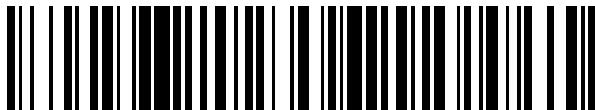


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 661 566**

(51) Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)  
**A01N 25/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2011 PCT/IB2011/000704**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11114232**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11731490 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2547766**

---

### (54) Título: Plantas tolerantes a los herbicidas

(30) Prioridad:

**05.11.2010 US 410802 P  
17.03.2010 US 314901 P  
24.11.2010 US 417132 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2018**

(73) Titular/es:

**BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V.  
(100.0%)  
Gebouw Rijnpoort, Groningsingel 1  
6835 EA Arnhem, NL**

(72) Inventor/es:

**VANTIEGHEM, HERVE;  
PFENNING, MATTHIAS;  
BREMER, HAGEN;  
KEHLER, RON y  
SCHOENHAMMER, ALFONS**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 661 566 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 tolerantes a los herbicidas

**5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a las solicitudes provisionales de EE.UU. para las patentes con n.º de serie 61/314.901 presentada el 17 de marzo de 2010; 61/410.802, presentada el 5 de noviembre de 2010; y 61/417.132 presentada el 24 de noviembre de 2010.

10

**10 Antecedentes de la invención**

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 4.1.3.18) es la primera enzima que cataliza la síntesis bioquímica de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh B. K., 1999 "Biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine" en: Singh B. K. (Ed) *Plant amino acids*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, N.Y., pág. 227-247). AHAS es el sitio de acción de cuatro familias de herbicidas estructuralmente diversas que incluyen las sulfonilureas (LaRossa R. A. y Falco S. C., 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 (ed) Whitaker J. R., Sonnet P. E. *Biocatalysis in agricultural biotechnology*. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C., pág. 277-288), y los pirimidinilbenzoatos (Subramanian et al., 1990 *Plant Physiol.* 94:239-244). Los herbicidas de imidazolinona (IMI) y sulfonilurea (SU) se usan ampliamente en la agricultura moderna debido a su efectividad a muy bajas tasas de aplicación y toxicidad relativamente nula en animales. Al inhibir la actividad de AHAS, estas familias de herbicidas impiden un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas susceptibles, incluyendo muchas especies de malas hierbas.

25

La colza tolerante a la imidazolinona se ha desarrollado mediante mutagénesis y selección con herbicidas de imidazolinona (S. Tan et al, "Pest Management Science" 61, 2005, 246). Se desarrollaron variedades comerciales basándose en los dos mutantes más tolerantes, PM1 y PM2, y actualmente se comercializan con la marca comercial Clearfield®. Se sabe que PM1 solo es tolerante a las imidazolinonas, mientras que PM2 tiene tolerancia cruzada tanto hacia las imidazolinonas como hacia las sulfonilureas.

30 Aunque un gen mutante de PM2 puede proporcionar cierto nivel de tolerancia a herbicidas de imidazolinona y/o sulfonilurea, las plantas de colza oleaginosa (OSR) que hasta la fecha contienen un solo gen mutante de PM2 han mostrado tolerancia insuficiente a los herbicidas de SU. Por ejemplo, se demostró que la aplicación de tifensulfurón a la variedad cultivada de *B. napus* primaveral, que contiene un gen mutante de PM, 45A77, conduce a una reducción de la biomasa de la colza, a síntomas de daño por herbicida o al retraso de la madurez (R. Degenhardt et al., "Weed Technology" 19, 2005, 608).

35 Además, hay cuatro estirpes de colza oleaginosa de invierno (WOSR) disponibles en el mercado que se reconocen en la técnica por proporcionar tolerancia a los residuos del suelo de los herbicidas de sulfonilureas que están presentes como arrastre de cultivos anteriores de trigo o guisante. Estas cuatro son la variedad de *B. napus* "de verano" de la Universidad Estatal de Kansas; las estirpes Roundup Ready DKW46-15 y DKW47-15 de DeKalb; y la estirpe Roundup Ready HyClass 115W de Croplan Genetics.

40 45 El documento WO 2009/046334 describe genes de AHAS de *Brassica* mutados. Se describe un gen mutante de AHAS de *B. juncea* in Ray et al. (*J Plant Physiol* 2004, 161(9), 1079-1083). El documento US 5.434.283 A describe depósitos de plantas de colza que son tolerantes a herbicidas de imidazolinona o a herbicidas tanto de clorsulfurón como de imidazolinona.

50 55 Sin embargo, se ha encontrado que las plantas de WOSR tolerantes al arrastre presentan una tolerancia limitada a residuos de herbicida de SU del suelo presentes por encima de los niveles de arrastre, es decir, por encima de una concentración residual de aproximadamente x 0,5, que queda de la dosis de herbicida aplicada. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de plantas de *Brassica* de tipo invernal que presentan tolerancia a niveles superiores a los niveles de arrastre del herbicida de sulfonilurea.

**Breve sumario de la invención**

60 La presente invención proporciona métodos de empleo de plantas de *Brassica* de tipo invernal tolerantes a herbicidas (HT) que expresan uno o más genes de AHASL tolerantes a herbicidas según lo definido en las reivindicaciones. Las plantas de *Brassica* de tipo invernal HT descritas en el presente documento, que contienen uno o menos genes de AHASL que codifican una PM2 o mutaciones similares, inesperadamente no muestran lesión significativa cuando entran en contacto con una cantidad de herbicida de SU que normalmente hace que una planta no tolerante presente una lesión significativa. Por ejemplo, cuando se pone en contacto con una tasa de herbicida de SU de x1, en una escala del 1 al 10, en la que 1 indica que no hay daño visible y 10 indica la muerte de la planta, una planta de *Brassica* HT presenta una puntuación de 1.

- La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que los cultivos de *Brassica* de tipo invernal (ilustrados por la colza oleaginosa de invierno (WOSR), es decir, la colza *B. napus* de tipo invernal) que contienen uno o varios genes de AHAS mutantes que proporcionan tolerancia a la imidazolinona, o que contienen un gen de AHAS mutante que normalmente proporciona tolerancia insuficiente al herbicida de SU, por ejemplo, en la OSR de tipo primaveral, muestran sorprendentemente un nivel comercialmente útil de tolerancia a ciertos herbicidas de sulfonilurea, es decir, un subgrupo de los herbicidas de sulfonilurea. Sin embargo, cuando los mismos genes están presentes en los tipos primaverales de los mismos cultivos de *Brassica*, incluso si proporcionan un nivel comercialmente útil de tolerancia al herbicida de imidazolinona, los cultivos resultan ser susceptibles a estos niveles comerciales de herbicidas de sulfonilurea.
- El nivel sorprendentemente alto de tolerancia al herbicida de SU presentado por las plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento puede tener lugar cuando esté presente un gen de AHASL tolerante a herbicidas en el genoma A de *Brassica*, preferentemente cuando dicho gen de AHASL HT es una variante de y está ubicado en el locus de AHASL nativo del genoma A de la planta. Dicho AHASL HT se puede obtener por mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria de una AHASL del genoma A de *Brassica*. Cuando el gen de AHASL tolerante a herbicidas de interés está presente únicamente en un genoma distinto del genoma A de *Brassica*, las plantas de *Brassica* de tipo invernal son susceptibles a los niveles comerciales de dichos herbicidas de SU. También se encontró que los tipos primaverales de los mismos cultivos de *Brassica* que tienen el gen AHASL tolerante a herbicidas de interés en el genoma A de *Brassica* son susceptibles a dichos niveles de herbicidas de SU.
- Las plantas de *Brassica* de tipo invernal HT empleadas en los métodos de la presente invención son plantas de *Brassica* que tienen al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en las que solo uno de los genes de AHASL HT de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT) que es W574X, y es un gen mono-SU-HT-AHASL, que puede codificar opcionalmente otras mutaciones HT, y en las que dicho gen mono-SU-HT-AHASL está ubicado en el genoma A de dicha planta de *Brassica*. Una mutación SU-HT adicional descrita en el presente documento es P197X. Las plantas de *Brassica* de tipo invernal empleadas en los métodos de la presente invención que tienen dicho gen mono-SU-HT-AHASL pueden contener además en cualquiera de sus genomas un segundo gen HT-AHASL que codifique las sustituciones P197X o W574X, pero que codifique una sustitución de HT diferente, tal como una otra mutación HT. Por ejemplo, las plantas de *Brassica* de tipo invernal que tienen un gen HT-AHASL que codifica W574L de manera homocigótica, hemicigótica o heterocigótica en el genoma A también pueden tener un segundo gen HT-AHASL en el genoma C de *Brassica*, por ejemplo, un gen AHAS codificante de una mutación S653N.
- La presente invención proporciona métodos de empleo de dichas plantas de *Brassica* de tipo invernal HT que incluyen métodos de protección de un cultivo de *Brassica* de tipo invernal de las malas hierbas, métodos de selección de plantas de *Brassica* de tipo invernal de HT y métodos para proporcionar protección del rendimiento para una cosecha de *Brassica* de tipo invernal. Estos métodos pueden incluir la realización de un tratamiento post-emergencia o tratamiento herbicida pre-emergencia de las plantas de *Brassica* de tipo invernal HT.
- Breve descripción de las figuras**
- La Fig. 1 proporciona una secuencia parcial de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un gen AHASL de *B. napus* que codifica la mutación PM2 (BnAHASL1A\_PM2).
- La Fig. 2 proporciona una secuencia parcial de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) de un gen AHASL de *B. napus* que codifica la mutación PM1 (BnAHASL1C\_PM1).
- La Fig. 3 proporciona una secuencia parcial de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un gen AHASL de *B. napus* que tiene la mutación PM2 (BnAHASL1A\_PM2).
- La Fig. 4 proporciona una secuencia parcial de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un gen AHASL de *B. napus* que tiene la mutación PM1 (BnAHASL1C\_PM1).
- La Fig. 5 proporciona una segunda secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de un gen AHASL de *Brassica* que codifica la mutación PM2 (AHASL1A\_PM2).
- La Fig. 6 proporciona una segunda secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de un gen AHASL de *Brassica* que tiene la mutación PM2 (AHASL1A\_PM2).
- La Fig. 7 es un gráfico que muestra la actividad de la enzima AHAS en presencia de un herbicida de imidazolinona.
- La Fig. 8 es un gráfico que muestra la actividad de la enzima AHAS en presencia de un herbicida de sulfonilurea.

**Descripción detallada de la invención****Definiciones**

- 5 Como se usa en el presente documento, se usarán abreviaturas convencionales de una letra para los aminoácidos, por ejemplo, A indica alanina, P indica prolina, W indica triptófano, X indica cualquier aminoácido, etc. Las mutaciones en comparación con la secuencia de tipo silvestre se indicarán especificando el aminoácido de tipo silvestre y la posición seguida por el aminoácido presente en el mutante. Por ejemplo, P197X se usará para indicar que la prolina de la posición 197 puede sustituirse con cualquier aminoácido.
- 10 Como se usa en el presente documento, las posiciones de aminoácidos se refieren al polipéptido de la subunidad grande de las enzimas AHAS de *Brassica*, plastídicas, (AHASL). Las posiciones de aminoácidos en una AHASL de *Brassica* a las que se hace referencia en el presente documento están numeradas de acuerdo con la numeración convencional de la industria de los restos correspondientes a los de la secuencia de AHASL de *Arabidopsis thaliana* (*At*), y se pueden indicar con (*At*). Por ejemplo, P197(*At*) se refiere al resto de prolina de la posición en un AHASL de *Brassica* que corresponde a la prolina en la posición 197 de AHASL de *Arabidopsis thaliana*.
- 15 Como se usa en el presente documento, "tolerante" o "tolerante a herbicidas" indica una planta o parte de la misma capaz de crecer en presencia de una cantidad de herbicida que normalmente causa la inhibición del crecimiento en una planta no tolerante (por ejemplo, un tipo silvestre) o parte de la misma. Los expertos en la materia conocen y determinan fácilmente los niveles de herbicida que normalmente inhiben el crecimiento de una planta no tolerante. Los ejemplos incluyen las cantidades recomendadas por los fabricantes para la aplicación. La tasa máxima es un ejemplo de una cantidad de herbicida que normalmente inhibiría el crecimiento de una planta no tolerante.
- 20 Como se usa en el presente documento, "AHASL tolerante a herbicidas (HT)" se refiere al polipéptido AHASL expresado a partir de un alelo HT-AHASL de un gen de AHASL en una célula vegetal y/o de uno o ambos de dos alelos homólogos del mismo gen HT-AHASL, es decir, en el mismo genoma de la célula vegetal, por lo que el HT-AHASL puede proporcionar tolerancia a herbicidas a una enzima AHAS de la célula vegetal. Un gen HT-AHASL puede ser recombinante, o puede obtenerse mediante la aplicación de un proceso de mutagénesis, un proceso de reproducción u otro proceso conocido en la técnica. Dicho gen puede ser hemicigótico, heterocigótico u homocigótico.
- 25 Como se usa en el presente documento, "AHAS" y "AHASL" se refieren respectivamente a enzimas AHASL plastídicas funcionales y a sus polipéptidos AHASL, es decir, que son funcionales en células de plantas de *Brassica* como se describe en el presente documento. De forma similar, los términos tales como "gen" y "polinucleótido", cuando se usan en referencia a aquellos que codifican dichas "AHAS" y "AHASL", se refieren a genes funcionales para las mismas, es decir, genes que son expresables en dicha célula.
- 30 Como se usa en el presente documento con respecto a herbicidas útiles en diversas realizaciones del presente documento, las expresiones tales como inhibidor de AHAS, Inhibidor ACCasa, inhibidor de PPO, inhibidor de EPSPS, imidazolinona, sulfonilurea y similares, se refieren a aquellos principios activos herbicidas agronómicamente aceptables reconocidos en la técnica. De forma similar, los términos tales como fungicida, nematicida, pesticida y similares se refieren a otros principios activos agronómicamente aceptables reconocidos en la técnica.
- 35 Como se usan en referencia a una determinada enzima mutante o a un determinado polipéptido mutante de la misma, las expresiones tales como tolerante a herbicidas (HT) y tolerancia a herbicidas se refieren a la capacidad de dicha enzima (o a la capacidad del polipéptido de conferir a su enzima la capacidad) para tolerar un principio activo herbicida que normalmente desactivaría o inhibiría la actividad de la versión silvestre (no mutante) de dicha enzima. Cuando se usa específicamente con respecto a una enzima AHAS o polipéptido AHASL, se refiere específicamente a la capacidad de tolerar un inhibidor de AHAS. Las clases de inhibidores de AHAS incluyen sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, sulfonilaminocarboniltriazolinonas y pirimidinilbenzoatos.
- 40 Como se usa en el presente documento, "recombinante" se refiere a un organismo que tiene material genético de diferentes fuentes como resultado de la aplicación humana de una técnica recombinogénica.
- 45 Como se usa en el presente documento, "mutagenizado" se refiere a un organismo que tiene un material genético alterado en comparación con el material genético de un organismo de tipo silvestre correspondiente, en el que la/s alteración/es del material genético se indujeron y/o seleccionaron mediante acción humana. Los ejemplos de acción humana que se pueden usar para producir un organismo mutagenizado incluyen, pero sin limitación, cultivo tisular de células vegetales (por ejemplo, callos) a concentraciones subletales de herbicidas (por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea), tratamiento de células vegetales con un mutágeno químico y selección posterior con herbicidas (por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea); o mediante el tratamiento de células vegetales con rayos X y la selección posterior con herbicidas (por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea). Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para inducir mutaciones. Los métodos de inducción de mutaciones pueden inducir mutaciones en posiciones aleatorias del material genético o pueden inducir mutaciones en ubicaciones específicas del material genético (es decir, pueden ser técnicas de mutagénesis).

