <sup>a</sup>	8,82 <sup>cd</sup>
cmsGM40 x BTSu- RI	A122T/P197L	77,04 <sup>b</sup>	74,36 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>	61,99 <sup>b</sup>	72,66 <sup>c</sup>	1,00 <sup>b</sup>
BTSu-RI	P197L/P197L	79,01 <sup>b</sup>	88,10 <sup>d</sup>	0,00 <sup>a</sup>	80,85 <sup>c</sup>	76,69 <sup>c</sup>	0,10 <sup>a</sup>
Valor de LSD (p < 0,01)		4,87	8,29	0,33	5,45	6,97	0,38
MS residual		20,00	58,00	0,09	25,00	41,00	0,12
MS de genotipo		754,3***	257,90***	3908,9***	528,28***	339,05***	2680***

\* Letras diferentes indican diferencias significativas a un nivel de probabilidad de  $p < 0,01$ .

EJEMPLO 6: Marcadores de PCR de diagnóstico para los alelos de resistencia a herbicidas del locus de AHASL1 en

girasol

Se proporciona un ensayo de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) para el genotipado de alto rendimiento de plantas de girasol que portan la mutación de girasol de AHASL1 descrita anteriormente en el presente documento y en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º. 60/695 952, presentada el 1 de julio de 2005. El ensayo permite (1) la detección de individuos que portan la mutación A122T, (2) la determinación de cigosidad de la mutación A122T en estos individuos, y (3) en el caso de heterocigosis, la detección tanto de la mutación A122T junto con otro(s) alelo(s) resistente(s) de AHAS apilado(s) (A205V o P197L) que está(n) presente(s) en la planta.

1) Cebadores de PCR y condiciones de amplificación

Se desarrollaron cebadores de PCR basándose en las secuencias de ADN divulgadas en el presente documento y en la solicitud de patente anteriormente mencionada. El nombre y las secuencias de estos cebadores son los siguientes:

Cebador conservado directo

p-AHAS NIDF 5'-TGT TCT CTC CGA CTC TAA A-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador "de tipo natural" inverso

AHAS 122 TWT 5'-TGG TGG ATC TCC ATT GAG TC-3' (SEQ ID NO: 4)

Cebador "mutante" inverso

AHAS 122 TMU 5'-TGG TGG ATC TCC ATT GAG TT-3' (SEQ ID NO: 5)

La mezcla de reacción fue la siguiente: 1 U de ADN polimerasa Taq (Biotools, 10.047), 70 ng de ADN de girasol genómico, 25 microgramos de BSA, y tiene una concentración final de 100 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada cebador p-AHAS NIDF / AHAS122TWT o p-AHAS NIDF / AHAS 122 TMU, Tris-HCl 90 mM pH8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM.

El programa de PCR consiste en una etapa de desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 min, seguido por 45 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, seguido por una etapa de elongación final a 72 °C durante 10 min.

2) Detección de plantas que portan la mutación A122T y su cigosidad

Con el fin de detectar los individuos que portan la mutación descrita, se usó la combinación de cebadores p-AHAS NIDF / AHAS 122 TMU. Los individuos que tenían al menos una copia (es decir, individuos homo y heterocigóticos) del alelo A122T produjeron un fragmento de 195 pb. Los individuos de tipo natural o individuos que tenían cualquier otro haplotipo para AHASL1 no produjeron ningún fragmento con esta combinación de cebadores (véase la figura 6 y la tabla 12). En conclusión, esta combinación de cebadores es diagnóstico para la mutación A122T.

La combinación de cebadores p-AHAS NIDF / AHAS 122 TWT se usó para (a) confirmar la especificidad del resultado anterior, porque el alelo A122T no debía producir un producto de amplificación con esta combinación de cebadores, y (b) determinar cuál es el otro alelo presente en cada planta (si es diferente de A122T) (véase la figura 7 y la tabla 12).

Cuando se usó la combinación de cebadores p-AHAS NIDF/AHAS 122 TWT, individuos de tipo natural, mutantes A205V y P197L produjeron un fragmento específico (tabla 12); mientras que homocigotos A122T no produjeron ningún producto de amplificación.

Los productos amplificados en 1) se resuelven en un gel de agarosa al 4 % (agarosa Metaphor).

En la tabla 12 se proporciona el tamaño esperado de productos de PCR de diversos haplotipos de girasol (Hap) en el gen AHASL1. En la figura 8 se proporciona un alineamiento de las secuencias de Hap1-Hap6 e incluye la ubicación de sitios de hibridación de los cebadores p-AHAS NIDF, AHAS122TWT y AHAS 122 TMU descritos anteriormente así como el sitio de la mutación A122T y la región (ACC)<sub>n</sub>, lo que da lugar a las diferencias de tamaño de los productos de PCR entre los diversos haplotipos.

Tabla 12. Tamaños esperados de productos de amplificación obtenidos con el par de cebadores p-AHAS NIDF/AHAS122TWT y p-AHAS NIDF/AHAS 122 TMU.

Haplotipo <sup>1,2</sup>	Fragmentos obtenidos	Fragmentos obtenidos
	p-AHAS NIDF /	p-AHAS NIDF / AHAS

		AHAS122TWT	122 TMU
<u>Homocigotos</u>			
Hap 6 (A122T)	CLHaPlus	ninguno	195 pb
Hap1	Líneas cultivadas	195 pb	Ninguno
Hap 2	Líneas cultivadas	192 pb	Ninguno
Hap 4	Líneas cultivadas	186 pb	Ninguno
Hap 5 (A205V)	Líneas derivadas de IMISUN	186 pb	Ninguno
Hap 3 (P197L)	Líneas derivadas de SURES	204 pb	Ninguno
<u>Heterocigotos</u>			
Hap6 / Hap1		195 pb	195 pb
Hap6 / Hap2		192 pb	195 pb
Hap6 / Hap4		186 pb	195 pb
Hap6 / Hap 5		186 pb	195 pb
Hap6 / Hap 3		204 pb	195 pb
Hap3 / Hap1		204 / 195 pb	Ninguno
Hap3 / Hap2		204 / 192 pb	Ninguno
Hap3 / Hap5		204 / 186 pb	Ninguno
Hap3 / Hap4		204 / 186 pb	Ninguno
Hap5 / Hap1		186 / 195 pb	Ninguno
Hap5 / Hap2		186 / 192 pb	Ninguno
Hap5 / Hap4		186 / 186 pb	Ninguno

<sup>1</sup> Los haplotipos (Hap) 1 a 5 corresponden a los proporcionados en Kolkman *et al.* (2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159).

5 <sup>2</sup> Tipo de mutación de *AHASL1*, si la hay, indicada entre paréntesis..

EJEMPLO 7: Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo para la detección del alelo A122T de *AHASL1* de girasol

10 Con el fin de facilitar el cultivo de girasol Clearfield, se desarrolló el siguiente ensayo de SNP para la detección del alelo A122T de *AHASL1* de girasol. Las variedades tolerantes a IMI usadas para el desarrollo y la validación del ensayo incluyen numerosas variedades convencionales y tolerantes a herbicida. Este ensayo usa la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (PCR) para detectar y determinar la cigosidad del alelo A122T de *AHASL1* de girasol. Una única ronda de amplificación con cuatro cebadores proporciona los productos necesarios para detectar los tres posibles estados de cigosidad: tipo natural, heterocigótico y mutante (A122T/A122T). Dado que los loci de *AHASL1* y *AHASL2* son idénticos en la región que contiene la mutación, se diseñó un conjunto de cebadores para amplificar específicamente el locus de *AHASL1* (véase a continuación HA122CF y HA122CR). Además, se diseñaron cebadores específicos de alelo para hibridarse con/extender específicamente del nucleótido único "G" a "A" responsable del cambio de codón respectivo de alanina a treonina. El cebador específico de alelo de tipo natural es un cebador inverso. Por tanto, la base terminal es "C" tal como se representa a continuación. Se produce una banda de control de 794 pares de bases formada por HA122CF y HA122CR, independientemente de la(s) base(s) en el sitio de mutación y sirve como control positivo (figura 9).

25 La banda de diagnóstico para la condición de tipo natural, formada por la amplificación de cebadores HA122CF y HA122wt, produce un fragmento de 258 pares de bases (figura 9). Este cebador contiene un apareamiento erróneo deliberado 4 bases en el sentido de 5' de la mutación real que sirve para generar especificidad aumentada para las muestras de tipo natural. La banda de diagnóstico para la condición mutante produce un fragmento de 576 pares de bases (figura 9). Se forma un producto de 576 pares de bases a partir de la amplificación de HA122mut y HA122CR e indica la presencia del alelo mutante. El cebador específico de mutante contiene un apareamiento erróneo deliberado 3 bases en el sentido de 5' de la mutación actual que sirve para generar especificidad aumentada para las muestras mutantes. Por tanto, una muestra que es heterocigótica para la mutación producirá tres bandas con la visualización por electroforesis en gel de agarosa, la banda de control y ambas bandas de diagnóstico. Una muestra homocigótica mostrará dos bandas. El patrón en gel depende de la asignación de nucleótido en el codón 122. A continuación se proporcionan los cebadores de PCR.

35 Cebador directo común (HA122CF):

5'GTTTCGCATTACCCATCACT3' (SEQ ID NO: 15)

40 Cebador específico de tipo natural (HA122wt):

5'GGTGGATCTCCATTAACGC3' (SEQ ID NO: 16)

Cebadores específicos de mutante (HA122mut):

5

5' GCCTACCCCGGCTGCA3' (SEQ ID NO: 17)

Cebador inverso común (HA122CR):

10

5' CAAAACCGGCCTCTTCGC3' (SEQ ID NO: 18)

EJEMPLO 8: Líneas de girasol resistentes a imidazolinona de alto contenido en ácido oleico que expresan el rasgo A122T

15 Se produjeron plantas de girasol que expresaban el alelo mutante A122T de *AHASL1* (también conocido como el rasgo CLHA-plus), que confiere altos niveles de resistencia a herbicidas de imidazolinona en una planta de girasol, y que producían semillas que comprenden un aceite de semilla extraíble que comprende al menos el 85 % de ácido oleico. Se obtuvieron estas plantas de girasol mediante metodologías de cultivo convencionales, a través de cruce de una línea resistente a IMI derivada de GM40 con una línea (VB141) de alto contenido en ácido oleico (HO) y seleccionando ambos rasgos en generaciones F2 y posteriores de endogamia usando marcadores moleculares. GM40 y otra línea de girasol que comprende al menos una copia del alelo mutante A122T de *AHASL1*, GM1606, se describieron anteriormente y en el documento WO 2007005581. Se han depositado semillas de GM40 y GM1606 en la ATCC y se les han asignado los números de depósito para patente de ATCC PTA-6716 y PTA-7606, respectivamente.

20

25 **Materiales**

Las líneas BTI-OL-M1511, BTI-OL-M1709 y BTI-OL-2201 son tres líneas de girasol experimentales seleccionadas por su alto contenido en ácido oleico y su tolerancia a imidazolinonas. VB141, HA445 y OB712 son líneas de alto contenido en ácido oleico, B770 y BTK112 son dos líneas convencionales, y GM40 es una línea convencional A122T.

