

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0809473-0 A2



* B R P I 0 8 0 9 4 7 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/04/2008

(43) Data da Publicação: 09/09/2014
(RPI 2279)

(51) Int.Cl.:

C12N 9/88

C12N 15/82

(54) **Título:** PLANTA DE GIRASSOL, MÉTODOS PARA PRODUIR UMA PLANTA DE GIRASSOL HÍBRIDA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, PARA CONTROLAR OROBANCA QUE CRESCE SOBRE UMA PLANTA DE GIRASSOL, E PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL, SEMENTE DE GIRASSOL, E, KIT PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL. (57) **Resumo:**

(30) **Prioridade Unionista:** 04/04/2007 US 60/910041, 19/02/2008 US 61/029737

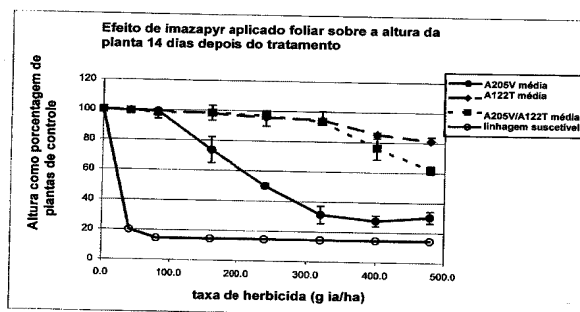
(73) **Titular(es):** Basf Agrochemical Products BV , Nidera S.A.

(72) **Inventor(es):** Bijay K. Singh , Brigitte J. Weston, Carlos Sala, Mariano Bulos, Mariel Echarte, Sherry R. Whitt

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & Cia.

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2008059125 de 02/04/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/124431 de 16/10/2008



“PLANTA DE GIRASSOL, MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE GIRASSOL HÍBRIDA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, PARA CONTROLAR OROBANCA QUE CRESCE SOBRE UMA PLANTA DE GIRASSOL, E PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL, SEMENTE DE GIRASSOL, E, KIT PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL”

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito ao campo da agricultura, particularmente às plantas de girassol resistentes a herbicida que compreendem dois alelos resistentes a herbicida diferentes do gene da subunidade 1 grande da acetohidroxiácido sintase de girassol (AHASL1).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A acetohidroxiácido sintase (AHAS; EC 4.1.3.18, também conhecida como acetolactato sintase ou ALS), é a primeira enzima que catalisa a síntese bioquímica dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Singh (1999) “Biosynthesis of valine, leucine e isoleucine,” em Plant Amino Acids, Singh, B. K., ed., Marcel Dekker Inc. Nova Iorque, Nova Iorque, pp. 227-247). AHAS é o sítio de ação de quatro famílias de herbicida estrutural e quimicamente diversas incluindo as sulfoniluréias (Tan *et al.* (2005) Pest Manag. Sci. 61: 246-57; Mallory-Smith e Retzinger (2003) Weed Technology 17: 620-626; LaRossa e Falco (1984) Trends Biotechnol. 2: 158-161), as imidazolinonas (Shaner *et al.* (1984) Plant Physiol. 76: 545-546), as triazolopirimidinas (Subramanian e Gerwick (1989) “Inhibition of acetolactate synthase by triazolopirimidines,” em Biocatalysis in Agricultural Biotechnology, Whitaker, J. R. e Sonnet, P. E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 277-288) e os pirimidiniloxibenzoatos (Subramanian *et al.* (1990) Plant Physiol.

94: 239-244). Os herbicidas de imidazolinona e sulfoniluréias são amplamente usados na agricultura moderna devido à sua eficácia em taxas de aplicação muito baixas e não toxicidade relativa em animais. Por inibir a atividade de AHAS, estas famílias de herbicidas previnem o crescimento e desenvolvimento adicional de plantas suscetíveis incluindo muitas espécies de ervas daninhas. Diversos exemplos de herbicidas de imidazolinonas comercialmente disponíveis são PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imazaquin) e ARSENAL® (imazapir). Os exemplos de herbicidas de sulfoniluréia são clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, 10 clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rinsulfuron, triflissulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etila e halosulfuron.