- Como se usa en el presente documento, un "organismo genéticamente modificado" (OGM) es un organismo cuyas características genéticas han sido alteradas por un esfuerzo humano que causa la inserción de material genético de otro organismo fuente o progenie del mismo que conserva el material genético insertado. El organismo fuente puede ser de un tipo diferente de organismo (por ejemplo, una planta OGM puede contener material genético bacteriano) o del mismo tipo de organismo (por ejemplo, una planta OGM puede contener material genético de otra planta). Como se usa en el presente documento, recombinante y OGM se consideran sinónimos, e indican la presencia de material genético de una fuente diferente, mientras que mutagenizado indica material genético alterado de un organismo de tipo silvestre correspondiente, pero no material genético de otro organismo fuente.
- 5      10     Como se usa en el presente documento, "de tipo silvestre" o "planta de tipo silvestre correspondiente" significa la forma típica de un organismo o su material genético, como normalmente ocurre, en lugar de, por ejemplo, formas mutagenizadas y/o recombinantes.
- 15     Como se usa en el presente documento, una mutación inductora de tolerancia a herbicidas "mutación HT" es una alteración en la secuencia de aminoácidos de una enzima AHASL que confiere tolerancia a uno o más herbicidas (es decir, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de imidazolinona, etc.).
- Una mutación HT puede ser una "mutación SU-HT", es decir, una mutación seleccionada del grupo que consiste en P197X y W574X. Por ejemplo, una mutación SU-HT se puede seleccionar del grupo que consiste en P197S, P197A, P197E, P197L, P197Q, P197R, P197S, P197V, P197W, P197Y, P197I, P197H, P197C y P197G. En algunas realizaciones, una mutación SU-HT se puede seleccionar del grupo que consiste en W574L, W574M, W574C, W574S, W574R, W574G, W574A, W574F, W574Q y W574Y. En algunas realizaciones, una mutación SU-HT puede comprender W574L.
- 20     25     En algunas realizaciones, una mutación HT puede ser una "otra mutación HT". Como se usa en el presente documento, "otra mutación HT" es una alteración en la secuencia de aminoácidos de una enzima AHASL que confiere tolerancia a uno o más herbicidas (es decir, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de imidazolinona, etc.), en la que la alteración está en una posición distinta de prolina 197 o triptófano 574. La siguiente Tabla 1 proporciona una lista de posibles sitios para otras mutaciones HT, sustituciones permitidas, sustituciones preferidas y sustituciones más preferidas. X indica cualquier aminoácido.
- 30     35     En algunas realizaciones, se pueden seleccionar otras mutaciones HT del grupo que consiste en A122X, R199X, A205X, S653X y G654X, y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, se pueden seleccionar otras

Tabla 1. "Otras" mutaciones HT

Con (At)	Sustituciones permitidas	Sustituciones preferidas	Más preferidas
G121	X	NSA D	
A122	X	TV DPY (o X)	TV
M124	X	E I	
R142	X	K	
V196	X	M	
R199	X	AE	AE
T203	X	I	
A205	X	V CDERTWYN	V
F206	X	RAHWY	
K256	X	DENPTG	
M351	X	CKVGPQY	
H352	X	FMQ	
R373	X	F	
D375	X	NAE	
D376	X	EVN GPSWAC	
R377	X	K	
M570	X	ANC	
V571	X	ACNYIQSW	
F578	X	CGLNRDEIKPS W	
S653	X	NIFT	N
G654	X	QCED	E

- En algunas realizaciones, se pueden seleccionar otras mutaciones HT del grupo que consiste en A122X, R199X, A205X, S653X y G654X, y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, se pueden seleccionar otras

mutaciones HT del grupo que consiste en A122T, A122V, A122D, A122P, A122Y, R199A, R199E, A205V, A205C, A205D, A205E, A205R, A205T, A205W, A205Y, A205N, S653N, S653I, S653F, S653T, G654Q, G654C, G654E, G654D, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, se pueden seleccionar otras mutaciones HT del grupo que consiste en A122T, A122V, R199A, R199E, A205V, S653N, G654E, y combinaciones de las mismas.

5

## Plantas

Las fuentes de genes de AHASL plastídicas útiles se pueden proporcionar a partir de cualquiera de las siguientes estirpes celulares depositadas enumeradas en la Tabla 2, de *Brassica napus* (Bn) y *Brassica juncea* (Bj), en las que su alelos de la subunidad grande de AHAS (AHASL) tolerante al inhibidor de AHAS (HT) se mencionan como se muestran a continuación, indicando la letra final el genoma de *Brassica* (A, B o C) para el que el alelo es nativo: BnAHASL1A o BnAHASL1C para *B. napus*, y BjAHASL1A o BjAHASL1B para *B. juncea*. Cabe señalar que las posiciones de mutaciones de AHASL se establecen con referencia a la nomenclatura estandarizada en el campo, en la que el polipéptido AHASL plastídico de *Arabidopsis thaliana* (At) proporciona el patrón para la numeración de las posiciones de los restos.

Tabla 2. Ejemplos de fuentes de estirpes de *Brassica* para genes AHASL útiles

Patente de EE.UU. n.º 5.545.821 concedida a Wong et al.				
Nombre de la estirpe	Especie	Depósito de la ATCC	Alelo AHAS	Mutación
PM-1	<i>B. napus</i>	40683	BnAHASL1C	S653(At)N
PM-2	<i>B. napus</i>	40684	BnAHASL1A	W574(At)L
Solicitud PCT n.º PCT/US09/58169 concedida a Beetham et al.				
Nombre de la estirpe	Especie	Depósito de la ATCC	Alelo/s AHAS	Mutación/es
BnCL120C7	<i>B. napus</i>	PTA-9278	BnAHASL1A	A122(At)T
BnCL131A1	<i>B. napus</i>	PTA-9279	BnAHASL1A	A122(At)T + S653(At)N
BnCL140B3	<i>B. napus</i>	PTA-9402	BnAHASL1A	A122(At)T + S653(At)N
BnCL140C7	<i>B. napus</i>	PTA-9403	BnAHASL1A	A122(At)T + S653(At)N
PM1PM2/CL131A1	<i>B. napus</i>	PTA-10321	BnAHASL1C	S653(At)N
			BnAHASL1A	W574(At)L
			BnAHASL1A	A122(At)T + S653(At)N
Patente de EE.UU. n.º 7.355.098 concedida a Yao et al.				
Nombre de la estirpe	Especie	Depósito de la ATCC	Alelo AHAS	Mutación
J04E-0044	<i>B. juncea</i>	PTA-6324	BjAHASL1B	S653(At)N
J04E-0122	<i>B. juncea</i>	PTA-7944	BjAHASL1A	A122(At)T
J04E-0130	<i>B. juncea</i>	PTA-7945	BjAHASL1B	A122(At)T
J04E-0139	<i>B. juncea</i>	PTA-7946	BjAHASL1A	S653(At)N
Publicación PCT WO 2009/031031 concedida a Yao et al.				
Nombre de la estirpe	Especie	Depósito de la ATCC	Alelo/s AHAS	Mutación/es
J05Z-07801	<i>B. juncea</i>	PTA-8305	BjAHASL1B	S653(At)N
			BnAHASL1A	W574(At)L

20 Aunque se ilustra con referencia a variedades de colza/OSR de *Brassica napus* tolerantes al inhibidor de AHAS, de tipo invernal, se cree que, en diversas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento que usan herbicidas de sulfonilurea pueden emplearse con otras especies de *Brassica* tolerantes al inhibidor de AHAS, de tipo invernal, de valor comercial, tales como *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra* y *B. juncea*. Las estirpes de *Brassica* tolerantes al inhibidor de AHAS descritas como útiles en el presente documento pueden emplearse directa o indirectamente en los métodos de control de malas hierbas, es decir, bien como cultivos para el tratamiento con herbicidas o como estirpes donantes de rasgos de tolerancia al inhibidor de AHAS para el desarrollo, como reproducción tradicional de plantas, para producir otros cultivos híbridos y/o variedades de *Brassica* de tipo invierno que contengan dichos rasgo o rasgos. La totalidad de dicha variedad o cultivos híbridos resultantes, que contienen el rasgo o los rasgos ancestrales de tolerancia al inhibidor de AHAS se puede denominar en el presente documento

- progenie de la/s estirpe/s tolerante/s al inhibidor de AHAS ancestrales. En el caso de los rasgos AHASL del genoma A, B y C de *Brassica*, estos se pueden reproducir en especies de *Brassica* de tipo invernal que tienen un genoma correspondiente, por ejemplo, variedades *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB), *B. oleracea* (CC), *B. rapa* (AA), *B. nigra* (BB), *B. carinata* (BBCC) y *Raphano Brassica* que son progenie de un cruce entre cualquiera de los anteriores y una especie *Raphanus*, por ejemplo, *Raphano Brassica* var. "rabbage" (RRCC) de *B. oleracea* x *Raphanus sativus* o *Raphano Brassica* var. "raparadish" (RRAA) de *B. rapa* x *Raphanus sativus*. Entre ellas, son de particular interés *B. napus*, *B. rapa* y *B. juncea*, prefiriéndose *B. napus* en algunas realizaciones.
- Las plantas empleadas en los métodos de la invención pueden incluir aquellas plantas que, además de haberse vuelto tolerantes a la sulfonilurea, se han sometido a modificaciones genéticas adicionales mediante reproducción, mutagénesis o ingeniería genética, por ejemplo, se han vuelto tolerantes a aplicaciones de otras clases específicas de herbicidas, tales como herbicidas de auxina, dicamba o 2,4-D; herbicidas blanqueadores tales como inhibidores de hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) o inhibidores de fitoeno desaturasa (PDS); inhibidores de enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSP), tales como glifosato; inhibidores de glutamina sintetasa (FC) tales como glufosinato; inhibidores de protoporfirinogen-IX oxidasa; inhibidores de la biosíntesis de lípidos tales como inhibidores de acetil CoA carboxilasa (ACCCasa); o herbicidas de oxinilo (es decir, bromoxinilo o ioxinilo) como resultado de métodos convencionales de reproducción o ingeniería genética; además, la colza oleaginosa de invierno tolerante a las sulfonilureas (colza de invierno) puede haberse hecho resistente a múltiples clases de herbicidas a través de múltiples modificaciones genéticas, tales como resistencia tanto al glifosato como al glufosinato o tanto al glifosato como a un herbicida de otra clase tal como los inhibidores de HPPD, herbicidas de auxina o inhibidores de ACCasa. Estas tecnologías de resistencia a herbicidas se describen, por ejemplo, en *Pest Management Science* en el volumen, año, página 61, 2005, 246; 61, 2005, 258; 61, 2005, 277; 61, 2005, 269; 61, 2005, 286; 64, 2008, 326; 64, 2008, 332; *Weed Science* 57, 2009, 108; *Australian Journal of Agricultural Research* 58, 2007, 708; *Science* 316, 2007, 1185; y las referencias citadas en las mismas.
- Además, también se describe la colza oleaginosa de invierno tolerante a las sulfonilureas (colza de invierno), que es mediante el uso de técnicas de ADN recombinante capaces de sintetizar una o más proteínas insecticidas, en especial, las conocidas del género bacteriano *Bacillus*, en particular, de *Bacillus thuringiensis*, tales como δ-endotoxinas, por ejemplo, CryIA(b), CryIA(c), CryIF, CryIF(a2), CryIIA(b), CryIIIA, CryIIB(b1) o Cry9c; proteínas insecticidas vegetativas (VIP), por ejemplo, VIP1, VIP2, VIP3 o VIP3A; proteínas insecticidas de bacterias que colonizan nematodos, por ejemplo, *Photorhabdus* sp. o *Xenorhabdus* sp.; toxinas producidas por animales, tales como toxinas de escorpión, toxinas de arácnidos, toxinas de avispas u otras neurotoxinas específicas de insectos; toxinas producidas por hongos, tales toxinas de estreptomicetos; lectinas vegetales tales como lectinas de guisante o cebada; aglutininas; inhibidores de proteinasas, tales como inhibidores de tripsina, inhibidores de serina proteasa, inhibidores de patatina, cistatina o papaína; proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP), tales como ricina, RIP de maíz, abrina, lufina, saporina o briodina; enzimas del metabolismo de esteroides, tales como 3-hidroxi-esteroide oxidasa, ecdisiteroide-IDP-glicosil-transferasa, colesterol oxidasa, inhibidores de ecdisona o HMG-CoA-reductasa; bloqueadores de canales iónicos, tales como bloqueadores de canales de sodio o calcio; hormona esterasa juvenil; receptores de hormonas diuréticas (receptores de helicoquinina); estilbeno sintasa, bibencil sintasa, quitinasas o glucanasas. En el contexto de la presente invención, estas proteínas o toxinas insecticidas deben entenderse expresamente también como pretoxinas, proteínas híbridas, proteínas truncadas o modificadas de otro modo. Las proteínas híbridas se caracterizan por una nueva combinación de dominios proteicos (véase, por ejemplo, el documento WO 02/015701). Se describen más ejemplos de dichas toxinas o plantas genéticamente modificadas capaces de sintetizar dichas toxinas, por ejemplo, en los documentos EP-A 374 753, WO 93/007278, WO 95/34656, EP-A 427 529, EP-A 451 878, WO 03/18810 y WO 03/52073. Los métodos de producción de dichas plantas genéticamente modificadas son conocidos en general por los expertos en la materia, y se describen, por ejemplo, en las publicaciones mencionadas anteriormente. Estas proteínas insecticidas contenidas en las plantas genéticamente modificadas confieren a las plantas que producen estas proteínas tolerancia a plagas dañinas de todos los grupos taxonómicos de artrópodos, en especial, a escarabajos (*Coeloptera*), insectos de dos alas (*Diptera*) y polillas (*Lepidoptera*), y a nematodos (*Nematoda*).
- Además, también se describe la colza oleaginosa de invierno tolerante a las sulfonilureas (colza de invierno), que es mediante el uso de técnicas de ADN recombinante capaz de sintetizar una o más proteínas para aumentar la resistencia o la tolerancia de esas plantas a patógenos bacterianos, víricos o fúngicos. Los métodos de producción de dichas plantas genéticamente modificadas son conocidos en general por los expertos en la materia.
- Además, también se describe la colza oleaginosa de invierno tolerante a las sulfonilureas (colza de invierno), que es mediante el uso de técnicas de ADN recombinante capaz de sintetizar una o más proteínas para aumentar la productividad (por ejemplo, el contenido de aceite), la tolerancia a la sequía, la salinidad u otro tipo de factores ambientales limitantes del crecimiento o la tolerancia a plagas y patógenos fúngicos, bacterianos o víricos de esas plantas.
- Además, también se describe la colza oleaginosa de invierno tolerante a las sulfonilureas (colza de invierno) que contiene mediante el uso de técnicas de ADN recombinante una cantidad modificada de sustancias de contenido o nuevas sustancias de contenido, en concreto, para mejorar la nutrición humana o animal, por ejemplo, cultivos oleaginosos que producen ácidos grasos omega-3 de cadena larga saludable o ácidos grasos omega-9 insaturados

(por ejemplo, colza *Nexera*<sup>®</sup>, Dow Agro Sciences, Canadá).