30

**Métodos**

35 Composición de ácidos grasos de las semillas: todas las plantas se hicieron crecer en condiciones de campo en Laguna Blanca (Formosa, Argentina) siguiendo un diseño en bloque aleatorizado completo con 3 repeticiones. Se usaron diez gramos de semillas de cada repetición para el análisis. Se determinó la composición de ácidos grasos de cada muestra mediante cromatografía de gases siguiendo procedimientos convencionales. En la tabla 16 se proporcionan los valores medios a lo largo de las 3 repeticiones para cada material.

40

Tolerancia a imidazolinonas: Se sembraron semillas de las nueve líneas en macetas en condiciones de invernadero. Se pulverizaron al menos 20 plántulas de cada línea en el estadio V4 (Schneiter y Miller, 1981) con imazapir a una dosis de 160 g/ha. Catorce días tras el tratamiento se puntuó cada planta desde el punto de vista fenotípico, usando un índice de fitotoxicidad (PI). PI es una escala fenotípica de desde 0 hasta 9 que se evaluó para cada planta por visual inspección. Las plantas sin ningún síntoma se registraron como "0", niveles crecientes de crecimiento reducido y amarilleamiento con respecto a las plantas de control sin tratar se registraron como de "1" a "4", niveles crecientes de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas se registraron desde "5" hasta "8", las plantas muertas con necrosis total del vértice se registraron como "9".

45

50 **Resultados**

Las líneas de alto contenido en ácido oleico mostraron un intervalo de contenido en ácido oleico en las semillas de desde el 85,79 hasta el 88,97 %, los materiales convencionales, por otro lado, mostraron un contenido mucho menor (intervalo: del 18,62 al 24,2 %). Las líneas BTI-OL-M1511, BTI-OL-M1709 y BTI-OL-2201 mostraron una concentración de ácido oleico en las semillas de desde 89,58 hasta 90,83, similar a la obtenida para las líneas HO (tabla 16).

55

El tratamiento con herbicida mató a las líneas HA445, VB141, OB712, B770 y BTK112, mientras que las líneas BTIOL-M1511, BTI-OL-M1709 y BTI-OL-2201 mostraron un nivel de resistencia similar al observado en la línea GM40 resistente (tabla 17).

60

En conclusión, las líneas BTI-OL-M1511, BTI-OL-M1709 y BTI-OL-2201 combinan un alto nivel de resistencia a imidazolinonas y un alto nivel de ácido oleico en sus semillas.

65 Tabla 16. Composición de ácidos grasos de semillas de 9 líneas de girasol (cada valor es la media de 3 repeticiones).

Perfil de aceite	Líneas								
	BTI-OL-M1511	BTI-OL-M1709	BTI-OL-2201	VB141	HA445	OB712	GM40	B770	BTK112
Ácido mirístico (C14:0)	0,018	0,023	0,02	0,014	0,01	0,02	0,09	0,08	0,1
Ácido palmítico (C16:0)	3,58	3,77	4,75	3,55	3,49	3,7	6,47	6,04	6,73
Ácido esteárico (C18:0)	1,13	1,68	0,18	1,82	3,2	1,85	4,71	4,71	4,48
Ácido oleico (C18:1)	90,83	89,58	89,81	88,97	85,79	87,58	21,24	24,2	18,62
Ácido linoleico (C18:2)	2,86	3,07	3,65	3,91	5,63	5,15	65,85	63,41	68,25
Ácido linolénico (C18:3)	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,21	0,16	0,16	0,16
Ácido araquídico (C20:0)	0,09	0,14	0,09	0,2	0,21	0,17	0,21	0,26	0,23
Ácido gadoleico (C20:1)	0,24	0,31	0,33	0,26	0,17	0,24	0,04	0,1	0,07
Ácido behénico (C22:0)	0,76	0,88	0,72	0,78	1,13	0,82	0,96	0,85	0,9
Ácido lignocérico (C24:0)	0,24	0,3	0,28	0,3	0,25	0,28	0,19	0,18	0,27
Suma	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	99,8

Tabla 17. Índice de fitotoxicidad medio de 9 líneas de girasol (cada valor es la media de 20 repeticiones).

	Líneas								
	BTI-OL-M1511	BTI-OL-M1709	BTI-OL-2201	VB141	HA445	OB712	GM40	B770	BTK112
Índice de fitotoxicidad									
PI	0,5	0,2	0,2	8,5	8,8	9	0,2	8,7	9

5 EJEMPLO 9: Evaluaciones en campo y evaluaciones de actividad AHAS para los acontecimientos A122T/A122T, A205V/A205V y A122T/A205V

10 Se llevaron a cabo evaluaciones en campo a través de varias ubicaciones para determinar los niveles de tolerancia a imidazolinona relativos de plantas de girasol que son A122T/A122T, A122T/A205V o A205V/A205V para el gen *AHASL1*. Se expusieron plantas de girasol de cada uno de los diferentes genotipos a diferentes dosis de imazamox e imazapir en un intervalo de condiciones medioambientales. Además, se determinó la actividad AHAS *in vitro* en presencia de niveles crecientes de herbicidas para plantas de girasol de cada de los tres genotipos de girasol.

15 **Materiales y métodos**

Se sometió una línea de girasol, BTK47, seleccionada específicamente por la ausencia de un factor E (*imr1 imr1 / imr2 imr2*) a mutagénesis de semilla EMS. Se seleccionó una línea M<sub>2:4</sub> que sobrevivió a la selección en campo de imazapir, para un posterior cruce y estudios de actividad enzimática. Esta línea se denominó GM40.

20 *Evaluación en campo del rasgo A122T*

25 Se introgresionó el alelo mutante A122T en diferentes líneas mantenedoras, restauradoras y endogámicas estériles. Se cruzaron líneas endogámicas homocigóticas A122T con líneas endogámicas de tipo natural (WT) (no contenían mutación de tolerancia a herbicida), líneas endogámicas homocigóticas A122T o líneas endogámicas homocigóticas A205V para producir diferentes combinaciones de cigosidad de alelo mutante de F1 (tabla 18). Se sometieron a prueba en campo estas entradas, junto con varios controles de variedad comercial A205V CLEARFIELD® adaptados regionalmente, para determinar la tolerancia a imidazolinona en numerosas ubicaciones en Norteamérica, Sudamérica y Europa desde 2005 hasta 2008 (tabla 19).

30 Tabla 18. Lista de entrada para evaluaciones en campo de tolerancia a herbicida (2007)

Entrada	Descripción de línea	Cigosidad del alelo de <i>AHASL1</i>
1	GM40	homocigótica A122T
2	cmsGM40 x R733	homocigótica A122T

3	cmsBTK47 x R731	heterocigótica A122T
4	IA9 x R733	A22T/A205V
5	IA9 x RHA426	homocigótica A205V
6	B7imi (IMISUN1)	homocigótica A205V
7	cmsB7 x RHA426	homocigótica A205V
8	B7	WT

Tabla 19. Lista de ubicaciones para evaluaciones en campo de tolerancia a herbicida (2005-2007)

Año	País	Ubicación del pueblo, estado o provincia más cercano
2005	EE. UU.	Velva, Dakota del Norte
2005/2006	Argentina (AR)	Venado Tuerto, Santa Fe
2006	EE. UU.	Velva, Dakota del Norte
2006/2007	Argentina	Venado Tuerto, Santa Fe
2006/2007	Argentina	Balcarce, Buenos Aires
2007	Argentina	Laguna Blanca, Formosa
2007	EE. UU.	Velva, Dakota del Norte
2007	EE. UU.	Hickson, Dakota del Norte
2007	Francia (FR)	Angers
2007	Francia	Saintes
2007/2008	Argentina	Venado Tuerto, Santa Fe
2007/2008	Argentina	San Jerónimo, Santa Fe
2007/2008	Argentina	Balcarce, Buenos Aires

- 5 Se organizaron las entradas en cada ubicación en 2007 y 2007/2008 en un diseño de parcelas subdivididas de dos factores aleatorizado que consistía en 3 repeticiones para cada combinación de tratamiento. El factor A fue el tratamiento con herbicida (tabla 20) y el factor B fue la entrada de girasol (tabla 18). El tamaño de parcela era de 2 filas x 7 m y la tasa de siembra era compatible con las prácticas agrícolas locales. Se aplicó el tratamiento con herbicida en el estadio de hoja 2-4 con una pluma montada en tractor (20 galones/acre o 200 litros/ha). El
- 10 tratamiento 2 solo se aplicó en 2 ubicaciones en Francia.

Tabla 20. Lista de tratamiento con imidazolinona para evaluaciones en campo de tolerancia a herbicida (2007)

Número de tratamiento	Tratamiento con herbicida	Formulación de producto herbicida
1	Sin tratar	
2	imazamox 50 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)*	Beyond 120 g/l LC
3	imazamox 100 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)*	Beyond 120 g/l LC
4	imazamox 200 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)*	Beyond 120 g/l LC
5	imazapir 160 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)*	Arsenal 240 g de pa/l
6	imazapir 320 g de pa/ha + NIS al 0,25 % (v/v)*	Arsenal 240 g de pa/l

- 15 \* NIS = tensioactivo no iónico = Induce 90SC (90 %)

20 Se evaluaron las clasificaciones del daño de cosecha (% de fitotoxicidad) 6 - 10 días tras el tratamiento y 16-21 días tras el tratamiento. Se registró el porcentaje de fitotoxicidad como la cantidad promedio del daño en la plata en una parcela dada, en la que una clasificación del "0 %" indicaba ningún daño en las plantas con respecto a la parcela sin tratar. Una clasificación del 10 % al 40 % indicaba niveles crecientes de clorosis (en la que 40 será amarilleamiento completo de las hojas). Una clasificación del 50 % o mayor indicaba que las plantas mostraban amarilleamiento completo así como niveles crecientes de necrosis en las hojas. Una clasificación del "100 %" indicaba necrosis completa (muerte) de las plantas.

25 También se evaluaron la emergencia, días hasta el florecimiento, días hasta el final del florecimiento, y madurez para cada parcela en cada ubicación (los datos no se muestran). Se sometieron los datos a un análisis ANOVA.

#### Ensayo enzimático para determinar la actividad AHAS

30 Se agruparon doce plantas de girasol que habían crecido en invernadero de cada una de las líneas representadas en la tabla 21 y se sometieron a un ensayo de actividad enzimática AHAS mediante el método de Singh *et al.* (1988) Anal. Biochem. 171:173-179. Cada ensayo de actividad se repitió dos veces. Debido al gran número de



muestras, se dividió el experimento en dos conjuntos (tabla 21).