Devido à sua alta eficácia e baixa toxicidade, os herbicidas de imidazolinona são favorecidos para a aplicação por pulverização sobre o topo de uma ampla área de vegetação. A capacidade para pulverizar um herbicida sobre o topo de uma ampla faixa de vegetação diminui os custos associados com o estabelecimento e manutenção da planta e diminui a necessidade quanto à preparação do local antes do uso de tais produtos químicos. A 15 pulverização sobre o topo de uma espécie tolerante desejada também resulta na capacidade para se obter potencial de rendimento máximo da espécie desejada devido à ausência de espécies competitivas. Entretanto, a capacidade para usar tais técnicas de pulverizar sobre é dependente da presença de espécies resistentes à imidazolinona da vegetação desejada na área 20 pulverizada sobre.

Entre a maioria das safras agrícolas, algumas espécies leguminosas tais como a soja são naturalmente resistentes aos herbicidas de imidazolinona devido à sua capacidade para metabolizar rapidamente os compostos herbicidas (Shaner e Robinson (1985) Weed Sci. 33: 469-471).

Outras safras tais como o milho (Newhouse *et al.* (1992) Plant Physiol. 100: 882-886) e o arroz (Barrett *et al.* (1989) Crop Safeners for Herbicides, Academic Press, Nova Iorque, pp. 195-220) são um tanto suscetíveis aos herbicidas de imidazolinona. A sensibilidade diferencial aos herbicidas de imidazolinona é dependente da natureza química do herbicida particular e metabolismo diferencial do composto de uma forma tóxica a uma não tóxica em cada planta (Shaner *et al.* (1984) Plant Physiol. 76: 545-546; Brown *et al.*, (1987) Pestic. Biochem. Physiol. 27: 24-29). Outras diferenças fisiológicas de planta tais como absorção e translocação também desempenham um papel importante na sensibilidade (Shaner e Robinson (1985) Weed Sci. 33: 469-471).

As plantas resistentes às imidazolinonas, sulfoniluréias, triazolopirimidinas e pirimidiniloxibenzoatos foram produzidas com êxito usando semente, microesporo, pólen e mutagênese de calo em *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (isto é, canola) *Glicina max*, *Nicotiana tabacum*, beterraba açucareira (*Beta vulgaris*) e *Oryza sativa* (Sebastian *et al.* (1989) Crop Sci. 29: 1403-1408; Swanson *et al.*, 1989 Theor. Appl. Genet. 78: 525-530; Newhouse *et al.* (1991) Theor. Appl. Genet. 83: 65-70; Sathasivan *et al.* (1991) Plant Physiol. 97: 1044-1050; Mourand *et al.* (1993) J. Heredity 84: 91-96; Wright e Penner (1998) Theor. Appl. Genet. 96: 612-620; Patente U.S. Nº 5.545.822). Em todos os casos, um único, gene nuclear parcialmente dominante conferiu resistência. Quatro plantas de trigo resistentes à imidazolinona foram também anteriormente isoladas a seguir da mutagênese de semente de *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse *et al.* (1992) Plant Physiol. 100: 882-886). Estudos de hereditariedade confirmaram que um único, gene parcialmente dominante conferiu resistência. Com base em estudos alélicos, os autores concluíram que as mutações nas quatro linhagens identificadas foram localizadas no mesmo local. Um dos genes de resistência do cultivar Fidel foi designado FS-4 (Newhouse *et al.* (1992) Plant

Physiol. 100: 882-886).