También se describen en el presente documento productos agronómicos, para ejemplo, aceite de semilla, harina de semilla y similares. Dichos productos agronómicos pueden ser de calidad alimenticia para animales o seres humanos. Los productos agronómicos pueden producirse a partir de plantas, incluyendo las semillas de dichas plantas, tratadas u obtenidas a partir de los métodos descritos a lo largo de la descripción detallada en el presente documento.

#### Enzimas AHAS

En diversas realizaciones, se pueden usar plantas de *Brassica* de tipo invernal que contienen tanto una W574(At)X como una S653(At)X en polipéptidos AHASL plastídicos de las mismas. Estos pueden estar presentes en diferentes alelos, tales como en diferentes genomas, conteniendo cada uno una sola mutación en el gen AHASL respectivo, o estos dos pueden estar presentes en un solo AHASL, como un alelo de doble mutación. En diversas realizaciones, estas pueden ser W574(At)L and S653(At)N: la primera se puede denominar mutación "PM2", y la segunda, mutación "PM1". La Fig. 1 (SEQ ID NO: 1) y la Fig. 3 (SEQ ID NO: 3) proporcionan una secuencia parcial de nucleótidos y una secuencia parcial de aminoácidos, respectivamente, para la mutación PM2 en *B. napus*. La Fig. 2 (SEQ ID NO: 2) y la Fig. 4 (SEQ ID NO: 4) proporcionan una secuencia parcial de nucleótidos y una secuencia parcial de aminoácidos, respectivamente, para la mutación PM1 de *B. napus*. La Fig. 5 (SEQ ID NO: 5) y la Fig. 6 proporcionan una segunda secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de aminoácidos, respectivamente, para la mutación PM2, por ejemplo, la secuencia de PM2 introgresada en *B. juncea* de *B. napus*.

Las plantas de *Brassica* de tipo invernal de las mismas pueden ser variedades endogámicas, por ejemplo, variedades de polinización abierta, o híbridos, por ejemplo, híbridos F1.

Aunque, en el presente documento, se pueden emplear rasgos de AHAS mutantes transgénicos o no transgénicos, en cultivos de *Brassica* de tipo invernal, en diversas realizaciones, el rasgo o los rasgos pueden ser no transgénicos, es decir, obtenidos mediante un proceso, excluyendo técnicas de ADN recombinante, y que comprende la mutagénesis, la genoplastia y/o el aislamiento de plantas mutantes espontáneas. En la técnica, se conocen muchas técnicas de mutagénesis que pueden implicar la aplicación de un agente químico mutagénico o radiación a semillas, partes de plantas o células vegetales cultivadas; como alternativa, o además, el cultivo de células vegetales o las condiciones en las que se cultivan las células vegetales, pueden aumentar la tasa de aparición o acumulación de mutaciones espontáneas. Las técnicas de genoplastia pueden incluir estrategias de tipo mutación dirigida, tales como métodos que comprenden la introducción, en el núcleo de la célula vegetal, de oligonucleótidos que facilitan la sustitución de nucleótidos mediada por el sistema de reparación de apareamientos erróneos.

Cabe señalar que, en las enzimas AHAS, hay dos sitios de mutación que se sabe que son susceptibles de mutaciones que proporcionan niveles significativos de tolerancia a las SU. Ambos se dan en la AHASL, en las posiciones P197(At) y W574(At).

En diversas realizaciones, la WOSR y otros cultivos de *Brassica* de tipo invernal pueden contener una de dichas mutaciones en las AHASL plastídicas de la misma; además de una o más mutaciones, en el mismo o diferente gen de AHASL plastídica, que se puede seleccionar de aquellas en sitios donde las mutaciones han resultado ser capaces de proporcionar tolerancia hacia uno o más inhibidores de AHAS, sitios cuyos ejemplos incluyen G121(At), A122(At), M124(At), R142(At), V196(At), R199(At), T203(At), A205(At), F206(At), K256(At), M351(At), H352(At), R373(At), D375(At), D376(At), R377(At), M570(At), V571(At), F578(At), S653(At) y G654(At).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la WOSR y otros cultivos de *Brassica* de tipo invernal útiles en el presente documento pueden contener una mutación SU-HT en las AHASL plastídicas de los mismos. En diversas realizaciones, una planta útil en el presente documento puede contener más de una mutación de tolerancia a herbicidas en la población de AHASL plastídicas de la misma. En diversas realizaciones, estas pueden estar contenidas en diferentes genes AHASL de mutante sencilla.

En resumen, una WOSR u otro cultivo de *Brassica* de tipo invernal útil en el presente documento puede contener hasta un gen de AHASL plastídica expresable que codifica una mutación en W574(At), independientemente de si ese gen de AHASL también codifica otra/s mutación/es de tolerancia al inhibidor de AHAS (es decir, diferente de cualquier mutación adicional en una posición seleccionada de P197(At) o W574(At)], y si ese gen está representado por un solo alelo, como un heterocigoto, o por dos alelos, como un homocigoto. Dicha WOSR u otro cultivo de *Brassica* no contiene más de un gen de AHASL plastídica codificante de una mutación que se da en la posición W574(At) del genoma A.

Cuando la WOSR u otro cultivo de *Brassica* de tipo invernal contiene un gen de AHASL plastídica expresable que codifica una mutación en W574(At), en un alelo del genoma A de *Brassica*, entonces no es necesario que dicha mutación adicional esté presente en un gen AHASL de la planta. Dichas realizaciones no incluirían cultivos de tipo invernal de *B. oleracea* (CC), *B. nigra* (BB), *B. carinata* (BBCC) y *Raphano Brassica* var. "rabbage" (RRCC), que carecen de un genoma A de *Brassica*.

Como se ha descrito en el presente documento, las plantas útiles en diversas realizaciones del mismo contienen uno o más genes AHASL mutantes en los que al menos una mutación confiere tolerancia al herbicidas a la enzima AHAS de la que forma parte el AHASL codificado, y confiere, por lo tanto, tolerancia a herbicidas a la planta en la que reside. Dicho gen AHASL mutante se denomina "gen HT-AHASL". También, como se describe en el presente documento, las plantas útiles en diversas realizaciones del mismo contienen, como uno de dichos genes HT-AHASL, un gen SU-HT-AHASL, es decir, un gen HT-AHASL que codifica una mutación que es W574X, denominándose dichas mutaciones W574X en el presente documento mutaciones HT de tolerancia a las sulfonilureas o mutaciones "SU-HT". Sus plantas pueden contener solo uno de dichos genes SU-HT-AHASL, y este es un gen "mono-SU-HT-AHASL". Dicho gen mono-SU-HT-AHASL puede ubicarse en el genoma A de *Brassica*. Como se usa en el presente documento, un gen "mono-SU-HT-AHASL" se refiere a un gen HT-AHASL que codifica solo una mutación SU-HT, o solo una mutación SU-HT por alelo de dicho gen. Por lo tanto, un gen "mono-SU-HT-AHASL" se refiere a un gen HT-AHASL que:

- 5 (1) codifica:
  - 15 (a) solo una de P197X o W574X, y que la codifica homocigótica o hemicigóticamente;
  - (b) solo una de P197X o W574X, y la codifica en un alelo, y codifica un resto de P197P o W574W de tipo silvestre, respectivamente, en el alelo homólogo;
  - 20 (c) dos mutaciones P197X diferentes heterocigóticamente, siendo homocigótico para los restos de W574W de tipo silvestre;
  - (d) dos mutaciones W574X diferentes heterocigóticamente, siendo homocigótico para los restos de P197P de tipo silvestre; o
  - 25 (e) tanto (i) una mutación P197X como un resto de W574W de tipo silvestre en un alelo, e (ii) una mutación W574X y un resto de P197P de tipo silvestre en el alelo homólogo; y
- 30 (2) opcionalmente codifica otra/s mutación/es HT, como se define ese término en el presente documento.

En algunas realizaciones, un gen mono-SU-HT-AHASL puede que no codifique ninguna otra mutación HT.

El término "hemicigótico" cuando se usa en el presente documento con respecto a una mutación AHASL codificada "hemicigóticamente" se refiere a la relación entre los locus correspondientes de dos cromosomas homólogos en un genoma, en el que uno de los dos locus está ocupado por un alelo de AHASL (que funciona) que contiene el resto de aminoácido de la mutación (de sustitución) y el otro locus está ocupado por un alelo de AHASL que no funciona o está desocupado, por ejemplo, estando el segundo alelo ausente o habiéndose eliminado. Cabe señalar que los genes "mono-SU-HT-AHASL" enumerados en (1)(b)-(1)(e) anteriores se pueden denominar genes "mono-SU-HT-AHASL heterocigóticos", es decir, ya que codifican cada mutación SU-HT de forma heterocigótica.

Como se describe en el presente documento, las plantas de *Brassica*, en diversas realizaciones del mismo, pueden contener al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en las que solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT) que es W574X, y que es un gen mono-SU-HT-AHASL, que puede codificar opcionalmente otra/s mutación/es HT, y en las que dicho gen mono-SU-HT-AHASL está ubicado en el genoma A de dicha planta de *Brassica*.

Además de ser capaz de tolerar herbicidas que inhiben la actividad AHAS, las plantas empleadas en los métodos de la invención también pueden tolerar herbicidas que funcionan en otros procesos fisiológicos. Por ejemplo, las plantas pueden ser tolerantes a los inhibidores de la acetil Coenzima A carboxilasa (ACCase), tales como "dims" (por ejemplo, cicloxidim, setoxidim, cletodim o tedraloxidim), "fops" (por ejemplo, clodinafop, diclofop, fluazifop, haloxifop o quizalofop) y "dens" (tales como pinoxaden); a inhibidores de 5-enolpiruvilisikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tales como glifosato; a inhibidores de protoporfirinógeno [IX] oxidasa (PPO) tales como sallufenacilo; y a inhibidores de glutamina sintetasa tales como glufosinato. Además de estas clases de inhibidores, las plantas empleadas en los métodos de la invención también pueden ser tolerantes a herbicidas que tienen otros modos de acción, por ejemplo, reguladores del crecimiento de auxina (por ejemplo, dicamba), inhibidores del pigmentos de clorofila/carotenoide, destructores de la membrana celular, inhibidores de la fotosíntesis, inhibidores de la división celular, inhibidores de la raíz, inhibidores de brotes y combinaciones de los mismos. Dichos rasgos de tolerancia pueden expresarse, por ejemplo, como proteínas ACCasa mutantes, proteínas EPSPS mutantes o proteínas glutamina sintetasa mutantes; o como ariloxialcanoato dioxygenasa mutante nativa, endogámica o transgénica (AAD o DHT), haloarilnitrilasa (BXN), ácido 2,2-dicloropropiólico deshalogenasa (DEH), dicamba monooxigenasa (DMO), glifosato-N-acetiltransferasa (GAT), glifosato descarboxilasa (GDC), glifosato oxidoreductasa (GOX), glutatión-S-transferasa (GST), fosfinotricina acetiltransferasa (PAT o bar) o proteínas del citocromo P450 (CYP450) que tienen una actividad de degradación de herbicidas. Las plantas de *Brassica* invernales del presente documento también pueden apilarse con otros rasgos que incluyen, pero sin limitación, rasgos pesticidas tales como Bt Cry y otras proteínas que tienen actividad pesticida hacia coleópteros, lepidópteros, nematodos u otras plagas; rasgos nutricionales o nutracéuticos tales como

contenido de aceite modificado o rasgos del perfil oleaginoso, rasgos de alta concentración de proteína o de aminoácidos, y otros tipos de rasgos conocidos en la técnica.

5 En el presente documento, también se describe la progenie de las plantas tolerantes a herbicidas descritas en el mismo de la invención, así como las semillas o células de las mismas. En el presente documento, también se describen métodos de producción de semillas mediante la realización de los métodos descritos a lo largo de la descripción detallada del mismo y la recolección de semillas de las plantas tolerantes a herbicidas. Se pueden recoger semillas de plantas de *Brassica* tratadas mediante métodos descritos a lo largo de la descripción detallada.

10 Moléculas de ácido nucleico

En el presente documento, también se describen moléculas de ácido nucleico que codifican todas o una parte de las proteínas AHASL descritas anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una versión modificada, o cuando corresponda, no modificada de las secuencias enumeradas en los documentos de patente a los que se hace referencia en la Tabla 2, en las que la secuencia resultante codifica una proteína AHASL que comprende uno o más de los siguientes: el aminoácido de la posición 197 es distinto de prolina, mientras que el aminoácido de la posición 574 es triptófano; o el aminoácido de la posición 574 es distinto de triptófano, mientras que el aminoácido de la posición 197 es prolina.

20 En el presente documento, también se describen ácidos nucleicos que codifican AHASL de *Brassica* que tienen una o más otras mutaciones HT. Dichas AHASL también pueden comprender secuencias de aminoácidos que tienen uno o más de los siguientes: el aminoácido de la posición 197 es distinto de prolina, mientras que el aminoácido de la posición 574 es triptófano; o el aminoácido de la posición 574 es distinto de triptófano, mientras que el aminoácido de la posición 197 es prolina.

25 Una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede ser ADN, derivado de ADN genómico o ADNc o ARN. Una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede ser natural o puede ser sintética. Una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento se puede aislar, recombinar y/o mutagenizar.

30 Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden comprender secuencias no codificantes, que pueden o no transcribirse. Dichas secuencias no codificantes incluyen, pero sin limitación, UTR 5' y 3', señales de poliadenilación y secuencias reguladoras que controlan la expresión génica (por ejemplo, promotores).

35 Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento también pueden comprender secuencias que codifican péptidos transitorios, sitios de escisión de proteasa, sitios de modificación covalentes y similares. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden codificar una secuencia de péptido transitorio de cloroplastos además de una secuencia que codifica una enzima AHAS.

40 Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden codificar un AHASL que tenga al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más identidad de secuencia con una AHASL P197X o W574X como se ha descrito anteriormente, en las que la proteína codificada por la secuencia comprende uno o más de los siguientes: el aminoácido de la posición 197 es distinto de prolina, mientras que el aminoácido de la posición 574 es triptófano; o el aminoácido de la posición 574 es distinto de triptófano, mientras que el aminoácido de la posición 197 es prolina.

45 Como se usa en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" se define como el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos de la secuencia derivada candidata idéntica a los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia objeto (o parte especificada de la misma), tras alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, según lo generado por el programa BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con parámetros de búsqueda establecidos en valores predeterminados.