Tabla 21. Descripciones de línea y cigosidades del alelo de mutación de *AHSAL1* correspondientes

Conjunto	Descripción de línea	Cigosidad del alelo de <i>AHSAL1</i>
1	cmsGM40 x R733	homocigótica A122T
1	IA9 x R733	heterocigótica A122T/A205V
1	IA9 x RHA426	homocigótica A205V
1	B7	WT
2	GM40	homocigótica A122T
2	cmsBTK47 x R731	heterocigótica A122T
2	B7imi (IMISUN1)	homocigótica A205V
2	cmsB7 x RHA426	heterocigótica A205V
2	B7	WT

5

Se trituraron hojas jóvenes que crecían activamente de plántulas de cuatro semanas en un mortero con mano de almirez con N<sub>2</sub> líquido y se extrajeron con un tampón compuesto por piruvato 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, fosfato de tiamina 2 mM y dinucleótido de adenina y flavina 20 μM. Después se centrifugaron los extractos de planta a través de una columna de centrifugación de desalinización Zeba TM de 10 ml (Pierce n.º. 89893) según las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo el ensayo de inhibición tal como se describe por Singh *et al.* (1988) Anal. Biochem. 171:173-179. Se llevaron a cabo los ensayos en un formato de 96 pocillos. Se añadieron cincuenta μl de inhibidor a cada pocillo que contenía 50 μl de extracto de proteína soluble para dar concentraciones finales de imazamox de 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μM o imazapir de 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μM. Se incluyeron también controles sin herbicida para cada línea. Se procesaron las reacciones tal como se expone por Singh *et al.* (1988) Anal. Biochem. 171:173-179. Se midió la absorbancia a 530 nm. La actividad AHAS, expresada como la media de los valores de absorbancia para cada tratamiento, se presentó como un porcentaje de la media de los controles sin herbicida.

10

15

#### Resultados y discusión

20

En cultivos tolerantes a herbicida, el fenotipo de daño de cosecha puede atribuirse a la interacción entre el genotipo y el entorno (GxE). El componente del entorno para tolerancia a herbicida es una suma de factores abióticos (es decir clima, tierra) y bióticos (es decir insecto, enfermedad y presión de malas hierbas) junto con el efecto de la dosis de herbicida. En la figura 10 se observa un ejemplo de este efecto del entorno, en la que se demuestra la variación en la fitotoxicidad del mismo genotipo que se hace crecer en cuatro ubicaciones diferentes (Velva, ND, EE. UU.; Angers, FR; Saintes FR; Formosa, AR) a la misma tasa de dosis (imazamox 200 g de pa/ha). El factor de genotipo en una planta tolerante a herbicida (HT) es la suma del/de los gen(es) de HT más el contexto genético restante, y la interacción entre los dos.

25

Se usaron dos enfoques para evaluar genes de HT para determinar su nivel de tolerancia relativa. El primer enfoque midió la lesión por herbicida en un intervalo de rigurosidades del entorno (ubicaciones y años en combinación con diferentes dosis de herbicida) y el segundo enfoque sometió a prueba la enzima diana (*in vitro*) con niveles crecientes de herbicida. Usando el primer enfoque se cuantificó el factor del entorno asociado con este rasgo, calculando el índice de fitotoxicidad (PI) medio de controles A205V, regionalmente adaptados, comerciales actuales a los 6-10 días tras el tratamiento con herbicida. Se representaron gráficamente los valores de PI para diferentes híbridos que portaban la mutación A122T frente a los valores de PI medios de los controles A205V para evaluar el nivel de resistencia relativo de la nueva mutación a través de un intervalo de componentes del entorno (figuras 11 y 12). Tal como puede observarse en el eje x de las figuras 11 y 12, la combinación de ubicaciones con dosis de herbicida produjo una serie diversa de condiciones del entorno, cuyos valores de PI medios oscilaron entre 5,9 y 78 para los tratamientos con imazamox; y entre 2 y 100 para los tratamientos con imazapir. La línea y=x representaba el valor de PI medio para los controles A205V a través de todos los componentes del entorno.

35

40

Los resultados obtenidos tras los tratamientos con imazamox se muestran en la figura 11. Los híbridos homocigóticos A122T mostraron un aumento del PI a medida que el componente del entorno se volvió más intenso. Sin embargo, la pendiente de la línea de regresión ( $b = 0,149 \pm 0,0667$ ,  $p < 0,0375$ ) indicó que el nivel de daño de cosecha como función de la rigurosidad del entorno aumentó a una tasa menor que los controles A205V. Los híbridos que combinaban la mutación A122T con el alelo A205V en un estado heterocigótico mostraron una respuesta a la rigurosidad del entorno ( $b = 0,39 \pm 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ) similar a los híbridos A122T en un estado homocigótico. Por otro lado, los híbridos que contenían la mutación A122T en un estado heterocigótico (A122T/WT) mostraron clasificaciones de daño de cosecha mayores que los controles A205V a niveles menores de rigurosidad del entorno, como se muestra por el mayor valor de ordenada en el origen ( $a=15,3 \pm 2,67$ ). Cuando se aumentó la intensidad del componente del entorno, estos híbridos heterocigóticos A122T mostraron un mejor rendimiento que los controles A205V, tal como se mostró por la pendiente de su ecuación lineal ( $b=0,45 \pm 0,062$ ,  $p < 0,0001$ ). Lo mismo se aplica para la figura 12 cuando se expusieron las mismas entradas, en los mismos entornos, a imazapir.

50

55

Las intensidades del entorno con tratamiento con imazapir pueden resumirse por las regresiones resumidas en la leyenda para cada genotipo en la figura 12.

5 Para sustanciar el efecto de tolerancia a herbicida observado en el campo, se sometieron las mismas combinaciones de genes de tolerancia a herbicida a estudios de inhibición de enzima AHAS. Se llevaron a cabo estos estudios en el conjunto de 12 individuos de cada entrada en la tabla 18. Se representa la media de dos repeticiones en la figura 13 para el primer experimento (conjunto 1, tabla 21) y en la figura 14 para el segundo experimento (conjunto 2, tabla 21). Se incluyó una muestra de control sin tratar para proporcionar una referencia para actividad enzimática AHAS al 100 %. La actividad AHAS en el híbrido homocigótico A122T tratado con imazamox 100  $\mu$ M fue del 69 % del control sin tratar, y para imazapir 100  $\mu$ M fue del 64 % del control sin tratar (figura 13). La actividad de la enzima AHAS en el híbrido heterocigótico A122T/A205V fue del 59 % y el 60 % para los extractos tratados con imazamox 100  $\mu$ M e imazapir 100  $\mu$ M respectivamente (figura 13). La línea de híbridos homocigóticos A205V, que es el producto A205V comercial actual, demostró actividades AHAS del 36 % del control sin tratar y del 42 % del control sin tratar a imazamox 100  $\mu$ M e imazapir 100  $\mu$ M respectivamente (figura 13), menor que las actividades tanto del híbrido homocigótico A122T como del híbrido heterocigóticos A122T/A205V.

En el segundo conjunto de datos, los híbridos homocigóticos A205V funcionaron de manera casi idéntica a los híbridos heterocigóticos A122T (figura 14). Ambos tipos de híbridos demostraron actividades AHAS del 30 % a imazamox 50  $\mu$ M, mientras que el híbrido A205V tuvo una actividad del 26 % a imazamox 100  $\mu$ M y el híbrido heterocigótico A122T tuvo una actividad del 30 % a imazamox 100  $\mu$ M. En cambio, el extracto de enzima AHAS del híbrido homocigótico A122T demostró la menor cantidad de inhibición con niveles crecientes de imazamox, demostrando actividades del 63 % y el 60 %, con respecto al control sin tratar, a imazamox 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M respectivamente (figura 14). La línea WT (B7) era genotípicamente idéntica en ambos conjuntos de experimentos y demostró una varianza de actividad del 6 % al nivel de imazamox 100  $\mu$ M entre los dos experimentos (actividad AHAS del 17 % con respecto al control sin tratar en el conjunto 1 (figura 13) y una actividad AHAS del 11 % con respecto al control sin tratar en el conjunto 2 (figura 14)).

Basándose en datos en el campo y de actividad enzimática AHAS, se determinó que la mutación A122T nueva proporciona una tolerancia a herbicida superior a imidazolinonas frente a la mutación A205V actual. Los niveles comerciales de resistencia a herbicida en girasoles A205V requieren la combinación de dos factores genéticos en un estado homocigótico debido al moderado nivel de resistencia conferido por *Imr1*. En cambio, usando la mutación A122T sola, ya no se necesita el potenciador *Imr2* (o interacción de gen por genotipo) para conseguir niveles comerciales de tolerancia. Lo más importante, los resultados demuestran que A122T puede usarse o bien como un rasgo de HT de un único gen homocigótico o bien como una pila heterocigótica junto con el rasgo de HT A205V, proporcionando niveles de tolerancia potenciados, mayor flexibilidad en el control de malas hierbas y facilitando el despliegue de esta nueva mutación en el sistema de producción CLEARFIELD.

#### Lista de secuencias

40 <110> Sala, Carlos  
Bulos, Mariano  
Echarte, Mariel  
Singh, Bijay K.  
Weston, Brigitte J.  
45 Whitt, Sherry R.

<120> Plantas de girasol resistentes a herbicidas con múltiples alelos resistentes a herbicidas de *AHASL1* y métodos de uso

50 <130> 038867/339058

<150> Documento US 60/910.041

<151> 04-04-2007

55 <150> US 61/029.737

<151> 19-02-2008

60 <160> 24

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

65

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

10

<400> 1

**ttctccccc gtttcgatt ac 22**

15 <210> 2

<211> 18

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador de PCR

<400> 2

**cgccgccctg ttctgac 18**

30

<210> 3

<211> 18

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Cebador de PCR

<400> 3

**tggtctctcc gactctaa 18**

45

<210> 4

<211> 20

50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 4

60

**tggtggatct ccattgagtc 20**

ES 2 659 991 T3

<210> 5  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 5  
15 **tggtgatct ccattgagtt 20**  
  
<210> 6  
20 <211> 195  
<212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
25 <220>  
<221> misc\_feature  
30 <222> (1)...(195)  
<223> Hap1  
<400> 6  
35 **tgttctctcc gactccaaat ccaccaccac caccaccacc accactcaac gaccgttacc 60**  
**ggtgcagcct tttgtctccc gttacgcgcc agatcaaccg agaaaaggcg cagacgtggt 120**  
**ggtggaagct ctggaacggg aaggtgtcac cgacgtcttc gcttaccctg gcggcgcgtc 180**  
**aatggagatc cacca 195**  
  
<210> 7  
40 <211> 192  
<212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
45 <220>  
<221> misc\_feature  
50 <222> (1)...(192)  
<223> Hap2  
<400> 7  
55 **tgttctctcc gactccaaat ccaccaccac caccaccacc actcaaccac cgttacaggc 60**  
**gcagcctttt gtctcccggg acgcgccaga tcaaccgaga aaaggcgcag acgtgttggt 120**  
**ggaagctctg gaacgggaag gtgtcaccga cgtcttcgcc taccctggcg gcgcgtcaat 180**  
**ggagatccac ca 192**

ES 2 659 991 T3

<210> 8  
<211> 204  
5 <212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)...(204)  
15 <223> Hap3  
<400> 8  
  
tggtctctcc gactccaaat ccaccaccac caccaccacc accaccacca cactcaacc 60  
accgttacag ggcgagcctt ttgtctcccg ttacgcgcct gatcaaccga gaaaaggcgc 120  
  
agacgtgttg gtggaagctc tggaacggga aggtgtcacc gacgtcttcg cctaccccgg 180  
cggcgcgtca atggagatcc acca 204  
20  
  