As populações de planta que ocorrem naturalmente que foram descobertas serem resistentes aos herbicidas de imidazolinona e/ou sulfoniluréia também foram usados para desenvolver linhagens de cruzamento de girassol resistentes a herbicida. Recentemente, duas linhagens de girassol que são resistentes a um herbicida de sulfoniluréia foram desenvolvidos usando plasma germinativo que se origina de uma população selvagem de girassol comum (*Helianthus annuus*) como a fonte do traço de resistência a herbicida (Miller e Al-Khatib (2004) Crop Sci. 44: 1037-1038). Anteriormente, White *et al.* ((2002) Weed Sci. 50: 432-437) relataram que indivíduos de uma população selvagem de girassol comum de South Dakota, U.S.A. foram resistente cruzado a um herbicida de imidazolinona e um de sulfoniluréia. A análise de uma porção da região codificadora dos genes da subunidade grande da acetohidroxiácido sintase (AHASL) de indivíduos desta população revelou uma mutação pontual que resultou em uma substituição de aminoácido de Ala para Val na proteína AHASL de girassol que corresponde a Ala₂₀₅ na proteína AHASL de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (White *et al.* (2003) Weed Sci. 51: 845-853). Antes, Al-Khatib e Miller ((2000) Crop Sci. 40: 869) relataram a produção de quatro linhagens de cruzamento de girassol resistentes à imidazolinona.

A modelagem com base em computador das três conformações dimensionais do complexo AHAS-inibidor prognostica diversos aminoácidos na bolsa de ligação do inibidor proposto como sítios onde mutações induzidas provavelmente confeririam resistência seletiva às imidazolinonas (Oft *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263: 359-368). As plantas de tabaco produzidas com algumas destas mutações racionalmente planejadas nos sítios de ligação propostos da enzima AHAS de fato exibiram resistência específica a uma única classe de herbicidas (Ott *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 263: 359-368).

A resistência de planta aos herbicidas de imidazolinona

também foi relatada em várias patentes. As Patentes U.S. N^{os} 4.761.373, 5.331.107, 5.304.732, 6.211.438, 6.211.439 e 6.222.100 no geral descrevem o uso de um gene de AHAS alterado para evocar resistência a herbicida em plantas e especificamente divulga certas linhagens de milho resistentes à imidazolinona. A Patente U.S. N^o 5.013.659 divulga plantas exibindo resistência a herbicida devido às mutações em pelo menos um aminoácido em uma ou mais regiões conservadas. As mutações descritas nesse ponto codificam a resistência cruzada para imidazolinonas e sulfoniluréias ou resistência específica à sulfoniluréia, mas a resistência específica à imidazolinona não está descrita. A Patente U.S. N^o 5.731.180 e a Patente U.S. N^o 5.767.361 debatem um gene isolado tendo uma única substituição de aminoácido em uma sequência de aminoácido de AHAS monocot do tipo selvagem que resulta em resistência específica à imidazolinona. Além disso, plantas de arroz que são resistentes aos herbicidas que interferem com AHAS foram desenvolvidas pela procriação mutacional e também pela seleção de plantas resistentes a herbicida de um grupo de plantas de arroz produzidas pela cultura de anthera. Ver, as Patentes U.S. N^{os} 5.545.822, 5.736.629, 5.773.703, 5.773.704, 5.952.553 e 6.274.796.

Em plantas, como em todos os outros organismos examinados, a enzima AHAS é compreendida de duas subunidades: uma subunidade grande (papel catalítico) e uma subunidade pequena (papel regulador) (Duggleby e Pang (2000) J. Biochem. Mol. Biol. 33: 1-36). A subunidade de AHAS grande (também aludida aqui como AHASL) pode ser codificada por um único gene como no caso de *Arabidopsis* e da beterraba açucareira ou por membros da família de gene múltiplos como no milho, canola e algodão. As substituições específicas, de nucleotídeo único na subunidade grande confere na enzima um grau de insensibilidade a uma ou mais classes de herbicidas (Chang e Duggleby (1998) Biochem J 333: 765-777).