55 En el presente documento, también se describen moléculas de ácido nucleico que se hibridan con moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima AHAS descrita en el presente documento, así como moléculas de ácido nucleico que se hibridan con el complemento inverso de moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima AHAS descrita en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender moléculas de ácido nucleico que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que codifica una AHASL P197X o W574X como se ha descrito anteriormente, en las que la proteína codificada por la secuencia comprende uno o más de los siguientes: el aminoácido de la posición 197 es distinto de prolina, mientras que el aminoácido de la posición 574 es triptófano; o el aminoácido de la posición 574 es distinto de triptófano mientras que el aminoácido de la posición 197 es prolina, así como moléculas de ácido nucleico complementarias a todas o a una parte de las secuencias codificantes, o el complemento inverso de dichas moléculas de ácido nucleico en condiciones rigurosas. La rigurosidad de la hibridación puede controlarse mediante la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de agentes desnaturalizantes tales como formamida durante la hibridación y el lavado. Las condiciones rigurosas que se pueden usar incluyen las definidas en "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. 1, capítulo. 2.10, John Wiley & Sons,

Publishers (1994) y Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor (1989).

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden englobar oligonucleótidos que se pueden usar como sondas de hibridación, cebadores de secuenciación y/o cebadores de PCR. Dichos oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para determinar una secuencia de codón en una determinada posición de una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima AHAS, por ejemplo, mediante PCR específica de alelo. Dichos oligonucleótidos pueden ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud.

## 10 Herbicidas

Las composiciones herbicidas empleadas en diversos métodos de la invención comprenden uno o más herbicidas de SU seleccionados del grupo que consiste en amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de las mismas, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la composición herbicida puede comprender además una cantidad significativa de ninguna otra SU. Opcionalmente, las composiciones herbicidas pueden comprender además principio/s activo/s que pertenecen a una o más clases adicionales de herbicidas de inhibidores de AHAS, por ejemplo, herbicidas de imidazolinona, y/o uno o más principios activos de otras clases, por ejemplo, fungicidas, bactericidas, algicidas, nematicidas, insecticidas agronómicos y similares.

20 Cada SU tiene su propia tasa de dosis recomendada x1. A continuación, se muestran las tasas de dosis x1 para los principios activos de SU útiles en el presente documento; estas también son aplicables a las formas salinas o de éster de las mismas.

25 Tabla 3. Herbicidas de sulfonilurea y tasas de aplicación

Sulfonilurea/s	x1 (g/ha)
Flupirsulfurón	10
Imazosulfurón	25
Tifensulfurón	30
Tribenurón	30
Amidosulfurón	30
Foramsulfurón	35
Yodosulfurón	10
Mesosulfurón	7,5
Nicosulfurón	30
Mesosulfurón + Yodosulfurón (5:1 p/p)	14,4

Los métodos de control de malas hierbas pre-emergencia o previos a la plantación útiles en diversas realizaciones del presente documento utilizan tasas de aplicación >x0,5 de SU aplicadas en el transcurso de aproximadamente 30 días antes de la emergencia; en algunas realizaciones, esto puede ser ≥ x0,6, ≥ x0,7, ≥ x0,8, ≥ x0,9 o ≥ x1 de SU.

30 Además, se ha encontrado que simplemente las plantas de WOSR tolerantes al arrastre carecen de tolerancia a, o muestran una tolerancia insuficiente, a tratamientos con SU post-emergencia. Como resultado de ello, los métodos de control de malas hierbas post-emergencia útiles en diversas realizaciones del presente documento utilizan tasas de aplicación de SU ≥ x0,25; en algunas realizaciones, estas pueden ≥ x0,3, ≥ x0,4, ≥ x0,5, ≥ x0,6, ≥ x0,7, ≥ x0,8, ≥ x0,9 o ≥ x1 de SU.

35 Los métodos de selección para las plantas de *Brassica* invernales tolerantes a herbicidas también se pueden realizar usando estos parámetros del método de tratamiento, en los que no haya malas hierbas en las inmediaciones de la planta de *Brassica* o su locus de plantación.

40 En cualquiera de los métodos de control de malas hierbas pre-emergencia o post-emergencia del presente documento, el método puede utilizar tasas de aplicación de SU x1 sin dañar de forma significativa a la planta; en algunas realizaciones del mismo, la tasa de aplicación puede superar SU x1; en algunas realizaciones, la tasa puede ser de hasta SU x4, aunque más normalmente será de aproximadamente x2,5 o inferior, o de aproximadamente x2 o inferior. Cuando se emplea una combinación de estos principios activos de SU, la tasa de aplicación de herbicida proporcionará preferentemente una tasa sumada que se encuentra en el intervalo de SU > x0,5 a x4 o x0,25 a x4. Por ejemplo, una combinación 5:1 p/p de mesosulfurón y yodosulfurón que tiene una tasa de dosis x1 de 18 g/ha proporcionará, si se aplica a esa tasa, aproximadamente 15 g/ha y 3 g/ha de estos principios activos, respectivamente: estas son tasas de aplicación de aproximadamente x2 y x0,3, que proporcionan una tasa total de tratamiento con SU de aproximadamente SU x2,3.

- Las composiciones herbicidas del presente documento que comprenden un herbicida seleccionado del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y 5 opcionalmente otros principios activos agrofumícos, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, pueden usarse en cualquier formato agronómicamente aceptable. Por ejemplo, se pueden 10 formular como soluciones acuosas, polvos, suspensiones listos para pulverizar; como soluciones, suspensiones o dispersiones acuosas, oleosas o de otro tipo, concentradas o altamente concentradas; como emulsiones, dispersiones de aceite, pastas, polvos finos, gránulos u otros formatos de amplio espectro. Las composiciones herbicidas se pueden aplicar por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, pulverización, 15 atomización, espolvoreo, dispersión, riego, tratamiento de semillas o coplantación en mezcla con la semilla. Las formas de uso dependen del fin previsto; en cualquier caso, deberían garantizar la distribución más fina posible de los principios activos.
- Cuando el principio activo opcional incluye un inhibidor de AHAS, este se puede seleccionar de: (1) las imidazolinonas, es decir, imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, imazaquin e imazometabenz, preferentemente de imazamox, imazetapir, imazapir e imazapic, preferentemente imazamox; (2) los pirimidinilbenzoatos, es decir, 20 incluyendo los pirimidiniloxibenzoatos (por ejemplo, bispiribac, piriminobac y piribenzoxim) y los pirimidiniltiobenzoatos (por ejemplo, piritobac y piritalida); y (3) las sulfonamidas, es decir, incluyendo las sulfonilaminocarboniltriazolinonas (por ejemplo, flucarbazona y propoxicarbazona) y las triazolopirimidinas (por ejemplo, cloransulam, diclosulam, floralsulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam). Las sales y los ésteres agronómicamente aceptables de los anteriores también están incluidos, como lo están las combinaciones de los mismos.
- Cuando el principio activo incluye un herbicida de una clase diferente a los que normalmente serían susceptibles las plantas de *Brassica* de invierno, la planta de *Brassica* de invierno que se usará se selecciona de entre aquellas que además comprenden un rasgo de tolerancia a dicho herbicida. Dichos rasgos de tolerancia adicionales se pueden proporcionar a la planta mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, incluyendo técnicas de 25 reproducción tradicional para obtenerse un gen de rasgo de tolerancia mediante hibridación o introgresión, mutagénesis, genoplastia y/o transformación. Dichas plantas se pueden describir como aquellas que tienen rasgos "apilados".
- Los principios activos de herbicidas de sulfonilurea útiles en diversas realizaciones del presente documento incluyen 30 los enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4: Principios activos de herbicidas de sulfonilurea

Principio activo de SU	Sal o éster ilustrativo	"Otra SU"
amidosulfurón		-
azimsulfurón		Otra
bensulfurón	bensulfurón-metilo	Otra
clorimurón	clorimurón-etilo	Otra
clorsulfurón		Otra
cinosulfurón		Otra
ciclosulfamurón		Otra
etametsulfurón	etametsulfurón-metilo	Otra
etoxisulfurón		Otra
flazasulfurón		Otra
flucetosulfurón		Otra
flupirsulfurón	flupirsulfurón-metilo-sódico	-
foramsulfurón		-
halosulfurón	halosulfurón-metilo	Otra
imazosulfurón		-
yodosulfurón	yodosulfurón-metilo-sódico	-
mesosulfurón	mesosulfurón-metilo	-
metazosulfurón		Otra
metsulfurón	metsulfurón-metilo	Otra
nicosulfurón		-

ortosulfamurón		Otra
oxasulfurón		Otra
primisulfurón	primisulfurón-metilo	Otra
propirisulfurón		Otra
prosulfurón		Otra
pirazosulfurón	pirazosulfurón-etilo	Otra
rimsulfurón		Otra
sulfometurón	sulfometurón-metilo	Otra
sulfosulfurón		Otra
tifensulfurón	tifensulfurón-metilo	-
triasulfurón		Otra
tribenurón	tribenurón-metilo	-
trifloxisulfurón	trifloxisulfurón-sódico	Otra
triflusulfurón	triflusulfurón-metilo	Otra
tritosulfurón		Otra

En algunas realizaciones, una composición herbicida de las mismas que comprende una SU seleccionada del grupo que consiste en amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de las mismas, y

5 combinaciones de las mismas, opcionalmente pueden comprender además una cantidad, en general no superior al 50 % del contenido de SU de la composición, de una o más otras SU. Como se usa en el presente documento, "Otra SU" se refiere a los principios activos de SU enumerados como "Otra" en la Tabla [4], junto con sus sales y ésteres agronómicamente aceptables, y combinaciones de los mismos.

10 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser del 50 % o inferior en peso (% en peso) del contenido de SU de la composición, o aproximadamente o menos del 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso de los mismos; y, en ese intervalo, puede ser: 0 % en peso o más del contenido de SU de la composición, o aproximadamente o más del 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 45 % en peso de los mismos.

15 15 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "sustancial", es decir, en este contexto significa menos del 50 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 35 % en peso a menos del 50 % en peso.

20 20 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "moderada", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 35 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 20 % en peso al aproximadamente 35 % en peso.

25 25 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "baja", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 20 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 10 % en peso al aproximadamente 20 % en peso.

30 30 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "minoritaria", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 10 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 5 % en peso al aproximadamente 10 % en peso.

35 35 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "mínima", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 5 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 3 % en peso al aproximadamente 5 % en peso.

40 40 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "significativa", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 3 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 1 % en peso al aproximadamente 3 % en peso.

45 45 En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser no superior a una cantidad "traza", es decir, en este contexto significa aproximadamente o menos del 1 % en peso del contenido de SU de la composición, por ejemplo, del aproximadamente 1 % en peso a más del 0 % en peso.

En algunas realizaciones, el contenido de Otra SU de la composición herbicida puede ser del 0 % en peso o puede ser del aproximadamente 0 % en peso, por ejemplo, del aproximadamente 0.5 % en peso al 0 % en peso.  
En la lista anterior de intervalos de contenido de Otra SU de la composición herbicida, en aquellas jurisdicciones en

las que el término "aproximadamente" es inadmisible, esta lista de intervalos se debe leer sin dicho término. En cualquier parte restante de la Descripción en la que se use el término "aproximadamente", la Descripción se leerá sin dicho término en aquellas jurisdicciones en las que el término "aproximadamente" sea inadmisible.

- 5 Los principios activos opcionales de otras clases de herbicidas incluyen inhibidores de ACCasa, inhibidores de PPO, inhibidores de EPSPS, inhibidores de glutamina sintetasa, inhibidores de *p*-hidroxifenilpirimidato dioxigenasa (4-HPD). Los principios activos opcionales de otros tipos incluyen, pero sin limitación, fungicidas tales como estrobilurinas, por ejemplo, piraclostrofina; insecticidas tales como nematicidas, lepidoptericidas, coleoptericidas; molusquicidas, y otros conocidos en la técnica.
- 10 Las composiciones herbicidas que comprenden un herbicida seleccionado del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otros principios activos agonómicos, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, pueden comprender también adyuvantes que sean habituales para la formulación de agentes de protección de cultivos.
- 15 Los ejemplos de adyuvantes habituales para la formulación de agentes de protección de cultivos incluyen sustancias auxiliares inertes, vehículos sólidos, tensioactivos (tales como dispersantes, coloides protectores, emulsionantes, agentes humectantes y agentes de pegajosidad), espesantes orgánicos e inorgánicos, agentes penetrantes (tales como tensioactivos de organosilicona potenciadores de la penetración o quelatos de sulfato ácido, por ejemplo, CT-301™ disponible en Cheltec, Inc.), protectores, bactericidas, agentes anticongelantes, antiespumantes, colorantes y adhesivos. Las formulaciones de las composiciones herbicidas útiles en el presente documento se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido como útil en la técnica.
- 20 Los ejemplos de espesantes (es decir, compuestos que confieren a la formulación propiedades de flujo modificadas, es decir, alta viscosidad en estado de reposo y baja viscosidad en movimiento) son polisacáridos, tales como goma de xantano (Kelzan® de Kelco), Rhodopol® 23 (Rhone Poulenc) o Veegum® (de R.T. Vanderbilt), y también minerales de láminas orgánicas e inorgánicas, tales como Attaclay® (de Engelhardt).
- 25 Los ejemplos de antiespumantes son emulsiones de silicona (tales como, por ejemplo, Silikon® SRE, Wacker o Rhodorsil® de Rhodia), alcoholes de cadena larga, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, compuestos organofluorados y mezclas de los mismos.
- 30 Se pueden añadir bactericidas para estabilizar las formulaciones herbicidas acuosas. Son ejemplos de bactericidas los bactericidas a base de diclorofeno y alcohol bencílico hemiformal (Proxel® de ICI o Acticide® RS de Thor Chemie y Kathon® MK de Rohm & Haas), y también derivados de isotiazolinona tales como alquilisotiazolinonas y bencisotiazolinonas (Acticide MBS de Thor Chemie).
- 35 40 Son ejemplos de agentes anticongelantes el etilenglicol, propilenglicol, urea o glicerol.
- 45 Los ejemplos de colorantes incluyen miembros de clases de colorantes tales como los pigmentos poco hidrosolubles y los colorantes hidrosolubles. Algunos ejemplos específicos de estos incluyen los colorantes conocidos con los nombres Rodamina B, C.I. Pigmento Rojo 112 y C.I. Disolvente Rojo 1, y también 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 55 Son ejemplos de adhesivos polivinilpirrolidona, poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico) y tilosa. Los adyuvantes inertes adecuados son, por ejemplo, los siguientes:
- fracciones de aceite mineral de punto de ebullición medio a alto, tales como queroseno y gasoil, además de aceites de alquitrán de hulla y aceites de origen vegetal o animal, hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, por ejemplo, parafina, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados y sus derivados, bencenos alquilados y sus derivados, alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, butanol y ciclohexanol, cetonas tales como ciclohexanona o disolventes fuertemente polares, por ejemplo, aminas tales como N-metilpirrolidona y agua.
- 60 Los vehículos adecuados incluyen vehículos líquidos y sólidos.
- Los vehículos líquidos incluyen, por ejemplo, disolventes no acuosos tales como hidrocarburos cíclicos y aromáticos, por ejemplo, parafinas, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados y sus derivados, bencenos alquilados y sus derivados, alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, butanol y ciclohexanol, cetonas tales como

ciclohexanona, disolventes fuertemente polares, por ejemplo, aminas tales como N-metilpirrolidona y agua, así como mezclas de las mismas.