<210> 9  
<211> 186  
25 <212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)...(186)  
35 <223> Hap4  
<400> 9  
  
tggtctctcc gactccaaat ccaccaccac caccactcaa ccaccgttac aggcgcagcc 60  
tttgtctcc cgttacgcgc cagatcaacc gagaaaaggc gcagacgtgt tgggtggaagc 120  
tctggaacgg gaaggtgtca ccgacgtctt cgcctacccc ggcggcgcgt caatggagat 180  
40 ccacca 186  
  
<210> 10  
<211> 186  
45 <212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
50 <220>  
<221> misc\_feature

ES 2 659 991 T3

<222> (1)...(186)

<223> Hap5

5 <400> 10

```

tgttctctcc gactccaaat ccaccaccac caccactcaa ccaccgttac aggcgcagcc 60
tttgtctccc cgttacgcgc cagatcaacc gagaaaaggc gcagacgtgt tggagggaagc 120
tctagaacgg gaaggtgtca cgcacgtctt cgcctacccc ggcggcgcgt caatggagat 180
ccacca 186

```

<210> 11

10

<211> 195

<212> ADN

15 <213> *Helianthus annuus*

<220>

<221> misc\_feature

20

<222> (1)...(195)

<223> Hap6

25 <400> 11

```

tgttctctcc gactccaaat ccaccaccac caccaccacc accactcaac gaccgttacc 60
ggtgcagcct tttgtctccc gttacgcgcc agatcaaccg agaaaaggcg cagacgtgtt 120
ggtggaagct ctggaacggg aaggtgtcac cgacgtcttc gcctaccccg gcggcacgtc 180
aatggagatc cacca 195

```

<210> 12

30

<211> 19

<212> ADN

35 <213> *Helianthus annuus*

<400> 12

**tgttctctcc gactccaaa 19**

40

<210> 13

<211> 20

45 <212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

<220>

50

<221> alelo

<222> (1)...(20)

55 <223> alelo de tipo natural

<400> 13

**gcgatcaatgg agatccacca** 20

5

<210> 14

<211> 20

10 <212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

<220>

15

<221> alelo

<222> (1)...(10)

20 <223> alelo mutante; posición 1 sitio de SNP

<400> 14

**acgtcaatgg agatccacca** 20

25

<210> 15

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Cebador de PCR HA122CF

<400> 15

**gtttcgcatt acccatcact** 20

40

<210> 16

<211> 19

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Cebador de PCR HA122wt

<400> 16

55

**ggtggatctc cattaacgc** 19

<210> 17

60 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Cebador de PCR HA122mut  
<400> 17  
  
10 **gcctaccccg gctgca 16**  
<210> 18  
<211> 18  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Cebador de PCR HA122CR  
400> 18  
25 **caaaaccggc ctcttcgc 18**  
<210> 19  
30 <211> 1178  
<212> ADN  
<213> *Helianthus annuus*  
35 <220>  
<221> CDS  
40 <222> (3)...(1178)  
<400> 19



ES 2 659 991 T3

tc ttc gcc tac ccc ggc ggc acg tca atg gag atc cac caa gct ctc	47
Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Thr Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu	
1 5 10 15	
acg cgc tca agc act atc cgc aat gtg ctc ccc cgt cac gaa cag ggc	95
Thr Arg Ser Ser Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly	
20 25 30	
ggc gtg ttc gcc gcc gaa ggc tac gcg cgc gcc tcc ggt ctt ccc ggc	143
Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly	
35 40 45	
gtg tgt atc gcc act tcc ggt ccc gga gct acg aac cta gtt agt ggt	191
Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly	
50 55 60	
ctt gct gac gcg ctg tta gac agt gtc ccc atg gtg gca atc acc ggt	239
Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly	
65 70 75	
caa gtt ccc cgg aga atg atc gga acc gat gcg ttt caa gaa acc cca	287
Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro	
80 85 90 95	
att gtt gag gta aca cgt tcg atc act aaa cat aat tat ctt gtg ttg	335
Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu	
100 105 110	
gat gtt gag gat att ccc aga att gtt cgt gag gct ttt tat ctt gcg	383
Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala	
115 120 125	
agt tcg ggt cga ccc ggc ccg gtt ttg ata gat gta ccg aaa gat ata	431
Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile	
130 135 140	
cag caa cag tta gtg gtg ccg aaa tgg gat gaa ccg atg agg tta ccg	479
Gln Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg Leu Pro	
145 150 155	
ggc tat ttg tct aga atg ccg aag cct caa tat gat ggg cat ttg gaa	527
Gly Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His Leu Glu	
160 165 170 175	
cag att gtt agg ttg gtg ggg gaa gcg aag agg ccg gtt ttg tat gtg	575
Gln Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val	
180 185 190	
ggc ggt ggg tgt ttg aat tcg gat gat gag ttg agg ccg ttt gtg gag	623
Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu	

ES 2 659 991 T3

	195		200		205		
	ctt acg ggg att ccg gtt gcg agt act ttg atg ggg ctc gga gcg tac						671
	Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr						
	210		215		220		
	cct gct tcg agt gat ttg tcg ctt cat atg ctt ggg atg cat ggt acg						719
	Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr						
	225		230		235		
	gtt tat gcg aat tat gcg gtt gat aag agt gat ttg ttg ctt gcg ttt						767
	Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe						
	240		245		250		255
	ggg gtg cgg ttt gat gat cgt gtg acg ggg aag ctt gag gcg ttt gct						815
	Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala						
		260		265		270	
	agt agg gcg aag att gtt cat att gat att gat cct gct gaa att ggg						863
	Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly						
		275		280		285	
	aag aat aag cag cct cat gtg tcg att tgt ggt gat att aag gtc gcg						911
	Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala						
		290		295		300	
	tta cag ggt ttg aac aag att ttg gag gaa aag aat tcg gtg act aat						959
	Leu Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val Thr Asn						
		305		310		315	
	ctt gat ttt tcg acc tgg aga aag gaa ttg gat gaa caa aaa atg aag						1007
	Leu Asp Phe Ser Thr Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Met Lys						
		320		325		330	335
	ttc ccg ttg agc ttt aaa acg ttt ggc gaa gcg att cct cca cag tat						1055
	Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr						
		340		345		350	
	gct att caa gtt ctt gat gag tta acg ggc ggg aat gca att att agc						1103
	Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser						
		355		360		365	
	acc ggt gtc ggg caa cat cag atg tgg gct gct cag ttt tac aaa tac						1151
	Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr						
		370		375		380	
	aac aaa cct aga caa tgg ctg acg tcg						1178
	Asn Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser						
		385		390			

<210> 20

5 <211> 392

<212> PRT

<213> *Helianthus annuus*

10

<400> 20

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

ES 2 659 991 T3

<210> 21

<211> 1716

5 <212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)...(1716)

15 <400> 21

```
gca gac gtg ttg gtg gaa gct ctg gaa cgg gaa ggt gtc acc gac gtc 48
Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val
 1                5                10                15

ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac caa gct ctc acg 96
Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr
                20                25                30
```

ES 2 659 991 T3

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

ES 2 659 991 T3

275				280				285								
agg	gcg	aag	att	gtt	cat	att	gat	att	gat	cct	gct	gaa	att	ggg	aag	912
Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	
	290						295					300				
aat	aag	cag	cct	cat	gtg	tcg	att	tgt	ggt	gat	att	aag	gtc	gcg	tta	960
Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	
	305					310				315					320	
cag	ggt	ttg	aac	aag	att	ttg	gag	gaa	aag	aat	tcg	gtg	act	aat	ctt	1008
Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Leu	
				325					330					335		
gat	ttt	tcg	acc	tgg	aga	aag	gaa	ttg	gat	gaa	caa	aaa	atg	aag	ttc	1056
Asp	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Lys	Met	Lys	Phe	
			340					345						350		
ccg	ttg	agc	ttt	aaa	acg	ttt	ggc	gaa	gcg	att	cct	cca	cag	tat	gct	1104
Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	
		355					360					365				
att	caa	gtt	ctt	gat	gag	tta	acg	ggc	ggg	aat	gca	att	att	agc	acc	1152
Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	
	370					375					380					
ggt	gtc	ggg	caa	cat	cag	atg	tgg	gct	gct	cag	ttt	tac	aaa	tac	aac	1200
Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr	Asn	
	385				390					395					400	
aaa	cct	aga	caa	tgg	ctg	acg	tcg	ggc	ggg	cta	ggg	gca	atg	ggt	ttc	1248
Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	
				405					410					415		
ggc	ctg	ccc	gct	gct	atc	ggg	gcg	gcc	gtt	gca	aga	cct	gat	gcg	gta	1296
Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	
			420					425					430			
gta	gtt	gac	atc	gac	ggt	gac	gga	agc	ttt	atg	atg	aat	gtt	caa	gag	1344
Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Met	Met	Asn	Val	Gln	Glu	
		435					440					445				
tta	gcc	aca	atc	cgt	gtt	gaa	aat	ctg	ccg	gtt	aag	att	tta	tta	ctt	1392
Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	
		450				455					460					
aac	aac	cag	cat	ttg	ggt	atg	gtg	gtt	cag	tgg	gag	gat	cgg	ttt	tac	1440
Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	
	465				470					475					480	
aag	gcg	aat	cgg	gct	cat	acc	tac	tta	gga	aac	ccg	tca	aaa	gag	tcg	1488
Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	Ser	
				485				490						495		
gaa	ata	ttc	cct	aac	atg	gtg	aag	ttt	gct	gaa	gcc	tgt	gat	atc	ccg	1536
Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Met	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro	
			500					505					510			
gct	gct	cga	gtg	acc	caa	aag	gcg	gat	cta	cga	gca	gct	att	cag	aag	1584
Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys	
		515					520					525				
atg	ttg	gat	aca	ccc	ggg	cct	tac	ttg	ttg	gat	gtg	att	gtg	ccg	cat	1632

ES 2 659 991 T3

Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His	
530						535					540					
caa	gaa	cac	gtg	ttg	ccc	atg	atc	ccg	gct	ggc	gga	ggt	ttc	tcg	gat	1680
Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp	
545					550					555					560	
gtg	atc	acc	gag	ggt	gat	ggc	aga	acg	aaa	tat	tga					1716
Val	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr	*					
				565					570							

<210> 22

5 <211> 571

<212> PRT

<213> *Helianthus annuus*

10

<400> 22

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



		355					360					365				
Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	
	370					375					380					
Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr	Asn	
385					390					395					400	
Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	
				405					410					415		
Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	
			420					425					430			
Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Met	Met	Asn	Val	Gln	Glu	
		435					440					445				
Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	
	450					455					460					
Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	
465					470					475					480	
Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	Ser	
				485					490					495		
Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Met	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro	
			500					505					510			
Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys	
		515					520					525				
Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His	
	530					535					540					
Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp	
545					550					555					560	
Val	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr						
				565					570							

<210> 23

5 <211> 1716

<212> ADN

<213> *Helianthus annuus*

10

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)...(1716)