Por exemplo, o trigo de pão, *Triticum aestivum* L., contém três

genes da subunidade grande da acetohidroxiácido sintase homóloga. Cada um dos genes exibem expressão significativa com base na resposta ao herbicida e dados bioquímicos de mutantes em cada um dos três genes (Ascenzi *et al.* (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, Espanha, Ref. Nº S10-17). As sequências codificadoras de todos os três genes compartilham homologia extensiva ao nível do nucleotídeo (WO 03/014357). Através do sequenciamento dos genes AHASL de diversas variedades de *Triticum aestivum*, a base molecular da tolerância a herbicida na maioria das linhagens tolerantes à IMI (tolerantes à imidazolinona) foi encontrada ser a mutação S653(At)N, indicando uma substituição de serina para asparagina em uma posição equivalente à serina no aminoácido 653 em *Arabidopsis thaliana* (WO 03/01436; WO 03/014357). Esta mutação é devido a um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na sequência de DNA que codifica a proteína AHASL.

Os genes AHASL múltiplos também são conhecidos ocorrer em espécies de plantas dicotiledôneas. Recentemente, Kolkman *et al.* ((2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1147-1159) relatou a identificação, clonagem e sequenciamento para três genes AHASL (AHASL1, AHASL2 e AHASL3) de genótipos resistentes a herbicida e do tipo selvagem de girassol (*Helianthus annuus* L.). Kolkman *et al.* relataram que a resistência a herbicida foi devido à substituição Pro197Leu (usando a nomenclatura de posição de aminoácido AHASL de *Arabidopsis*) ou a substituição Ala205Val na proteína AHASL1 e que cada uma destas substituições forneceu resistência tanto aos herbicidas de imidazolinona quanto aos de sulfoniluréia.

Dada a sua alta eficácia e baixa toxicidade, os herbicidas de imidazolinona são favorecidos para o uso agrícola. Entretanto, a capacidade de usar herbicidas de imidazolinona em um sistema de produção de safra particular depende da disponibilidade das variedades resistentes à imidazolinona da planta de safra de interesse. Para produzir tais variedades

resistentes à imidazolinona, os reprodutores de planta necessitam desenvolver linhagens de procriação com o traço de resistência à imidazolinona. Assim, linhagens de procriação e variedades resistentes à imidazolinona adicionais de plantas de safra, assim como métodos e composições para a produção e uso de

5 linhagens de procriação e variedades resistentes à imidazolinona, são necessários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece novas plantas de girassol resistentes a herbicida que compreendem dois alelos resistentes a herbicida

10 diferentes do gene da subunidade 1 grande da acetohidroxiácido sintase (AHASL1) de girassol. Em particular, as plantas de girassol da invenção têm resistência aumentada aos herbicidas que inibem a acetohidroxiácido sintase (AHAS), quando comparado a uma planta de girassol do tipo selvagem. As plantas de girassol resistentes a herbicida da invenção compreendem um

15 primeiro alelo de AHASL1 e um segundo alelo de AHASL1, em que o primeiro e o segundo alelos de AHASL1 codificam uma primeira e segunda proteínas de AHASL1 de girassol resistente a herbicida, respectivamente. O primeiro alelo AHASL1 codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A122T. o segundo alelo AHASL1

20 codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A205V ou a substituição de aminoácido P197L. Também são fornecidas partes, tecidos, células e sementes da planta de girassol que compreendem o primeiro e segundo alelos AHASL1.

A presente invenção fornece ainda um método para produzir

25 uma planta de girassol híbrida que compreende a resistência a pelo menos um herbicida que inibe AHAS. O método envolve a polinização cruzada de uma primeira planta de girassol com uma segunda planta de girassol de modo a produzir sementes de girassol híbridas que podem ser semeadas e deixadas crescer em uma planta de girassol híbrida, particularmente uma planta de

girassol híbrida F1. A primeira planta de girassol compreende no seu genoma pelo menos uma cópia de um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e a segunda planta de girassol compreende no seu genoma pelo menos uma cópia de um segundo alelo de um gene de AHASL1. Preferivelmente, a primeira planta de girassol é homozigota para o primeiro alelo e a segunda planta de girassol é homozigota para o segundo alelo. O primeiro alelo codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A122T. o segundo alelo codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A205V ou a substituição de aminoácido P197L.