- 5 Los vehículos sólidos incluyen, por ejemplo, tierras minerales tales como sílices, geles de sílice, silicatos, talco, caolín, caliza, cal, tiza, tronco, loess, arcilla, dolomita, tierra de diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio y óxido de magnesio, materiales sintéticos triturados, fertilizantes tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio y ureas, y productos de origen vegetal, tales como harina de cereales, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa u otros vehículos sólidos.
- 10 Los tensioactivos adecuados (adyuvantes, agentes humectantes, agentes de pegajosidad, dispersantes y también emulsionantes) son las sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos y sales de amonio de ácidos sulfónicos aromáticos, por ejemplo ácidos lignosulfónicos (por ejemplo, tipos Borrespers, Borregaard), ácidos fenolsulfónicos, ácidos naftalenosulfónicos (tipos Morwet, Akzo Nobel) y ácido dibutilnaftalenosulfónico (tipos Nekal, BASF AG) y de ácidos grasos, sulfonatos de alquilo y alquilarilo, sulfatos de alquilo, sulfatos de lauriléter y sulfatos de alcoholes grasos, y sales de hexa-, hepta- y octadecanoles sulfatados, y también de glicoléteres de alcohol graso, condensados de naftaleno sulfonado y sus derivados con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácidos naftalenosulfónicos con fenol y formaldehído, polioxietilen-octilfenoléter, isoocítil-, octil- o nonilfenol etoxilados., alquilfenil- o tributilfenil-poliglicoléter, alcoholes de alquilarilpoliéter, alcohol isotridecílico, condensados de alcohol graso/óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, alquiléteres de polioxietileno o alquiléteres de polioxipropileno, acetato de poliglicoléter de alcohol laurílico, ésteres de sorbitol, licores residuales y proteínas de lignosulfato, proteínas desnaturalizadas, polisacáridos (por ejemplo, metilcelulosa), almidones hidrofóbicamente modificados, alcohol polivinílico (tipos Mowiol, Clariant), policarboxilatos (BASF AG, tipos Sokalan), polialcoxilatos, polivinilamina (BASF AG, tipos Lupamina), polietilenimina (BASF AG, tipos Lupasol), polivinilpirrolidona y copolímeros de los mismos.
- 15 25 Los polvos, materiales para radiodifusión y polvos finos se pueden preparar mezclando o moliendo de forma concomitante los principios activos junto con un vehículo sólido.
- 30 Se pueden preparar gránulos, por ejemplo, gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, uniendo los principios activos a vehículos sólidos.
- 35 Se pueden preparar formas de uso acuoso a partir de concentrados en emulsión, suspensiones, pastas, polvos humectables o gránulos dispersables en agua añadiendo agua.
- 40 45 Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones oleosas, se pueden homogenizar en agua las composiciones herbicidas que comprenden un herbicida seleccionado del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agonómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, bien como tales o disueltas en un aceite o un disolvente, por medio de un agente humectante, agente de pegajosidad, dispersante o emulsionante. Como alternativa, también es posible preparar concentrados que comprendan compuesto activo, agente humectante, agente de pegajosidad, dispersante o emulsionante y, si se desea, disolvente o aceite, que sean adecuados para la dilución con agua.
- 50 55 En la formulación de los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agonómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, los principios activos, por ejemplo, los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agonómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, están presentes en forma suspendida, emulsionada o disuelta. La formulación puede estar en forma de soluciones

acuosas, polvos, suspensiones, también suspensiones o dispersiones acuosas, oleosas o de otro tipo altamente concentradas, emulsiones acuosas, microemulsiones acuosas, suspoemulsiones acuosas, dispersiones oleosas, pastas, polvos finos, materiales para esparcir o gránulos.

- 5 Los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, se pueden formular, por ejemplo, de la 10 siguiente manera:

1. Productos para dilución con agua

A. Concentrados hidrosolubles

15 Se disuelven 10 partes en peso del compuesto activo en 90 partes en peso de agua o un disolvente hidrosoluble. Como alternativa, se añaden agente/s humectante/s u otros adyuvantes. El compuesto activo se disuelve tras la dilución con agua. Esto da una formulación con un contenido de compuesto activo del 10 % en peso.

20 B. Concentrados dispersables

Se disuelven 20 partes en peso del compuesto activo en 70 partes en peso de ciclohexanona con la adición de 10 partes en peso de un dispersante, por ejemplo, polivinilpirrolidona. La dilución con agua da una dispersión. El contenido de compuesto activo es del 20 % en peso.

25 C. Concentrados emulsionables

Se disuelven 15 partes en peso del compuesto activo en 75 partes en peso de disolvente orgánico (por ejemplo, alquilaromáticos) con la adición de dodecilbencenosulfonato de calcio y etoxilato de aceite de ricino (en cada caso, 5 partes en peso). La dilución con agua da una emulsión. La formulación tiene un contenido de compuesto activo del 15 % en peso.

D. Emulsiones

- 35 Se disuelven 25 partes en peso del compuesto activo en 35 partes en peso de disolvente orgánico (por ejemplo, alquilaromáticos) con la adición de dodecilbencenosulfonato 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 por medio de un emulsionante (Ultraturrax) y se transforma en una emulsión homogénea. La dilución con agua da una emulsión. La formulación tiene un contenido de compuesto activo del 25 % en peso.

40 E. Suspensiones

- 45 En un molino de bolas agitado, se trituran 20 partes en peso de compuesto activo con la adición de 10 partes en peso de dispersantes y agente/s humectante/s y 70 partes en peso de agua o un disolvente orgánico, dando una suspensión de compuesto activo fino. La dilución con agua da una suspensión estable del compuesto activo. El contenido de compuesto activo en la formulación es del 20 % en peso.

F. Gránulos hidrodispersables y gránulos hidrosolubles

- 50 Se trituran finamente 50 partes en peso de compuesto activo con la adición de 50 partes en peso de dispersantes y agente/s humectante/s y se preparan en gránulos hidrodispersables o hidrosolubles por medio de aparatos técnicos (por ejemplo, extrusión, torre de pulverización, lecho fluidizado). La dilución con agua da una dispersión o solución estable del compuesto activo. La formulación tiene un contenido de compuesto activo del 50 % en peso.

55 G. Polvos hidrodispersables y polvos hidrosolubles

Se trituran 75 partes en peso del compuesto activo en un molino rotor-estator con la adición de 25 partes en peso de dispersantes, agente/s humectante/s y gel de sílice. La dilución con agua da una dispersión o solución estable del compuesto activo. El contenido de compuesto activo de la formulación es del 75 % en peso.

60 H. Formulaciones de gel

- 65 En un molino de bolas, se mezclan 20 partes en peso de compuesto activo, 10 partes en peso de dispersante, 1 parte en peso de agente gelificante y 70 partes en peso de agua o de un disolvente orgánico, dando una suspensión fina. La dilución con agua da una suspensión estable con un contenido de compuesto activo del 20 % en peso.

## 2. Productos que se aplicarán sin diluir

## I. Polvos finos

5 Se trituran finamente 5 partes en peso del compuesto activo y se mezclan íntimamente con 95 partes en peso de caolín finamente dividido. Esto da un polvo para espolvorear con un contenido de compuesto activo del 5 % en peso.

## J. Gránulos (GR, FG, GG, MG)

10 Se trituran finamente 0,5 partes en peso del compuesto activo y se asocian con 99,5 partes en peso de vehículos. Los métodos actuales del presente documento son la extrusión, el secado por pulverización o el lecho fluidizado. Esto da gránulos para su aplicación sin diluir con un contenido de compuesto activo del 0,5 % en peso.

## K. Soluciones de ULV (UL)

15 Se disuelven 10 partes en peso del compuesto activo en 90 partes en peso de un disolvente orgánico, por ejemplo xileno. Esto da un producto para su aplicación sin diluir con un contenido de compuesto activo del 10 % en peso.

20 Se pueden preparar formas de uso acuoso a partir de concentrados en emulsión, suspensiones, pastas, polvos humectables o gránulos hidrodispersables añadiendo agua.

25 Los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, o las composiciones herbicidas que los comprenden se pueden aplicar de forma pre-emergencia, post-emergencia o previa a la plantación, o junto con semillas de planta de colza de semilla oleaginosa invernal resistente a las imidazolinonas. También es posible aplicar la composición herbicida o los compuestos activos mediante la aplicación en semillas, previamente tratadas 30 con las composiciones herbicidas o los compuestos activos, de una planta de cultivo.

35 En una realización adicional, los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, se pueden aplicar mediante el tratamiento de semillas. El tratamiento de semillas comprende esencialmente todos los procedimientos conocidos por los expertos en la materia (aderezo de semillas, recubrimiento de semillas, espolvoreo de semillas, remojo de semillas, recubrimiento de película de semillas, recubrimiento multicapa de 40 semillas, incrustaciones de semillas, goteo de semillas y granulación de semillas) basados en los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las 45 mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola o las composiciones preparadas a partir de los mismos. En el presente documento, las composiciones herbicidas se pueden aplicar diluidas o sin diluir.

50 El término "semilla" comprende semillas de todos los tipos, tales como, por ejemplo, callos, semillas, frutos, tubérculos, plántulas y formas similares. En el presente documento, preferentemente, el término semilla describe callos y semillas.

La semilla usada puede ser semilla de las plantas útiles mencionadas anteriormente, pero también la semilla de plantas transgénicas o plantas obtenidas mediante métodos de reproducción habituales.

55 Para ampliar el espectro de acción, el/los principio/s activo/s de SU seleccionado/s del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, puede/n mezclarse con un gran número de representantes de otros herbicidas o grupos de principios activos reguladores del crecimiento, y luego aplicarse de forma concomitante. Los componentes adecuados para las mezclas son, por ejemplo, 1,2,4-tiadiazoles, 1,3,4-tiadiazoles, amidas, ácido aminofosfórico y sus derivados, aminotriazoles, anilidas, ácidos (het)ariloalcanoides y sus derivados, ácido benzoico y sus derivados, benzotiadiazinonas, 2-aroil-1,3-ciclohexanodionas, 2-hetaroil-1,3-ciclohexanodionas, hetaryl-aryl-cetonas, 60 bencilisoxazolidinonas, derivados de meta-CF<sub>3</sub>-fenilo, carbamatos, ácido quinolincarboxílico y sus derivados, cloroacetanilidas, derivados de éter de ciclohexenona-oxima, diazinas, ácido dicloropropiónico y sus derivados, 65

dihidro-benzofuranos, dihidrofuran-3-onas, dinitroanilinas, dinitrofenoles, éteres de difenilo, dipiridilos, ácidos halocarboxílicos y sus derivados, ureas, 3-feniluracilos, imidazoles, imidazolinonas, N-fenil-3,4,5,6-tetrahidroftalimidas, oxadiazoles, oxiranos, fenoles, ésteres ariloxi- y hetariloxi-fenoxipropiónicos, ácido fenilacético y sus derivados, ácido 2-fenilpropiónico y sus derivados, pirazoles, fenilpirazoles, piridazinas, ácido piridincarboxílico y sus derivados, pirimidiléteres, sulfonamidas, sulfonilureas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, triazolcarboxamidas, uracilos, fenilpirazolinas e isoxazolininas y sus derivados.

Además, puede ser beneficioso aplicar los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agonómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola solos o en combinación con otros herbicidas, o en forma de una mezcla con otros agentes de protección de cultivos, por ejemplo, junto con agentes para controlar plagas u hongos fitopatógenos o bacterias. También es de interés la miscibilidad con soluciones de sales minerales, que se emplean para tratar deficiencias nutricionales y de oligoelementos. También se pueden añadir otros aditivos tales como aceites no fitotóxicos y concentrados de aceite.

Además, puede ser útil aplicar los herbicidas seleccionados del grupo de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, en combinación con protectores. Los protectores son compuestos químicos que evitan o reducen la lesión inducida por herbicidas a plantas útiles sin tener un impacto importante en la acción herbicida de los herbicidas amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agonómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, hacia plantas no deseadas. Se pueden aplicar bien antes de las siembras (por ejemplo, en tratamientos de semillas, brotes o plántulas) o en la aplicación pre-emergencia o post-emergencia de la planta útil. Los protectores y los herbicidas amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente otro/s principio/s activo/s agronómico/s, por ejemplo, una o más imidazolinonas seleccionadas del grupo de imazamox, imazetapir, imazapir, imazapic, combinaciones de las mismas, y sus sales y ésteres adecuados desde el punto de vista agrícola, se pueden aplicar4 de manera simultánea o por orden.

Los protectores adecuados son, por ejemplo, ácidos (quinolin-8-oxi)acéticos, ácidos 1-fenil-5-haloalquil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxílicos, ácidos 1-fenil-4,5-dihidro-5-alquil-1H-pirazol-3,5-dicarboxílicos, ácidos 4,5-dihidro-5,5-diaril-3-isoxazol-carboxílicos, dicloroacetamidas, alfa-oximinofenilacetonitrilos, acetofenonoximas, 4,6-dihalo-2-fenilpirimidinas, amidas N-[[4-(aminocarbonil)fenil]sulfonil]-2-benzoicas, anhídrido 1,8-naftálico, ácidos 2-halo-4-(haloalquil)-5-thiazol-carboxílicos, fosfortiolatos y N-alquil-O-fenil-carbamatos y sus sales aceptables desde el punto de vista agrícola y sus derivados aceptables desde el punto de vista agrícola tales como amidas, ésteres y tioésteres, siempre que tengan un grupo ácido.

#### 45 Métodos de control de las malas hierbas

Las plantas tolerantes a herbicidas descritas en el presente documento se pueden usar junto con un herbicida al que son tolerantes. Los herbicidas se pueden aplicar a las plantas usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Los herbicidas se pueden aplicar en cualquier punto del proceso de cultivo de la planta. Por ejemplo, los herbicidas se pueden aplicar antes de plantar, al plantar, pre-emergencia, post-emergencia o combinaciones de los mismos.

55 Las composiciones herbicidas del presente documento se pueden aplicar, por ejemplo, como tratamientos foliares, tratamientos del suelo, tratamientos de semillas o inmersiones en el suelo. La aplicación puede realizarse, por ejemplo, mediante pulverización, espolvoreo, radiodifusión o cualquier otro modo conocido útil en la técnica.

60 Los herbicidas se pueden usar para controlar el crecimiento de malas hierbas que se pueden encontrar creciendo en las proximidades de las plantas tolerantes a herbicidas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se puede aplicar un herbicida a una parcela en la que las plantas tolerantes a herbicidas crecen próximas a malas hierbas. Entonces, se puede aplicar un herbicida al que sea tolerante la planta tolerante a herbicidas en la parcela a una concentración suficiente para matar o inhibir el crecimiento de las malas hierbas. Las concentraciones de herbicida suficientes para matar o inhibir el crecimiento de malas hierbas son conocidas en la técnica y se desvelan anteriormente.