<400> 23

ES 2 659 991 T3

gca gac gtg ttg gtg gaa gct cta gaa cgg gaa ggt gtc acc gac gtc	48
Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val	
1 5 10 15	
ttc gcc tac ccc ggc ggc gcg tca atg gag atc cac caa gct ctc acg	96
Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr	
20 25 30	
cgc tca aac acc atc cgc aat gtc ctc ccc cgt cac gaa cag ggc ggc	144
Arg Ser Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly	
35 40 45	
gtg ttc gcc gca gaa ggc tac gca cgc gcc tcc ggt ctt ccc ggc gtg	192
Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val	
50 55 60	
tgt atc gcc act tcc ggt ccc gga gct acg aac cta gtt agt ggt ctt	240
Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
gct gac gcg ttg tta gac agt gtc ccc atg gtg gca atc acc ggt caa	288
Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln	
85 90 95	

ES 2 659 991 T3

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

ES 2 659 991 T3

ccg ttg agc ttt aaa acg ttt ggc gaa gcg att cct cca cag cat gct	1104
Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln His Ala	
355 360 365	
att caa gtt ctt gat gag tta acg ggc ggg aat gca att att agc acc	1152
Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr	
370 375 380	
ggg gtc ggg caa cat cag atg tgg gct gct cag ttt tac aaa tac aac	1200
Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn	
385 390 395 400	
aaa cct aga caa tgg ctg acg tcg ggc ggg cta ggg gca atg ggt ttt	1248
Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe	
405 410 415	
ggg ctg ccc gct gct atc ggg gcg gcc gtt gca aga cct gat gcg gta	1296
Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val	
420 425 430	
gta gtt gac atc gac ggt gac gga agc ttt atg atg aat gtt caa gag	1344
Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met Asn Val Gln Glu	
435 440 445	
tta gcc aca atc cgt gtt gaa aat ctg ccg gtt aag att tta tta ctt	1392
Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu	
450 455 460	
aat aat cag cat ttg ggt atg gtg gtt cag tgg gag gat cgg ttt tac	1440
Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr	
465 470 475 480	
aag gcg aat agg gct cat acc tac tta gga aac ccg tca aaa gag tcg	1488
Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser	
485 490 495	
gaa ata ttc cct aac atg gtg aag ttt gct gaa gcc tgt gat atc ccg	1536
Glu Ile Phe Pro Asn Met Val Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro	
500 505 510	
gct gct cga gtg acc caa aag gcg gat cta cga gca gct att cag aag	1584
Ala Ala Arg Val Thr Gln Lys Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys	
515 520 525	
atg ttg gat aca ccc ggg cct tac ttg ttg gat gtg att gtg ccg cat	1632
Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His	
530 535 540	
caa gaa cac gtg ttg ccc atg atc ccg gct ggc gga ggt ttc tcg gat	1680
Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ala Gly Gly Gly Phe Ser Asp	
545 550 555 560	
gtg atc acc gag ggt gat ggc aga acg aaa tat tga	1716
Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr *	
565 570	

<210> 24

<211> 571

<212> PRT

5 <213> *Helianthus annuus*

<400> 24

Ala Asp Val Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asp Val  
1 5 10 15  
Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr  
20 25 30  
Arg Ser Asn Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly  
35 40 45  
Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val  
50 55 60  
Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu  
65 70 75 80  
Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln  
85 90 95  
Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Val Phe Gln Glu Thr Pro Ile  
100 105 110  
Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp  
115 120 125  
Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Tyr Leu Ala Ser  
130 135 140  
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Ile Gln  
145 150 155 160  
Gln Gln Leu Val Val Pro Lys Trp Asp Glu Pro Met Arg Leu Pro Gly  
165 170 175  
Tyr Leu Ser Arg Met Pro Lys Pro Gln Tyr Asp Gly His Leu Glu Gln  
180 185 190  
Ile Val Arg Leu Val Gly Glu Ala Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly  
195 200 205  
Gly Gly Cys Leu Asn Ser Asp Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu  
210 215 220  
Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ala Tyr Pro  
225 230 235 240  
Ala Ser Ser Asp Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val  
245 250 255  
Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly  
260 265 270  
Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser  
275 280 285  
Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys  
290 295 300  
Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Gly Asp Ile Lys Val Ala Leu  
305 310 315 320  
Gln Gly Leu Asn Lys Ile Leu Glu Glu Lys Asn Ser Val Thr Asn Leu  
325 330 335  
Asp Phe Ser Asn Trp Arg Lys Glu Leu Asp Glu Gln Lys Val Lys Phe  
340 345 350  
Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln His Ala  
355 360 365  
Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Gly Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr  
370 375 380  
Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Lys Tyr Asn  
385 390 395 400  
Lys Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe  
405 410 415  
Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val  
420 425 430  
Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Met Met Asn Val Gln Glu  
435 440 445  
Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu Leu  
450 455 460  
Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr  
465 470 475 480  
Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Glu Ser  
485 490 495

ES 2 659 991 T3

Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Met	Val	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Cys	Asp	Ile	Pro
			500					505					510		
Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys
		515					520					525			
Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Pro	His
	530					535					540				
Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp
545					550					555					560
Val	Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Tyr					
				565					570						

## REIVINDICACIONES

1. Planta de girasol resistente a herbicidas que comprende dos alelos resistentes a herbicidas diferentes de un gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa 1 (*AHASL1*) de girasol en la que un primer alelo codifica una primera proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 7 de SEQ ID NO: 20 y un segundo alelo codifica una segunda proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por valina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 90 de SEQ ID NO: 20 o una sustitución de prolina por leucina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 82 de SEQ ID NO: 20; en la que dicha planta de girasol resistente a herbicidas es resistente a al menos un herbicida inhibidor de AHAS.
2. Planta de girasol según la reivindicación 1, en la que dicho herbicida inhibidor de AHAS es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriazaolinona o mezclas de los mismos.
3. Planta de girasol según la reivindicación 1, en la que dicha planta de girasol es una semilla.
4. Planta de girasol según la reivindicación 1, en la que dicha planta de girasol produce semillas que comprenden un aceite de semilla extraíble que comprende al menos el 85 % de ácido oleico.
5. Método de hacer crecer una planta de girasol al tiempo que se controlan las malas hierbas en las proximidades de dicha planta de girasol, comprendiendo dicho método aplicar una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS a las malas hierbas y a la planta de girasol, en el que dicha planta de girasol se selecciona del grupo que consiste en:
  - (a) una planta de girasol que comprende un primer alelo de un gen *AHASL1* y un segundo alelo de dicho gen *AHASL1*, en el que dicho primer alelo codifica una primera proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 7 de SEQ ID NO: 20 y dicho segundo alelo codifica una segunda proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por valina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 90 de SEQ ID NO: 20; y
  - (b) una planta de girasol que comprende un primer alelo de un gen *AHASL1* y un segundo alelo de dicho gen *AHASL1*, en el que dicho primer alelo codifica una primera proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 7 de SEQ ID NO: 20 y dicho segundo alelo codifica una segunda proteína AHASL1 resistente a herbicidas que comprende una sustitución de prolina por leucina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 82 de SEQ ID NO: 20.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho herbicida inhibidor de AHAS comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriazaolinona o una mezcla de los mismos.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho herbicida de imidazolinona comprende: 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)-quinolin-3-carboxílico, 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, mezclas de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metilo, o mezclas de los mismos.
8. Método según la reivindicación 6, en el que dicho herbicida de sulfonilurea comprende: clorsulfuron, metsulfuron-metilo, sulfometuron-metilo, clorimuron-etilo, tifensulfuron-metilo, tribenuron-metilo, bensulfuron-metilo, nicosulfuron, etametsulfuron-metilo, rimsulfuron, triflurosulfuron-metilo, triasulfuron, primisulfuron-metilo, cinosulfuron, amidosulfuron, flazasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron-etilo, halosulfuron o mezclas de los mismos.
9. Semilla de girasol según la reivindicación 3, en la que dicha semilla se trata con un herbicida inhibidor de AHAS.
10. Semilla según la reivindicación 9, en la que dicho herbicida inhibidor de AHAS comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriazaolinona o una mezcla de los mismos.
11. Método para hacer crecer una planta de girasol resistente a herbicidas según la reivindicación 1 al tiempo que se combate vegetación no deseada que comprende poner en contacto una semilla de girasol antes de



la siembra y/o después de la pregerminación con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de AHAS, en el que dicha semilla de girasol comprende dos alelos resistentes a herbicidas diferentes de un gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa 1 (*AHASL1*) de girasol, en el que un primer alelo codifica una primera proteína *AHASL1* resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por treonina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 7 de SEQ ID NO: 20 y un segundo alelo codifica una segunda proteína *AHASL1* resistente a herbicidas que comprende una sustitución de alanina por valina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 90 de SEQ ID NO: 20 o una sustitución de prolina por leucina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 82 de SEQ ID NO: 20.

- 5
- 10
12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho herbicida inhibidor de AHAS comprende un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de sulfonilamino-carboniltriaolinona o una mezcla de los mismos.
- 15
13. Método según la reivindicación 5, en el que dichas malas hierbas comprenden orobanca.
14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha orobanca se selecciona del grupo que consiste en: *Orobanche cumana* y *Orobanche cernua*.
- 20
15. Método según la reivindicación 13, en el que dicho herbicida de imidazolinona comprende: 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, mezclas de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metilo y 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metilo, o mezclas de los mismos.
- 25
16. Método según la reivindicación 13, en el que dicho herbicida de imidazolinona es imazapir.
- 30
17. Método según la reivindicación 13, en el que dicho herbicida de imidazolinona se aplica en la fase de crecimiento R1.
- 35
18. Método para genotipar una planta de girasol según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una progenie de la misma, o una semilla según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10 que comprende un *AHASL1* de girasol, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) obtener ADN genómico a partir de dicha planta o semilla de girasol;
- (b) usar dicho ADN como molde para una primera amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, un cebador de *AHASL1* directo y un cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso, en el que dicho cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13, en el que el nucleótido que está en el nucleótido del extremo 3' de dicho cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso es el complemento del nucleótido que está en la posición 1 de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13;
- 40
- (c) usar dicho ADN como molde para una segunda amplificación por PCR que comprende dicho ADN, polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, dicho cebador de *AHASL1* directo y un cebador de *AHASL1* inverso mutante, en el que dicho cebador de *AHASL1* mutante inverso se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14, en el que el nucleótido que está en el nucleótido del extremo 3' de dicho cebador de *AHASL1* mutante inverso es el complemento del nucleótido que está en la posición 1 de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14; y
- 45
- (d) detectar los productos de dichas amplificaciones por PCR primera y segunda;
- 50
- en el que dicho cebador de *AHASL1* directo comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a una región del gen *AHASL1* de girasol que está en sentido 5' de la región (ACC)<sub>n</sub>.
- 55
19. Método según la reivindicación 18, en el que dicho cebador de *AHASL1* de tipo natural inverso comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4.
- 60
20. Método según la reivindicación 18, en el que dicho cebador de *AHASL1* mutante inverso comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5.
- 65
21. Método según la reivindicación 18, en el que dicho cebador de *AHASL1* directo se hibrida con una secuencia de nucleótidos que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ

ID NO: 12.