A presente invenção adicionalmente fornece métodos para controlar ervas daninhas ou vegetação indesejada na vizinhança de uma planta de girassol da invenção. Um método compreende aplicar uma quantidade eficaz de herbicida que inibe AHAS, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia, às ervas daninhas e à planta de girassol. Um outro método compreende contatar uma semente de girassol da presente invenção antes de semear e/ou depois da pré-germinação com uma quantidade eficaz de um herbicida que inibe AHAS, particularmente um herbicida de imidazolinona ou sulfoniluréia. A presente invenção fornece ainda as sementes de girassol da presente invenção tratada com uma quantidade eficaz de um herbicida que inibe AHAS. As plantas e sementes de girassol para o uso nestes métodos compreendem em seus genomas um primeiro alelo AHASL1 e um segundo alelo AHASL1. O primeiro alelo AHASL1 codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A122T. O segundo alelo AHASL1 codifica uma proteína AHASL1 de girassol que compreende a substituição de aminoácido A205V ou a substituição de aminoácido P197L.

A presente invenção fornece ainda métodos para controlar as ervas parasíticas *Orobanche cumana* e *Orobanche cernua*, também conhecida

como orobanca, nas plantas de girassol infectadas. O método compreende aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida de imidazolinona às ervas daninhas e à planta de girassol resistente a herbicida da presente invenção, particularmente uma planta de girassol que compreende dois alelos A122T ou
5 uma planta de girassol que compreende um alelo AHASL1 A122T e um alelo AHASL1 A205V.

A presente invenção fornece métodos de diagnóstico para identificar os alelos do gene AHASL1 em girassol individual. Tais métodos de diagnóstico envolvem a amplificação pela reação da cadeia da polimerase
10 (PCR) de regiões específicas do gene de AHASL1 do girassol usando iniciadores planejados para anelar aos sítios específicos dentro do gene do girassol de AHASL1 tal como, por exemplo, sítios nas ou na vizinhança de mutações no gene de AHASL1. São adicionalmente fornecidos os iniciadores usados nestes métodos e kits para a realização dos métodos.

15 DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação gráfica do efeito da aplicação foliar de imazapir sobre o topo da planta 14 dias depois do tratamento para materiais homozigoto para os eventos de mutação A122T e A205V e genótipos heterozigotos A205 + A122T. As alturas médias (% de plotagens
20 não tratadas) são representadas pelos símbolos e as barras de erro representam o desvio padrão da média.

A Figura 2 é uma representação gráfica do efeito da aplicação foliar de imazapir sobre o Índice de Fitotoxicidade (PI) 14 dias depois do tratamento com materiais homozigotos para os eventos de mutação A122T e
25 A205V e genótipos heterozigotos A205 + A122T. Os PI médios são representados pelos símbolos e as barras de erro representam o desvio padrão da média.

A Figura 3 é uma representação gráfica do efeito da aplicação foliar de imazapir sobre o acúmulo de biomassa 14 dias depois do tratamento

REIVINDICAÇÕES

1. Planta de girassol resistente a herbicida, caracterizada pelo fato de que compreende no seu genoma um primeiro alelo de um gene da subunidade da acetoidroxiácido sintase grande (AHASL1) e um segundo alelo do dito gene de AHASL1, em que o dito primeiro alelo codifica uma proteína AHASL1 que compreende a substituição do aminoácido A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína AHASL1 que compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste da substituição de aminoácido A205V e da substituição de aminoácido P197L.

2. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita planta de girassol resistente a herbicida é resistente a pelo menos um herbicida que inibe AHAS.

3. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito herbicida que inibe AHAS é selecionado do grupo que consiste de herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfoniluréia, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de pirimidiniloxibenzoato e herbicidas de sulfonilaminocarbonil-triazolinona.

4. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita planta de girassol é uma semente.

5. Planta de girassol de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita planta de girassol produz sementes que compreendem um óleo de semente extraível que compreende pelo menos 85 % de ácido oléico.