65 Los métodos de control de malas hierbas también pueden incluir una etapa de selección de una planta de *Brassica*

de tipo invernal capaz de tolerar la composición herbicida de SU. Como se usa en el presente documento, una etapa de selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal capaz de tolerar la composición herbicida de SU puede realizarse escogiendo la planta que se vaya a cultivar, o escogiendo una primera persona que una segunda persona escoja la planta que se vaya a cultivar. Por ejemplo, un productor de *Brassica* puede estar operando como un multiplicador de semillas para producir semillas, u operando como un productor de granos para producir granos u otros productos para el mercado. En cualquier caso, el productor de *Brassica* puede escoger por sí mismo qué variedad de *Brassica* cultivar, o puede dejar que otro escoja qué variedad de *Brassica* va a cultivar, o puede haber escogido previamente mediante acuerdo contractual previo cultivar una variedad de *Brassica* que será escogida por una tercera persona, por ejemplo, de conformidad con un contrato de servicio, un contrato a plazo u otro acuerdo. Todos los modos en los que un productor de *Brassica* escoje qué variedad de *Brassica* cultivar pueden constituir una etapa en la selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal.

#### Métodos que proporcionan protección del rendimiento

Los métodos para plantación, cultivo y tratamiento con composiciones herbicidas de SU de plantas de *Brassica* de tipo invernal de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención pueden proporcionar protección del rendimiento a una cosecha de *Brassica* de tipo invernal desarrollada en presencia de una composición herbicida de sulfonilurea (SU). Los métodos pueden comprender:

sembrar una semilla de una planta de *Brassica* de tipo invernal en presencia de la composición herbicida de SU descrita en el presente documento; y cultivar la semilla en condiciones que produzcan la planta de *Brassica* de tipo invernal; en los que dicha planta de *Brassica* comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en los que solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT) que es W574X y que es un gen mono-SU-HT-AHASL, que puede codificar opcionalmente otras mutaciones HT, y

en los que dicho gen mono-SU-HT-AHASL está ubicado en el genoma A de dicha *Brassica*; en los que el rendimiento puede ser igual o superior a la proporcionada por una versión de tipo silvestre del mismo tipo de planta de *Brassica* de tipo invernal.

Estos métodos también pueden comprender:

plantar una semilla de una planta de *Brassica* de tipo invernal; cultivar la semilla en condiciones que produzcan la planta de *Brassica* de tipo invernal; y realizar un tratamiento con herbicida de la planta aplicando una composición herbicida descrita en el presente documento, que comprende sulfonilurea/s (SU), a la planta y sus proximidades inmediatas; en los que dicha planta de *Brassica* comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en los que solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea (SU-HT) que es W574X y que es un gen SU-HT-AHASL, que puede codificar opcionalmente otra/s mutación/es HT, y en los que dicho gen mono-SU-HT-AHASL está ubicado en el genoma A de dicha *Brassica*;

en los que el rendimiento puede ser igual o superior a la proporcionada por una versión de tipo silvestre del mismo tipo de planta de *Brassica* de tipo invernal. El tratamiento con herbicida puede ser un tratamiento de previo a la floración de la planta.

Los métodos para proporcionar protección del rendimiento también pueden incluir una etapa de selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal capaz de tolerar la composición herbicida de SU.

Los métodos para proporcionar protección del rendimiento pueden comprender además cosechar semillas producidas por las plantas de *Brassica* de tipo invernal. Estos métodos también pueden controlar las malas hierbas en las proximidades de las plantas de *Brassica* de tipo invernal.

Como se usa en el presente documento, "protección del rendimiento" incluye, pero sin limitación, un riesgo reducido de pérdida de cultivo, de reducción del rendimiento o ambos. Los efectos negativos de las composiciones herbicidas de SU en plantas de *Brassica* de tipo invernal pueden incluir, pero sin limitación, la muerte; la lesión transitoria de la planta; el retraso en el crecimiento; la alteración de la maduración; síntomas de lesiones visuales significativas; reducción de la densidad de la planta en el campo (es decir, menos plantas en la población); y aumentos en la proporción de plantas que presentan un retraso de la maduración, una menor estatura (menos biomasa) y/o lesión por enfermedad o ataque de insectos que comienza durante períodos de fase de estrés/marchitez metabólica temporal (es decir, lesión transitoria por herbicida de SU). Las plantas de *Brassica* de tipo invernal no tolerantes a la SU, normalmente sufren efectos negativos en presencia de composiciones herbicidas de SU; y las plantas de *Brassica* de tipo invernal que solo son tolerantes a las cantidades residuales de herbicidas de SU también pueden sufrir efectos negativos. Sin embargo, las plantas *Brassica* de tipo invernal empleadas en los métodos de la invención son más resistentes a la exposición a dichas composiciones herbicidas de SU. Por lo tanto, una cosecha de *Brassica* de tipo invernal desarrollada a partir de plantas de *Brassica* de tipo invernal tolerantes a SU puede proporcionar un mayor rendimiento que dichas plantas susceptibles o tolerantes residuales a los herbicidas de SU

cultivadas en presencia de composiciones herbicidas de SU.

Una serie de deseos puede motivar la etapa de selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal capaz de tolerar las composiciones herbicidas de SU. Por ejemplo, y sin limitación, un productor de *Brassica* puede desear: (1)

- 5 controlar malas hierbas de los cultivos de *Brassica* usando una aplicación de SU, en los que una aplicación de herbicida de SU no podría aplicarse de lo contrario a dicho cultivo de *Brassica* sin provocar un daño o una pérdida sustancial del cultivo; o (2) evitar o disminuir el riesgo de daño permanente o transitorio a los cultivos por restos de SU en el suelo, o evitar o disminuir dicho riesgo mejor de lo que puede el uso de una *Brassica* que solo es tolerante a los restos de SU; o (3) evitar o disminuir el riesgo de daño permanente o transitorio del cultivo por residuos de SU 10 presentes en tanques reutilizados para preparar o suministrar otros productos agronómicos al cultivo, o evitar o disminuir ese riesgo mejor de lo que puede el uso de una *Brassica* que solo es tolerante a residuos de SU. La elección de las plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento puede lograr estos objetivos.

15 Un productor de *Brassica* puede desear controlar las malas hierbas de los cultivos de *Brassica* usando una aplicación de SU. Entre las malas hierbas de los cultivos de *Brassica* que se pueden tratar están, por ejemplo,, hierbas de la familia *Brassicaceae* tales como nabo silvestre (*Brassica tournefortii*), bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*), mostaza de oreja de liebre (*Conringia orientalis*), mostaza de semilla de lombriz (*Erysimum cheiranthoides*; *Treacle mustard*), hierba de Buchan (*Hirschfeldia incana*), pasto de pimienta común (*Lepidium virginicum*; pimentón de Virginia), hierba de almizcle (*Myagrum perfoliatum*), mostaza bola (*Neslia paniculata*), rábano silvestre (*Raphanus raphanistrum*), hierba de nabo (*Rapistrum rugosum*), mostaza silvestre (*Sinapis arvensis*; *Charlock*), mostaza de cobertura india (*Sisymbrium orientale*), Flixweed (*Sisymbrium sophia*; mostaza de Tansy; Fluxweed) y Chamico (*Thlaspi arvense*; *Field pennycress*). Dichas malas hierbas de la familia *Brassicaceae* pueden ser problemáticas de controlar en los cultivos tradicionales de *Brassica*. La elección de las plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento puede lograr estos objetivos

25 Como se usa en el presente documento, la etapa de selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal capaz de tolerar la composición herbicida de SU puede ser realizada por una persona que escoja la planta que se vaya a cultivar, o escogiendo una primera persona que una segunda persona escoja la planta que se vaya a cultivar. Por ejemplo, un productor de *Brassica* puede estar operando como un multiplicador de semillas para producir semillas, u 30 operando como un productor de granos para producir granos u otros productos para el mercado. En cualquier caso, el productor de *Brassica* puede escoger por sí mismo qué variedad de *Brassica* cultivar, o puede dejar que otro escoja qué variedad de *Brassica* va a cultivar, o puede haber escogido previamente mediante acuerdo contractual previo cultivar una variedad de *Brassica* que será escogida por una un tercero, por ejemplo, de conformidad con un contrato de servicio, un contrato a plazo u otro acuerdo. Todos los modos en los que un productor de *Brassica* 35 escoge qué variedad de *Brassica* cultivar pueden constituir una etapa en la selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal.

40 Un cultivo de las plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento que se cultivan en suelo que contiene herbicidas de SU y que contienen opcionalmente herbicidas que inhiben AHAS de sulfonamida y/o imidazolinona, puede lograr un mayor rendimiento que un cultivo de plantas de *Brassica* de tipo invernal de la correspondiente estirpe isogénica de tipo silvestre cultivada en las mismas condiciones que contienen herbicidas. Además, un cultivo de las plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento que se expone a herbicidas de SU de pulverizadores contaminados con herbicidas de SU de sobras de tanques de mezcla de 45 herbicidas proporciona un beneficio de protección del rendimiento en comparación con las plantas de *Brassica* de tipo invernal de la correspondiente estirpe isogénica de tipo silvestre.

50 Los cultivos de plantas de *Brassica* de tipo invernal descritas en el presente documento pueden producir rendimientos sustancialmente equivalentes cuando se exponen a herbicidas de SU y cuando no se exponen a herbicidas de SU, cuando se cultivan en condiciones similares. Además, los cultivos de plantas de *Brassica* de tipo invernal pueden alcanzar producciones iguales cuando se exponen a herbicidas de SU de pulverizadores contaminados y cuando no se exponen a herbicidas de SU de pulverizadores contaminados, cuando se cultivan en condiciones por lo demás similares.

55 Cultivo de *Brassica* de tipo invernal que contiene el gen AHASL que codifica la mutación de P 197(At) o W574(At) y que se ubica en cualquier genoma de *Brassica*.

60 En el presente documento, también se describen plantas de *Brassica* de tipo invernal que tienen un gen de AHASL plastídica expresable que codifica una mutación en P197(At) o W574(At) ubicada en cualquier genoma, por ejemplo, un genoma A, B o C de *Brassica*. Esta es una excepción a las plantas de *Brassica* descritas anteriormente en las que el gen AHASL tolerante a herbicidas solo puede ubicarse en el genoma A de *Brassica*. Las plantas en las que la WOSR u otro cultivo de *Brassica* de tipo invernal contiene un gen de AHASL plastídica expresable que codifica una mutación en P197(At) o W574(At), si esa mutación está codificada en un alelo del genoma B o C de *Brassica*, también debe codificarse al menos una mutación adicional, en el mismo o diferente gen de AHASL plastídica expresable, donde esa mutación se selecciona de aquellas sustituciones en los sitios: G121(At), A122(At), M124(At), R142(At), V196(At), R199(At), T203(At), A205(At), F206(At), K256(At), M351(At), H352(At), R373(At), D375(At), 65 D376(At), R377(At), M570(At), V571(At), F578(At), S653(At) y G654(At); y preferentemente en sitios de entre

A122(At), R199(At), A205(At), S653(At) y G654(At); y más preferentemente en S653(At). Las plantas de *Brassica* de tipo invernal de este tipo pueden emplearse en los métodos descritos a lo largo de la descripción detallada de la misma, incluyendo los métodos de control de malas hierbas con la realización de un tratamiento con herbicida post-emergencia, métodos de selección de plantas y métodos para proporcionar protección del rendimiento.

- 5 Un método de control de las malas hierbas en un cultivo de *Brassica* de tipo invernal puede incluir las etapas de: realizar un tratamiento post-emergencia de una planta de *Brassica* tolerante a herbicidas (HT) de dicho cultivo mediante la aplicación de una composición herbicida a la planta y sus proximidades inmediatas, a una tasa de dosis en el intervalo de x0,25 a aproximadamente x4 de SU, en el que dicha composición de herbicida comprende una SU, y dicha planta de *Brassica* (1) comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en el que uno de los genes HT-AHASL codifica una mutación HT de tolerancia a la sulfonilurea (SU-HT) seleccionada de P197X y W574X, y al menos una mutación adicional seleccionada de G121X, A122X, M124X, V196X, R199X, T203X, A205X, F206X, K256X, M351X, H352X, R373X, D375X, D376X, R377X, M570X, V571X, F578X, S653X y G654X; o (2) comprende al menos dos genes AHASL tolerantes a herbicidas (HT-AHASL), en los que un primer gen HT-AHASL codifica una mutación de tolerancia a la sulfonilurea (SU-HT) seleccionada de P197X y W574X, y un segundo gen HT-AHASL codifica una mutación seleccionada de G121X, A122X, M124X, V196X, R199X, T203X, A205X, F206X, K256X, M351X, H352X, R373X, D375X, D376X, R377X, M570X, V571X, F578X, S653X y G654X.
- 10 20 Dicha composición herbicida puede comprender otras formas agronómicamente útiles de sulfonilurea/s. La sulfonilurea se puede seleccionar del grupo que consiste en amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos. La composición herbicida puede comprender una cantidad significativa de ninguna otra SU.
- 15 25 30 Dicha mutación SU-HT se puede seleccionar de P197A, P197S, P197L y W574L. En algunos casos, solo uno de los genes HT-AHASL codifica la mutación SU-HT seleccionada de P197X y W574X. Dicha al menos una mutación adicional se puede seleccionar de A122T, A122Q, A122V, P197L, P197A, P197S, A205V, R199A, A205V, W574L, S653N, G654E y G654D. En algunos casos, dicha al menos una mutación adicional se selecciona de A122T, R199A, A205V, G654E y S653N.

Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen en el presente documento con fines meramente ilustrativos.

### 35 Ejemplos

A continuación, se proporcionan ejemplos específicos de la preparación de las plantas tolerantes a herbicidas que se pueden emplear en los métodos de la invención.

- 40 Como se usa en el presente documento, la lesión "no significativa" de la planta equivale a lesiones con una puntuación de 5 o menos en la escala PHYTOX 0-100, descrita a continuación, preferentemente lesiones con una puntuación de 4, 3, 2, 1 o inferior. En algunas realizaciones, la lesión "no significativa" de la planta puede ser una lesión transitoria que dura 5 días o menos, y preferentemente dura 4, 3, 2 o 1 día o menos.
- 45 Las abreviaturas y los acrónimos usados en el presente documento se definen de la siguiente manera:

DE<sub>50</sub> = dosis eficaz (es decir, dosis requerida para producir un efecto deseado en el 50 % de una población);

50 DDT = Días Despues del Tratamiento;

DDUT = Días Despues del Último Tratamiento;

DDP = Días Despues de la Plantación;

55 FC = Fase de Crecimiento;

BBCH = escala reconocida por la industria para identificar las fases fenológicas del crecimiento de la colza.

### Ejemplo 1

60 Tolerancia a herbicidas en estirpes de plantas de WOSR tolerantes al inhibidor de AHAS en comparación con estirpes de plantas de WOSR susceptibles al inhibidor de AHAS (convencionales).

65 Se siembran plantas de una estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS, por ejemplo, una estirpe de la que se deposita una muestra representativa con el n.º de depósito ATCC 40684, y plantas de una primera estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS en macetas de 10 cm con un suelo de arcilla arenosa. Cada maceta se planta con

dos plantas, las plantas se riegan desde abajo y se fertilizan según sus necesidades. Las macetas se almacenan una al lado de la otra en un invernadero a 12 °C en la fase de germinación. Se aumenta la temperatura hasta 15-20 °C tres semanas después de la siembra.