22. Método según la reivindicación 18, en el que dicho cebador de *AHASL1* directo comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

5

FIGURA 1

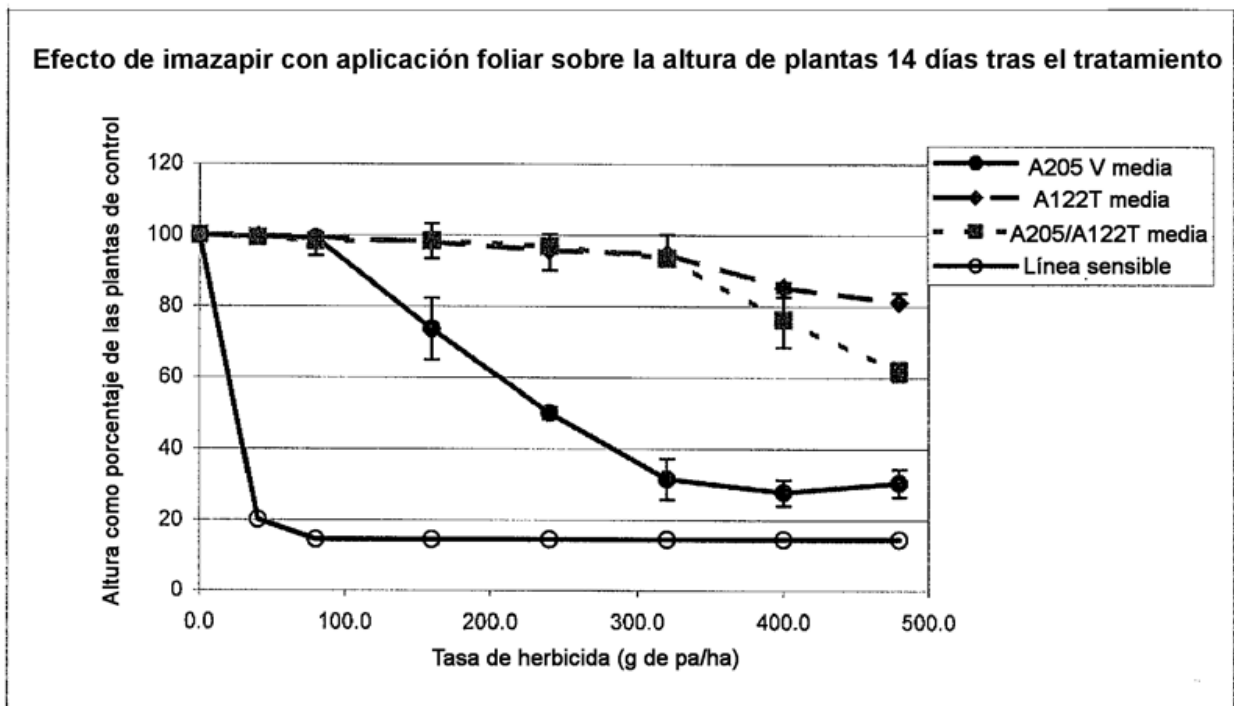


FIGURA 2

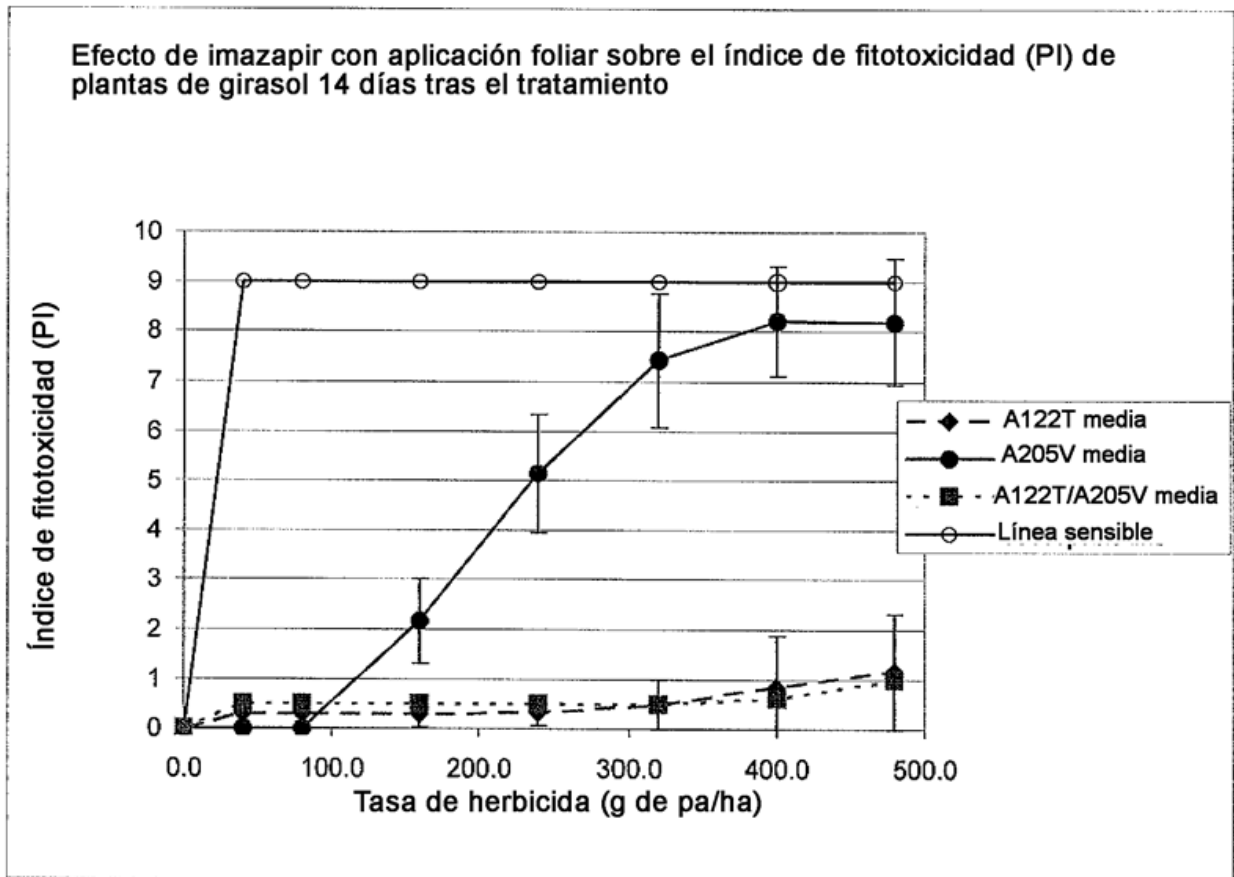


FIGURA 3

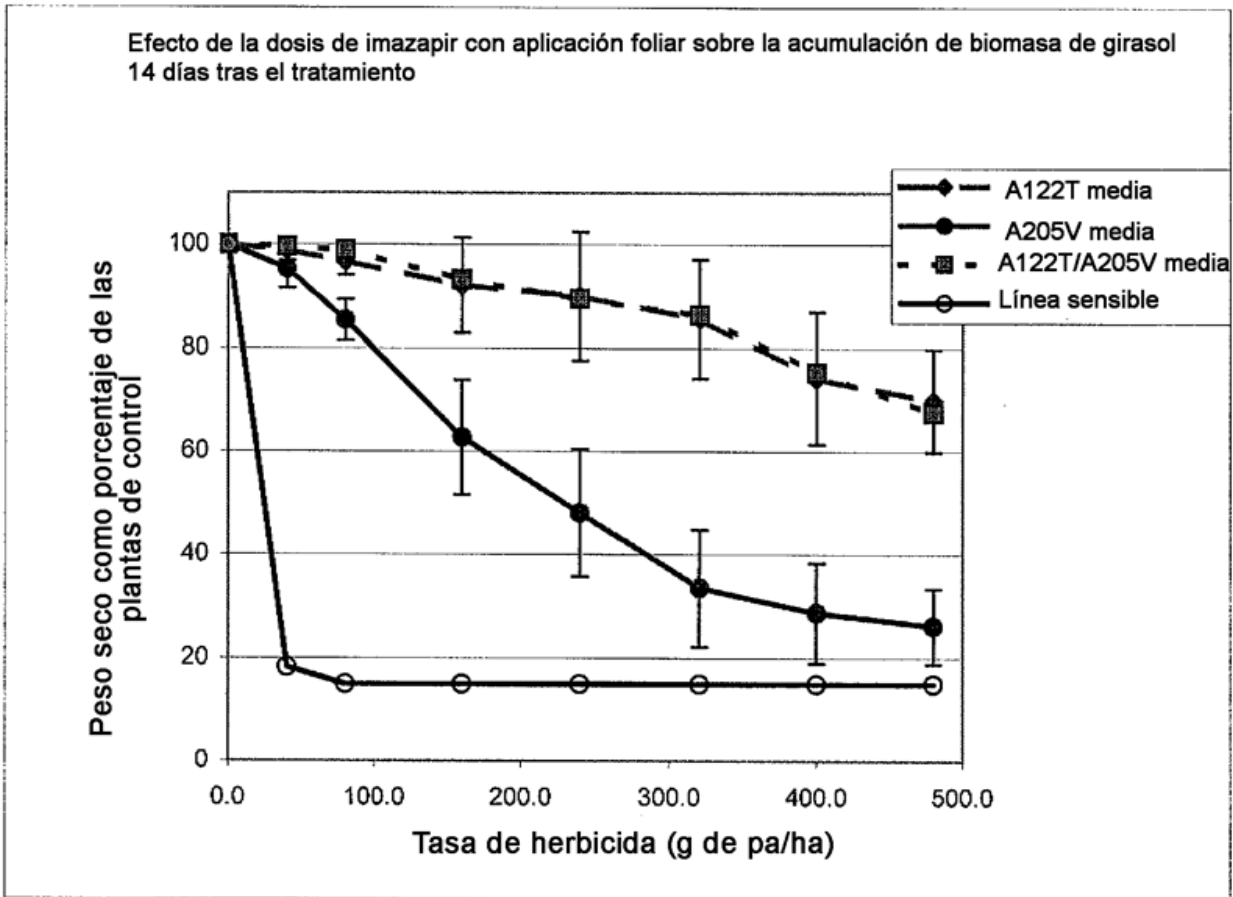