6. Método para produzir uma planta de girassol híbrida, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende cruzar uma primeira planta de girassol com uma segunda planta de girassol, em que a dita primeira planta de girassol compreende no seu genoma pelo menos uma cópia de um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e a dita segunda planta de girassol compreende no seu genoma pelo menos uma cópia de um segundo alelo de

um gene de AHASL1 e em que o dito primeiro alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste da substituição de aminoácido A205V e a substituição de aminoácido P197L.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende ainda colher uma semente resultante do dito cruzamento.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro girassol é homozigoto para o dito primeiro alelo e a dita segunda planta de girassol é homozigota para o dito segundo alelo.

9. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende ainda selecionar pelo menos uma planta de girassol descendente do dito cruzamento que compreende no seu genoma o dito primeiro e o dito segundo alelos.

10. Método para controlar ervas daninhas na vizinhança de uma planta de girassol, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida que inibe AHAS às ervas daninhas e à planta de girassol, em que a dita planta de girassol é selecionada do grupo que consiste de:

(a) uma planta de girassol que compreende no seu genoma um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e um segundo alelo do dito gene de AHASL1, em que o dito primeiro alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido A205V; e

(b) uma planta de girassol que compreende no seu genoma um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e um segundo alelo do dito gene de AHASL1, em que o dito primeiro alelo codifica uma proteína de AHASL1

que compreende a substituição de aminoácido A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido P197L.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado
 5 pelo fato de que o dito herbicida que inibe AHAS é selecionado do grupo que consiste de: um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato, um herbicida sulfonilamino-carboniltriazinona ou mistura destes.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
 10 pelo fato de que o dito herbicida de imidazolinona é selecionado do grupo que consiste de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-)] imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinocarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-)] 5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-
 15 2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico e uma mistura de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluate de metila, [2-(4-)] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluate de metila e mistura destes.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
 20 pelo fato de que o dito herbicida de sulfoniluréia é selecionado do grupo que consiste de: clorsulfuron, metsulfuron metila, sulfometuron metila, clorimuron etila, tifensulfuron metila, tribenuron metila, bensulfuron metila, nicosulfuron, etametsulfuron metila, rimsulfuron, triflusulfuron metila, triasulfuron, primisulfuron metila, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron,
 25 imazosulfuron, pirazosulfuron etila, halosulfuron e misturas destes.

14. Semente de girassol, caracterizada pelo fato de que compreende no seu genoma um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e um segundo alelo do dito gene de AHASL1, em que o dito primeiro alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido

A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste da substituição de aminoácido A205V e a substituição de aminoácido P197L e em que a dita semente é tratada com um herbicida que inibe AHAS.

5 15. Semente de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o dito herbicida que inibe AHAS é selecionado do grupo que consiste de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato e um herbicida sulfonilamino-carboniltriazolinona ou mistura destes.

10 16. Método para combater vegetação indesejada, caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma semente de girassol antes da semeadura e/ou depois da pré-germinação com uma quantidade eficaz de herbicida que inibe AHAS, em que a dita semente de girassol compreende no seu genoma um primeiro alelo de um gene de AHASL1 e um segundo alelo
15 do dito gene de AHASL1, em que

o dito primeiro alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende a substituição de aminoácido A122T e o dito segundo alelo codifica uma proteína de AHASL1 que compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste da substituição do aminoácido
20 A205V e a substituição do aminoácido P197L.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito herbicida que inibe AHAS é selecionado do grupo que consiste de um herbicida de imidazolinona, um herbicida de sulfoniluréia, um herbicida de triazolopirimidina, um herbicida de pirimidiniloxibenzoato e um
25 herbicida sulfonilaminocarbonil-triazolinona ou mistura destes.