- 5 Se aplica un tratamiento post-emergencia de herbicidas a las plantas mediante boquillas finas distribuidas y una tasa de uso del agua de 200 l/ha en la fase de crecimiento FC/BBCH 12 (fase de 2 hojas verdaderas). Los herbicidas se ensayan a diferentes tasas. Se llevan a cabo cinco réplicas de la variedad cultivada por tasa.
- 10 La evaluación de la eficacia se evalúa como el daño causado en los cultivos por los herbicidas usando una escala del 0 al 100 %, en comparación con las plantas de control no tratadas. En el presente documento, 0 significa que no hay daños y 100 significa la destrucción completa de las plantas. El nivel de eficacia se evalúa de 21 a 22 días después del tratamiento (DDT). Los resultados de eficacia se presentan como los valores de DE<sub>50</sub>.

TABLA 5

Principio Activo (PA)	Plantas de la primera estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS	Plantas de la estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS
	DE <sub>50</sub> (g/PA/ha)	DE <sub>50</sub> (g/PA/ha)
Tribenurón-metilo	2,59	25,88
Florasulam	1,51	6,53
Flupirsulfurón-metilo sódico	0,58	63.316,17
Metsulfurón-metilo	0,57	5,06
Tritosulfurón	0,39	42,30
Sulfosulfurón	1,70	2.417,06
Propoxicarbazona sódica	2,16	67,43
Yodosulfurón Mesosulfurón	0,27	11,31
Clorsulfurón	0,42	2,8
Trisulfurón-metilo 500	3,36	41,81

## 15 Ejemplo 2

Tolerancia a herbicidas en estirpes de plantas de WOSR tolerantes al inhibidor de AHAS en comparación con estirpes de plantas de WOSR susceptibles al inhibidor de AHAS (convencionales).

- 20 Se siembran plantas de una estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS y una segunda estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS en macetas de 10 cm con un suelo de arcilla arenosa. Cada maceta se planta con dos plantas, las plantas se riegan desde abajo y se fertilizan según sus necesidades. Las macetas se almacenan una al lado de la otra en un invernadero a 12 °C en la fase de germinación. Se aumenta la temperatura hasta 15-20 °C tres semanas después de la siembra.

30 Se aplica un tratamiento post-emergencia de herbicidas a las plantas mediante boquillas finas distribuidas y una tasa de uso del agua de 200 l/ha en la fase de crecimiento FC/BBCH 10. Los herbicidas se ensayan a diferentes tasas. Se llevan a cabo doce réplicas de la variedad cultivada por tasa.

- 35 La evaluación de la eficacia se evalúa como el daño causado en los cultivos por los herbicidas usando una escala del 0 al 100 %, en comparación con las plantas de control no tratadas. En el presente documento, 0 significa que no hay daños y 100 significa la destrucción completa de las plantas. El nivel de eficacia se evalúa 19 días después del tratamiento (DDT). Los resultados de eficacia se presentan como los valores de DE<sub>50</sub>

TABLA 6

Principio activo (PA)	Plantas de la segunda estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS	Plantas de la estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS
	DE <sub>50</sub> (g/PA/ha)	DE <sub>50</sub> (g/PA/ha)
Tribenurón-metilo	0,11	9,11
Florasulam	0,28	4,9
Flupirsulfurón-metilo sódico	0,79	147,97
Metsulfurón-metilo	0,17	2,28

Tritosulfurón	1,76	2,96
Sulfosulfurón	0,01	3,29
Propoxicarbazona sódica	0,17	42,07
Yodosulfurón Mesosulfurón	0,07	0,62
Clorsulfurón	0,04	11,2
Trisulfurón-metilo 500	0,03	4,48

**Ejemplo 3**

Tolerancia potenciada a herbicidas en plantas de estirpes de plantas de WOSR tolerantes a AHAS en comparación con las plantas de estirpes de plantas de colza oleaginosa primaveral (SOSR) tolerantes a AHAS.

Se siembran plantas de una estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS y plantas de una estirpe de SOSR tolerante a AHAS unas al lado de otras en una maceta. Se aplica un tratamiento post-emergencia de herbicidas a las plantas mediante boquillas finas distribuidas en la fase de crecimiento FC/BBCH 12/13. Hay cuatro repeticiones de cada tratamiento.

La evaluación de la tolerancia a los cultivos se realiza como el síntoma PHYTOX causado por los compuestos químicos llevada a cabo usando una escala del 0 al 100 %, en comparación con las plantas de control no tratadas. En el presente documento, 0 significa que no hay daños y 100 significa la destrucción completa de las plantas.

15

TABLA 7

PRINCIPIO ACTIVO (PA)	Tasa del producto (kg/ha)	Variedad del cultivo	WOSR	SOSR
		FC del cultivo de/a/método	14/15/B	13/14/B
		DDT/DDUT/DDP	15/15/37	15/15/37
		Unidad de evaluación	% PHYTOX	% PHYTOX
		Tasa de principio activo (g/ha)		
Flupirsulfurón-metilo sódico	0,01	5	11	19
Tifensulfurón-metilo	0,03	15	13	23
Tritosulfurón	0,035	25	43	53
Tribenurón-metilo	0,03	15	17	25

**Ejemplo 4**

20 Tolerancia a herbicidas potenciada en plantas de estirpes de plantas de WOSR tolerantes al inhibidor de AHAS en comparación con plantas de estirpes de plantas de WOSR susceptibles al inhibidor de AHAS (convencionales).

Se siembran plantas de una estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS y plantas de una estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS unas al lado de otras en una maceta. Se aplica un tratamiento pre-emergencia de herbicidas a las plantas mediante boquillas finas. Hay cuatro repeticiones de cada tratamiento.

La evaluación de la tolerancia a los cultivos se realiza como el síntoma PHYTOX causado por los compuestos químicos llevada a cabo usando una escala del 0 al 100 %, en comparación con las plantas de control no tratadas. En el presente documento, 0 significa que no hay daños y 100 significa la destrucción completa de las plantas.

30

TABLA 8

PRINCIPIO ACTIVO	Tasa del producto (g/ha)	Resistencia/Variedad	Estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS	Estirpe de WOSR tolerante al inhibidor de AHAS
		FC del cultivo de/a/	10/11	11/13
		DDT/DDUT/DDP	10/10/10	29/29/29
		Unidad de evaluación	% PHYTOX	% PHYTOX
		Tasa de principio activo (g/ha)		

Propoxicarbazona	10	7	0	0
Sulfosulfurón	2,5	2	0	0
Flupirsulfurón-metilo	50	1,8	0	0
Amidosulfurón	20	2,75	0	0

TABLA 9

PRINCIPIO ACTIVO	Tasa del producto (g/ha)	Resistencia/Variedad	Estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS	Estirpe de WOSR susceptible al inhibidor de AHAS
		FC del cultivo de/a/	10/11	11/13
		DDT/DDUT/DDP	10/10/10	29/29/29
		Unidad de evaluación	% PHYTOX	% PHYTOX
		Tasa de principio activo (g/ha)		
Propoxicarbazona	10	7	100	100
Sulfosulfurón	2,5	2	99	99
Flupirsulfurón-metilo	50	1,8	100	100
Amidosulfurón	20	2,75	100	100

## 5 Ejemplo 5

Actividad de AHAS en presencia de herbicidas de imidazolinona

Se hacen reaccionar enzimas AHAS con diversas mutaciones con piruvato, y se tratan con agua y soluciones en serie de concentración variable de imazamox para determinar la actividad de AHAS. Las reacciones continúan a 37 °C durante 45 minutos y se terminan mediante la adición de 20 µl de una solución de ácido sulfúrico al 5 % con calentamiento hasta 60 °C durante 15-30 minutos para convertir el acetolactato en acetoína. Se incuba la acetoína resultante con creatina y naftilo (complejo de creatina-naftilo) en solución de hidróxido sódico a 60 °C durante 15 minutos para producir un producto coloreado para la medición y la correlación con la actividad de las enzimas AHAS.

La Fig. 7 muestra la actividad de la enzima AHAS.

## Ejemplo 6

Actividad de AHAS en presencia de herbicidas de sulfonilurea

Se hacen reaccionar enzimas AHAS con diversas mutaciones con piruvato, y se tratan con agua y soluciones en serie de concentración variable de clorsulfurón para determinar la actividad de AHAS. Las reacciones continúan a 37 °C durante 45 minutos y se terminan mediante la adición de 20 µl de una solución de ácido sulfúrico al 5 % con calentamiento hasta 60 °C durante 15-30 minutos para convertir el acetolactato en acetoína. Se incuba la acetoína resultante con creatina y naftilo (complejo de creatina-naftilo) en solución de hidróxido sódico a 60 °C durante 15 minutos para producir un producto coloreado para la medición y la correlación con la actividad de las enzimas AHAS.

La Fig. 8 muestra la actividad de la enzima AHAS.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de protección de un cultivo de *Brassica* de tipo invernal frente a las malas hierbas usando una composición herbicida que comprende una o varias sulfonilureas (SU), método que comprende:

5        cultivar una planta de *Brassica* tolerante a herbicidas (HT) de dicho cultivo y realizar el tratamiento de dicha planta mediante la aplicación de una composición herbicida que comprende una o varias SU que inhiben el crecimiento de la versión de tipo silvestre de la planta de *Brassica*, en donde

10      (A) dicho tratamiento es:

(1) un tratamiento post-emergencia a una tasa de dosis en el intervalo de x0,25 a x4 de SU y la composición herbicida:

15      (a) comprende una SU seleccionada de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos; y  
(b) opcionalmente, comprende no más del 10 % en peso de contenido de otra SU; o

20      (2) un tratamiento pre-emergencia, o un tratamiento de 0 a 30 días antes de la plantación, en el lugar de plantación de las semillas de la misma y sus proximidades inmediatas, a una tasa de dosis en el intervalo de más de x0,5 a x4 de SU y la composición herbicida:

25      (a) comprende una SU seleccionada de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos; y  
(b) comprende no más del 3 % en peso de otra SU; y

30      (B) dicha planta de *Brassica* comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en donde solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT), en donde la mutación SU-HT es W574X y en donde el gen HT-AHASL que codifica la mutación SU-HT está ubicado en el genoma A de dicha planta de *Brassica*; y donde que dicha planta de *Brassica* es capaz de tolerar dicho tratamiento con SU a una tasa de dosis de x1 de SU sin que se produzca una lesión significativa inducida por herbicidas de SU por dicho tratamiento.

35      2. Un método para proporcionar protección del rendimiento a un cultivo de *Brassica* de tipo invernal desarrollado en presencia de una composición herbicida de sulfonilurea (SU), que comprende:

40      plantar una semilla de una planta de *Brassica* de tipo invernal en presencia de la composición herbicida de SU, comprendiendo dicha composición herbicida (1) una SU seleccionada de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos; y (2) opcionalmente, no más del 10 % en peso de contenido de otra SU, no más del 5 % en peso de contenido de otra SU o no más del 3 % en peso de contenido de otra SU; y

45      cultivar la semilla en condiciones capaces de producir la planta de *Brassica* de tipo invernal; en donde dicha planta de *Brassica* comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en donde solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT), en donde la mutación SU-HT es W574X y en donde el gen HT-AHASL que codifica la mutación SU-HT está ubicado en el genoma A de dicha planta de *Brassica*; y

50      en donde el rendimiento es igual o superior al rendimiento proporcionado por una versión de tipo silvestre del mismo tipo de planta de *Brassica* de tipo invernal.

3. Un método para proporcionar protección del rendimiento a un cultivo de *Brassica* de tipo invernal que comprende:

55      plantar una semilla de una planta de *Brassica* de tipo invernal; cultivar la semilla en condiciones capaces de producir la planta de *Brassica* de tipo invernal; y realizar un tratamiento con herbicida de la planta aplicando una composición herbicida, que comprende una o varias sulfonilureas (SU), a la planta y sus proximidades inmediatas; comprendiendo dicha composición herbicida

60      (1) una SU seleccionada de amidosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, nicosulfurón, tifensulfurón y tribenurón, sales y ésteres agronómicamente aceptables de los mismos, y combinaciones de los mismos; y (2) opcionalmente, no más del 10 % en peso de contenido de otra SU, no más del 5 % en peso de contenido de otra SU o no más del 3 % en peso de contenido de otra SU;

65      en donde dicha planta de *Brassica* comprende al menos un gen AHASL tolerante a herbicidas (HT-AHASL), en donde solo uno de los genes HT-AHASL de la planta codifica una mutación de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea (SU-HT), en donde la mutación SU-HT es W574X y en donde el gen HT-AHASL que codifica la mutación SU-HT está ubicado en el genoma A de dicha planta de *Brassica*; y

en donde el rendimiento es igual o superior al rendimiento proporcionado por una versión de tipo silvestre del mismo tipo de planta de *Brassica* de tipo invernal.

- 5      4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además escoger, antes del tratamiento con la composición herbicida, dicha planta de *Brassica* tolerante a herbicidas.
- 10     5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además escoger una semilla capaz de producir dicha planta de *Brassica* tolerante a herbicidas, plantar dicha semilla y cultivar dicha planta de *Brassica* tolerante a herbicidas a partir de dicha semilla.
- 15     6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen HT-AHASL que codifica la mutación W574X:
  - (a) codifica W574X homocigótica o hemicigóticamente;
  - (b) codifica W574X en un alelo y codifica un resto de W574W de tipo silvestre en el alelo homólogo; o
  - (c) codifica heterocigóticamente dos mutaciones W574X diferentes.
- 20     7. Un método de selección de una planta de *Brassica* de tipo invernal HT que comprende:
  - (I) realizar el tratamiento post-emergencia de acuerdo con los puntos (A)(1) y (B) de la reivindicación 1 o realizar el tratamiento pre-emergencia o el tratamiento de 0 a 30 días antes de la plantación de acuerdo con los puntos (A)(2) y (B) de la reivindicación 1; y
  - (II) seleccionar una planta de *Brassica* capaz de tolerar dicho tratamiento de SU a una tasa de dosis de al menos x1 de SU sin producir un daño significativo inducido por el herbicida de SU a partir de dicho tratamiento.
- 25     8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha composición herbicida comprende además uno o más herbicidas de imidazolinona.
- 30     9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la imidazolinona es imazamox, o una sal o un éster agronómicamente aceptables del mismo.
- 35     10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la mutación SU-HT se selecciona de W574L, W574M, W574C, W574S, W574R, W574G, W574A, W574F, W574Q y W574Y.
- 40     11. El método de la reivindicación 10, en el que la mutación SU-HT es W574L.
- 45     12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la planta de *Brassica* comprende además al menos otra mutación HT codificada por al menos un gen HT-AHASL de la planta, en donde dicha otra mutación HT se selecciona de A122X, R199X, A205X, S653X, G654X y combinaciones de las mismas.
- 50     13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la al menos otra mutación HT se selecciona de A122T, A122V, A122D, A122P, A122Y, R199A, R199E, A205V, A205C, A205D, A205E, A205R, A205T, A205W, A205Y, A205N, S653N, S653I, S653F, S653T, G654Q, G654C, G654E, G654D y combinaciones de las mismas.
- 55     14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que las malas hierbas presentes en las proximidades inmediatas de dicha planta de *Brassica* de tipo invernal se controlan mediante dicha composición herbicida de SU.
- 60     15. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la composición herbicida de SU está presente como un residuo del suelo de una composición herbicida de SU aplicada a un cultivo previo.
- 65     16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el rendimiento del cultivo de *Brassica* de tipo invernal es superior al rendimiento de un cultivo de plantas de *Brassica* de tipo invernal de la correspondiente estirpe isogénica de tipo silvestre y cultivada en las mismas condiciones que contienen herbicidas.
- 70     17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el rendimiento del cultivo de *Brassica* de tipo invernal es sustancialmente equivalente al rendimiento cuando el cultivo de *Brassica* de tipo invernal se desarrolla en ausencia de la composición herbicida de SU.
- 75     18. El método de la reivindicación 4, en el que la planta de *Brassica* escogida es capaz de tolerar dicho tratamiento con herbicida a una tasa de dosis de al menos x1 de SU sin producir un daño significativo inducido por el herbicida de SU a partir de dicho tratamiento.
- 80     19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicha composición herbicida comprende al menos un principio activo adicional escogido de entre: inhibidores de EPSPS, glifosato; inhibidores de glutamina sintetasa, glufosinato; inhibidores de ACCasa, dims, fops o dens, inhibidores de PPO, saflufenacil,

fungicidas, piraclostrobina; o sales o ésteres agronómicamente aceptables de los mismos; y la planta de *Brassica* expresa un rasgo de tolerancia a dichos principios activos adicionales.