FIGURA 4

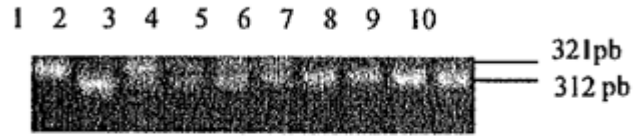


FIGURA 5

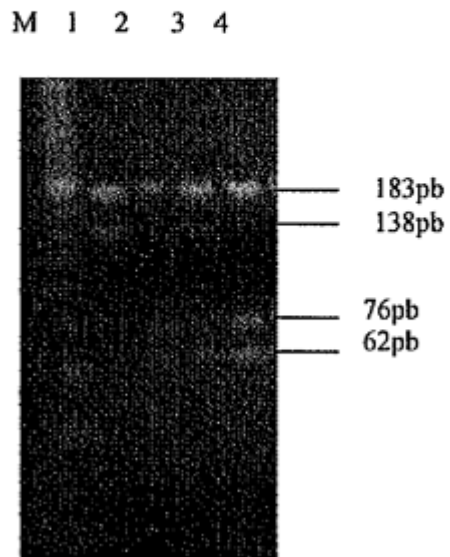


FIGURA 6

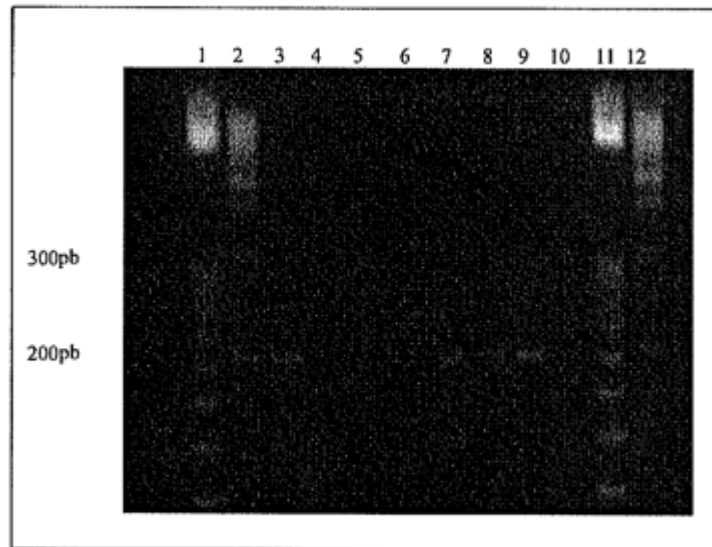


FIGURA 7

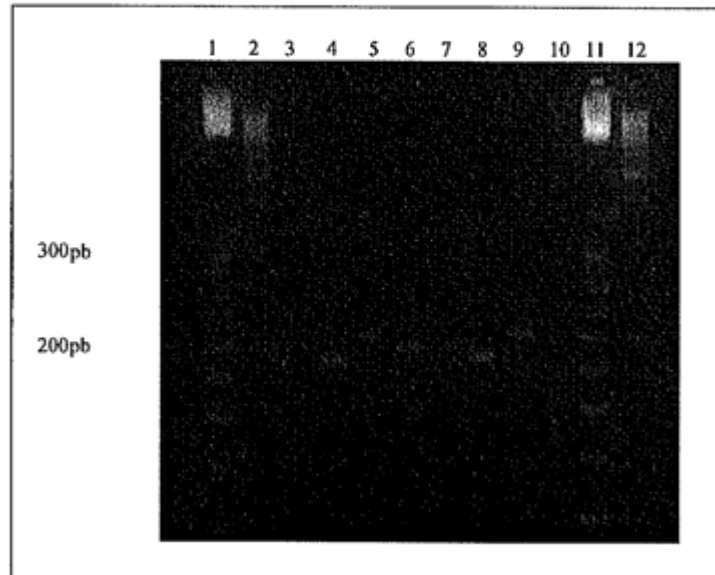


FIGURA 8

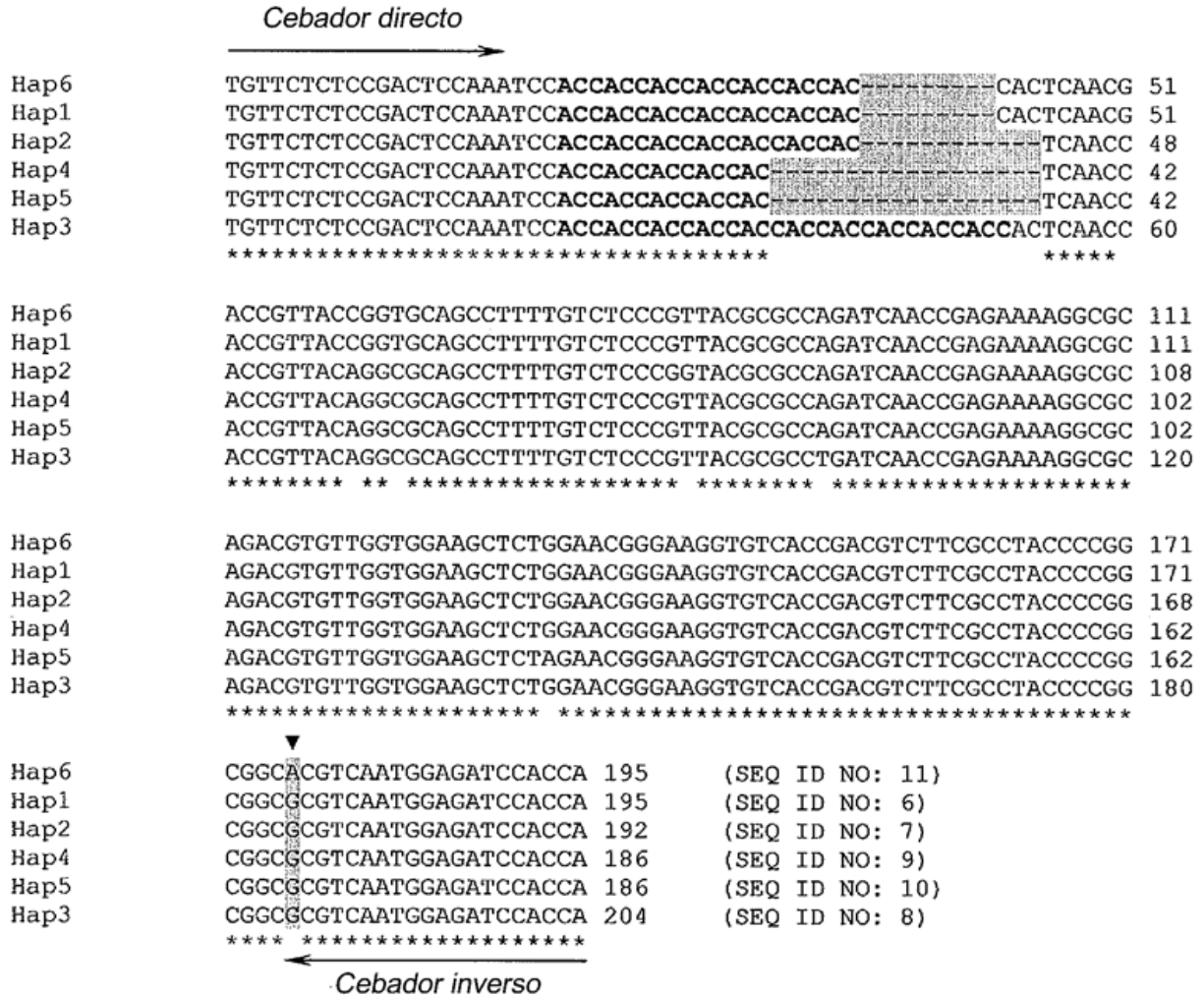