18. Método para controlar orobanca que cresce sobre uma planta de girassol, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida de imidazolinona à orobanca e à planta de girassol, em que a dita planta de girassol é selecionada do grupo

que consiste de:

(a) uma planta de girassol que compreende no seu genoma dois alelos AHASL1 A122T; e

(b) uma planta de girassol que compreende no seu genoma um alelo AHASL1 A122T e um alelo AHASL1 A205V.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a dita orobanca é selecionada do grupo que consiste de: *Orobanche cumana* e *Orobanche cernua*.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito herbicida de imidazolinona é selecionado do grupo que consiste de: ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-] imidiazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil)-4-metil-5-oxo-2- imidazolin-2-il)-3-quinolinocarboxílico, ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-] 5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico e uma mistura de 6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato de metila, [2-(4-] isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato de metila e mistura destes.

21. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito herbicida de imidazolinona é imazapir.

22. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito herbicida de imidazolinona é aplicado no estágio de crescimento R1.

23. Semente de girassol, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma cópia do alelo AHASL1 A122T e um óleo de semente extraível que compreende pelo menos cerca de 85 % de ácido oléico.

24. Semente de girassol de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a dita semente é um descendente de uma planta de girassol da linhagem de girassol GM40, a semente representativa da dita

linhagem tendo sido depositada sob o Número de Designação de Depósito de Patente na ATCC PTA-6716.

25. Semente de girassol de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a dita semente é um descendente de uma planta de girassol da linhagem de girassol GM1606, a semente representativa da dita linhagem tendo sido depositada sob o Número de Designação de Depósito de Patente na ATCC PTA-7606.

26. Planta de girassol, caracterizada pelo fato de que é produzida pelo cultivo da semente como definido na reivindicação 23.

27. Método para controlar ervas daninhas na vizinhança de uma planta de girassol, o método caracterizado pelo fato de que compreende aplicar uma quantidade eficaz de um herbicida de imidazolinona às ervas daninhas e à planta, em que a planta de girassol é produzida pelo cultivo da semente como definida na reivindicação 23.

28. Método para genotipar acetoidroxiácido sintase grande (AHASL1) de girassol, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) obter DNA genômico de uma planta de girassol;

(b) usar o dito DNA como um padrão para uma primeira amplificação pela reação da cadeia da polimerase (PCR) que compreende dito DNA, polimerase, trifosfatos de desoxirribonucleotídeo, um iniciador de AHASL1 direto e um iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso, em que o dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso anela a uma sequência de nucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13, em que o nucleotídeo que está no nucleotídeo da extremidade 3' do dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso é o complemento do nucleotídeo que está na posição 1 da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13;

(c) usar o dito DNA como um padrão para uma segunda

amplificação pela PCR que compreende o dito DNA, polimerase, trifosfatos de desoxirribonucleotídeo, o dito iniciador de AHASL1 direto e um iniciador de AHASL1 reverso mutante, em que o dito iniciador de AHASL1 reverso mutante anela a uma sequência de nucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 14, em que o nucleotídeo que está no nucleotídeo da extremidade 3' do dito iniciador de AHASL1 reverso mutante é o complemento do nucleotídeo que está na posição 1 da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 14; e

(d) detectar os produtos do dito primeiro e da dita segunda amplificações pela PCR;

em que o dito iniciador de AHASL1 direto compreende uma sequência de nucleotídeo que corresponde a uma região do gene de AHASL1 do girassol que está a 5' da região (ACC)_n.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 4.

30. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 reverso mutante compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 5.

31. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 direto anela a uma sequência de nucleotídeo que compreende o complemento da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 12.

32. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador AHASL direto compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 3.

33. Kit para genotipar acetoidroxiácido sintase grande (AHASL1) de girassol, o dito kit caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um iniciador de AHASL1 direto que compreende uma

sequência de nucleotídeo que corresponde a uma região do gene de AHASL1 de girassol que está a 5' da região (ACC)_n;

(b) um iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso, em que o dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso anela a uma
 5 sequência de nucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13, em que o nucleotídeo que está no nucleotídeo da extremidade 3' do dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso é o complemento do nucleotídeo que está na posição 1 da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13; e

10 (c) um iniciador de AHASL1 mutante reverso, em que o dito iniciador de AHASL1 mutante reverso anela a uma sequência de nucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 14 em que o nucleotídeo que está no nucleotídeo da extremidade 3' do dito iniciador de AHASL1 mutante reverso é o complemento do nucleotídeo que
 15 está na posição 1 da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 14.