- 5 20. El método de la reivindicación 1, en el que la composición herbicida de (A)(1) comprende no más del 5 % en peso del contenido total de otra SU.
21. El método de la reivindicación 20, en el que la composición herbicida de (A)(1) comprende no más del 3 % en peso del contenido total de otra SU.

Fig. 1

ES 2 661 566 T3

Fig. 2

Fig. 3

```
>BnAHASL1A_PM2 parcial <  
TFISRYAPDEPRKGADILVEALERQGVETVFAYPGGASMEIHQALTRSSTIRNVLPKHEQGGVFAAEGYARSSGKPG  
ICIATSGPGATNLVSGLADAMLDSPVLAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNLYLVMDDIPRIVQEAF  
FLATSGRGPVLDVPKDIQQQLAIPNWDQPMRLPGYMSRLPQPPEVSQLGQIVRLISESKRPVLYVGGGSLNSSEE  
LGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCNDELSLQMLGMHGTVYANYAVEHSLLLAFGVRFFDRVTGKLEAFASRAKIVH  
IDIDSAEIGKNKTPHVSVCGVKLALQGMNKVLENRAEELKLDFGWKRSELSEQKQKFPLSFKTFGEAIPPQYAIQV  
LDELTQGKAIISTGVGQHQMWAAQFYKYRKPROWLSSSGLGAMGFGLPAAILASVANPDAIVVDIDGDGSFIMNVQE  
LATIRVENLPVKILLNNQHLGMVMQLEDRFYKANRAHTYLGDPARENEIFPNMLQFAGACGIPAARVTKKEELREA  
IQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPMIPSGBTFKDVITEGDGRTKY
```

Fig. 4

```
>BnAHASL1C_PMI parcial <
TFVSRYPAPDEPRKGADIIVEALERQGVETVFAYPGGASMEIHQALTRSSTIRNVLPRAHEQGGVFAAEGYARSSGKPG
ICIATSGPGATNLVSGLADAMLDSPVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSIKHNYLVMDDIPRIVQEAF
FIATSGRPGPVLVDVPKDTQQQLATPNWDQPMRLPGYMSRLPQPPEVSQLGQIVRLISESKRPVLYVGGGSINSSEE
LGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCNDELSLQMLGMHGTVYANYAVEHSDLLAFCVRFODRVTGKLEAFASRAKIVH
IDIDSAEIGKNKTPHVSVCGDVKLALQGMNKVLENRAEEELKLDGCVWRSELSSEQKQKFPLSFKTFGEAIPPPQYAIQI
LDELTEGKAIISTGVGQHQWAAQFYKVRKPRQWLSS3GLGAMGFGLPAAGASVANPOAIVVDIDGDGSFIMNVQE
LATIRVENLPVKILLNNQHLGMVMQWEDRFYKANRAHTYLGDPARSENEIFPNMLQFAGACGIPAARVTKEELREA
IQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHLPMIPNGGTFKDVIDEGDGRKY
```

Fig. 5

PM2

atggcgccggcaacatcgcttttcogatetccttaaccgctaaacccctttccaaatcccccttaccatltccag  
 atttccttccttccttaaccacacagaaaccccttcctccgttcaccgttcactogccatctccgcgttc  
 tcaactcaccgtcaatgtcgccacctgaaaaaacccgacaagataagacttcatetccgeetaogctcccgacag  
 ccccgcaagggtgtgtatcccttgtgaagccctcgagcgtaaggcgctcgaaaccgttcttgcattatcccgagg  
 tgcctccatggagatccaccaagcccttgactcgctcccccacatccgtlaacgtcttcccccgtcacgaacaaggaa  
 gagttctcgcccgagggttaacgtctgttcttcoggcaaccggaaatctgcataqccacttgggtccggagct  
 accaaccctcgtcagcqggttagccqacgcatgtttgacagtgttcttcgtcgccatcacaggacqgtccctcg  
 ccggatgatcggtactgacgqgttccaagagaacgcaatcggttgggttaacgaggcttattacgaaacataactatc  
 tggtgatggatgtgtatgacatacctagatcgttcaagaagcatcttttgcatttcccttgcgttagaccggaccg  
 gttttgttgcgttccataggatattcagcagcttgcatttcttcaacttggatcaaccatgtcgtttgcctgg  
 ctacatgtctaggetgeetcagccaccggaaagttttcgtttagccagatcggttgggtatctggagttactqggatc  
 ggccttggatgttgcgttggggatgttgcatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 cgggactgtgtatgtctaactaegctgtggacatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 tcacggaaaagctcgaggcggttgcagccggctaaaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 aataagacacccctcagctgttgtgtgtgtatgttaaagctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 ggcggaggaggctcaagcttgatllcggtlgtggaggagtgagltgagcgacggcagaaacacaaggltcccgttgcgtt  
 taaaaaagttggagaageccatcttcggcagtgacggatggatcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 atcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 gtctcaggactcgaggacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 ttgtggacattgcgggtatggaaagcttcataatgaacgttcaagatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 gtgaagatatactgtttaaacaaccagcatcttggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 agctoacacttatotoggggacccggcaaggagaacgagatcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 ggattccagctqcqagatgtacgaaqaaagaactccgagaagcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 tacctgttggatgtcatctgtccgcaccaagaacatgtgttaccgatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 aataaccgaaaggatgtcgactaagtactga

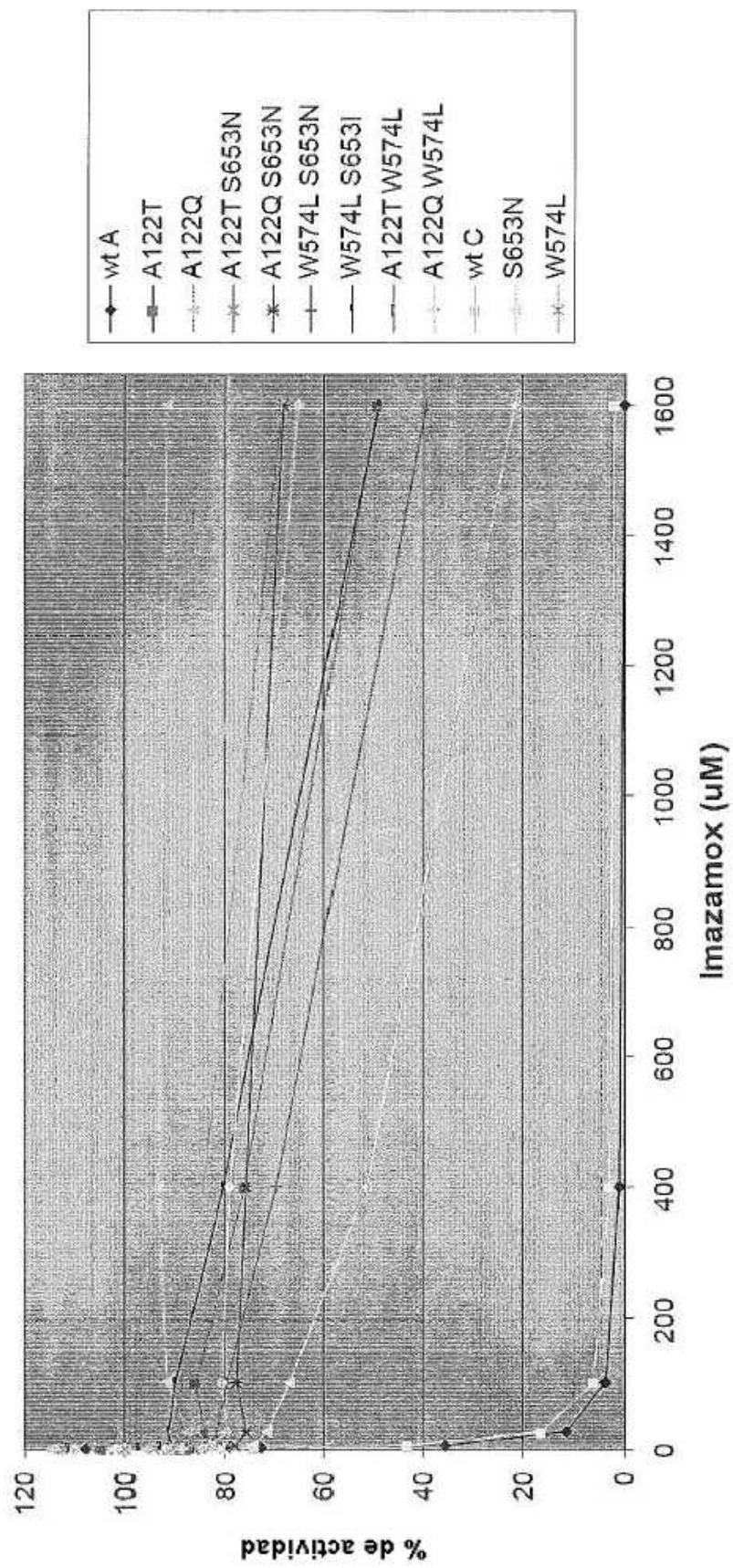
Fig. 6

PM2

MAAATSSSPISLTAKPSSKSPLPISRFSLPSSLTPQKPSSRLHRPLAISAVLNSPVNVAPEKTDKI  
KTFSRYAPDEPRKGADILVEALERQGVETVFAYPGGASMEIHQALTRSSTIRNVL  
PRHEQGGVFAAEGYARSSGKPGICIATSGPGATNLVSGLADAMLDSPVLA  
ITGQVPRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVMDDIPRIVQEAFFLATSGRPGPVLVDVPKDI  
QQQLAI  
PNWDQPMRLPGYMSRLPQPPEVSOLGQIVRLISESKRPVLYVGGGSLNSSEELG  
RFVELTGI  
PVASTLMGLGSYPCNDELSLQMLGMHGTVYANYAVEHSDLLLAFGVRFDDRV  
TGKLEAFASRAKI  
VHDIDSAEIGKNKTPHVSVCVDVKLALQGMNKVLENRAEELKLDGF  
VWRSEL  
SEQKQKFPLSFKTFGEAIPPQYAIQVLDELTQGKAI  
I  
STGVGQHQMWAAQFYKYRKPRQWLSSSGLGAMFGLPAAIGASVANPDAIVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPV  
KILLNNQHLGMVMQLEDRFYKANRAHTYLGD  
PARENEIFPNMLQFAGACGIPAARVTKK  
EELREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHLVPMIPSGGTFKDVITEGDGRTKY

# ES 2 661 566 T3

Fig. 7



# ES 2 661 566 T3

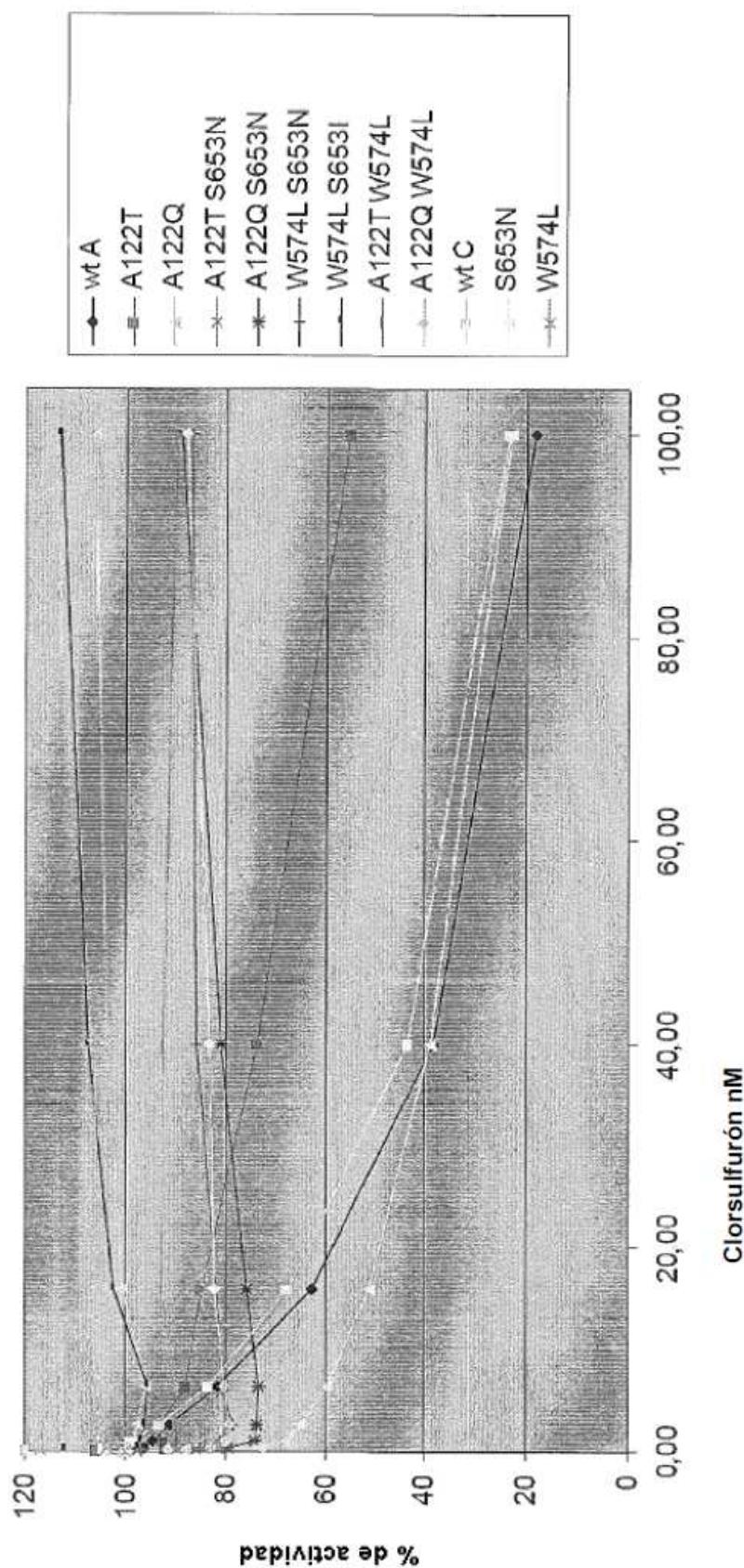


Fig. 8