FIGURA 9

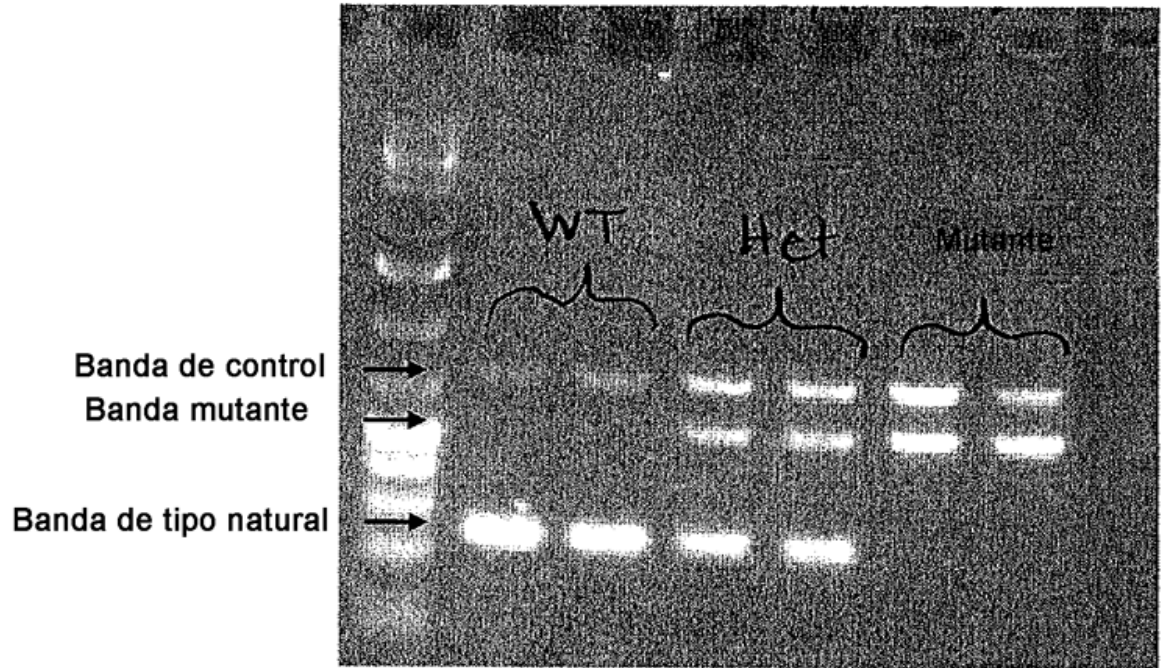


FIGURA 10

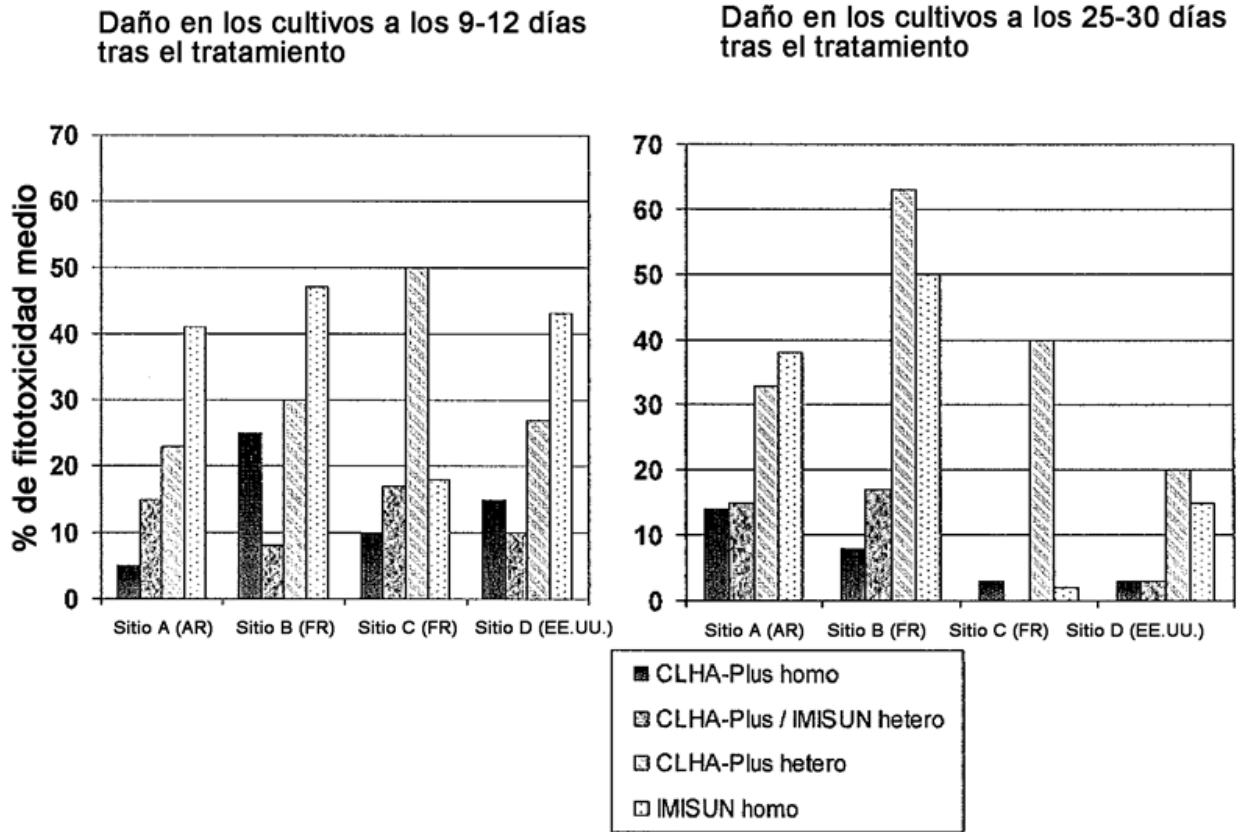


FIGURA 11

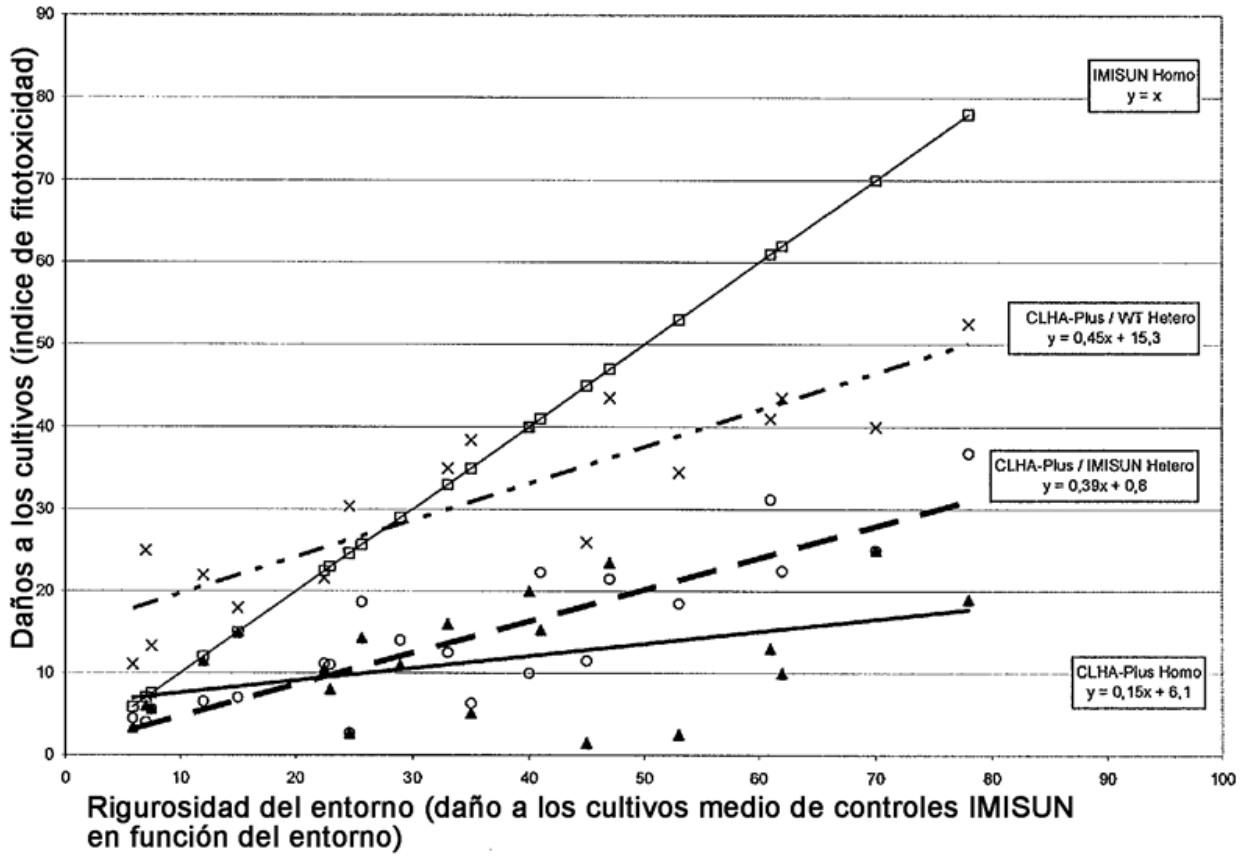


FIGURA 12

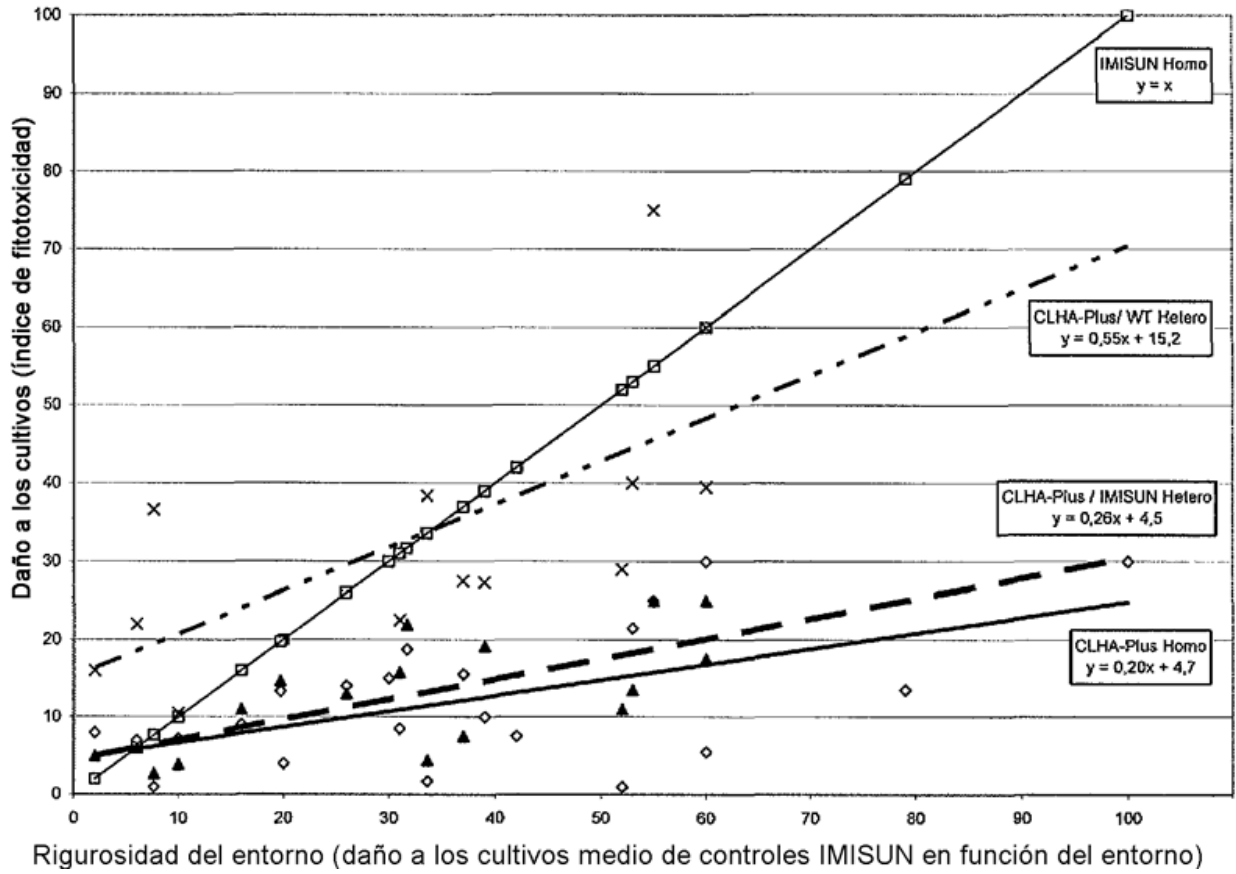


FIGURA 13

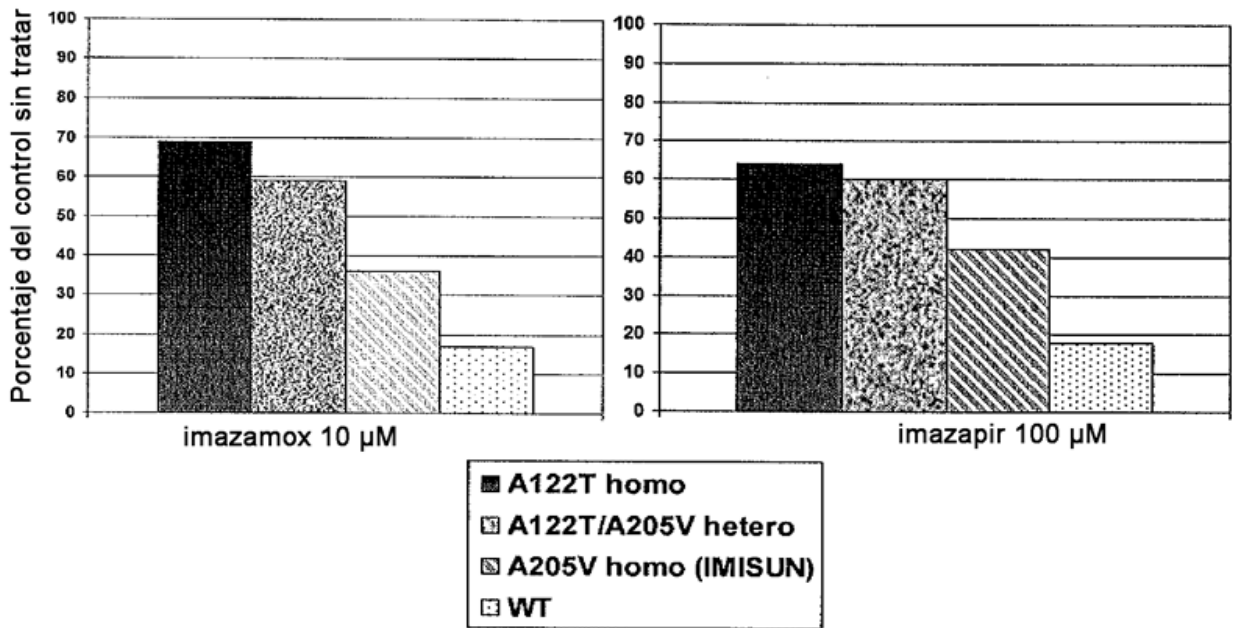


FIGURA 14