34. Kit de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma enzima da polimerase capaz de catalisar a amplificação pela PCR de um primeiro fragmento de um gene AHASL de girassol e um segundo fragmento de um gene AHASL de girassol, em que o
 20 primeiro fragmento está entre o dito sítio de anelamento do dito iniciador de AHASL1 direto e o dito sítio de anelamento do dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso em um gene AHASL1 de girassol e o segundo fragmento está entre o dito sítio de anelamento do dito iniciador de AHASL1 direto e o dito sítio de anelamento do dito iniciador de AHASL1 mutante
 25 reverso em um gene AHASL1 de girassol.

35. Kit de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 direto anela a uma sequência de nucleotídeo que compreende o complemento da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 12.

36. Kit de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador AHASL direto compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 3.

5 37. Kit de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 do tipo selvagem reverso compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 4.

38. Kit de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de AHASL1 mutante reverso compreende a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 5.

FIGURA 1

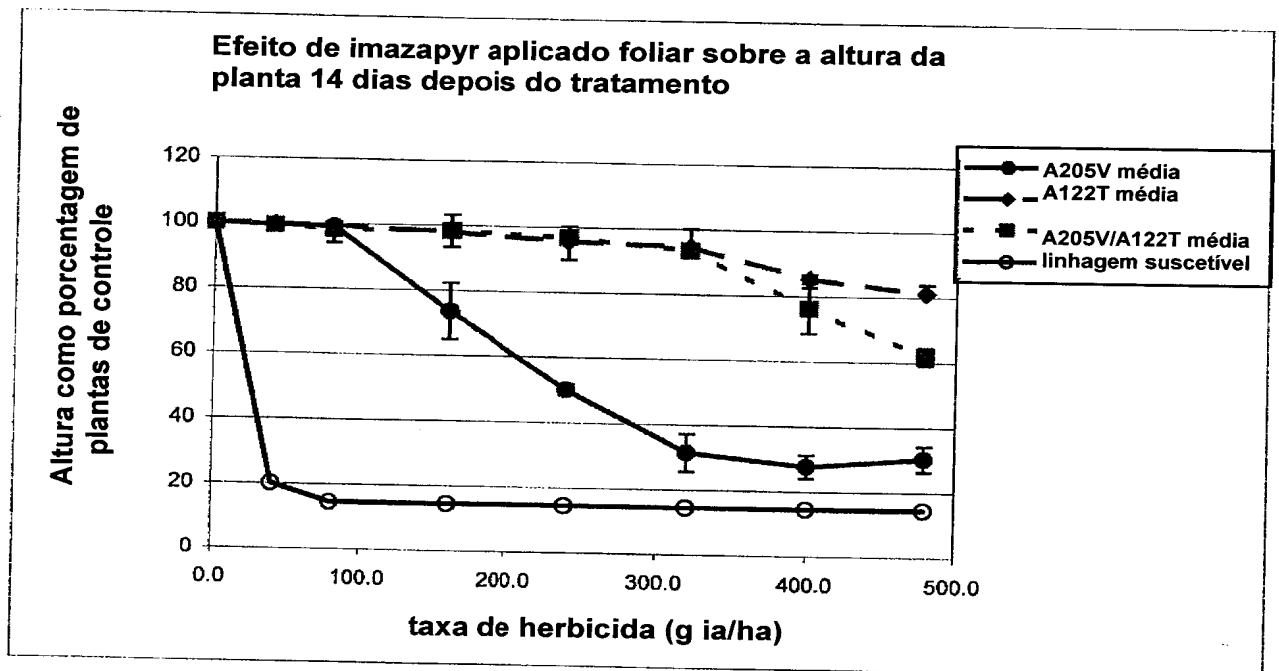


FIGURA 2

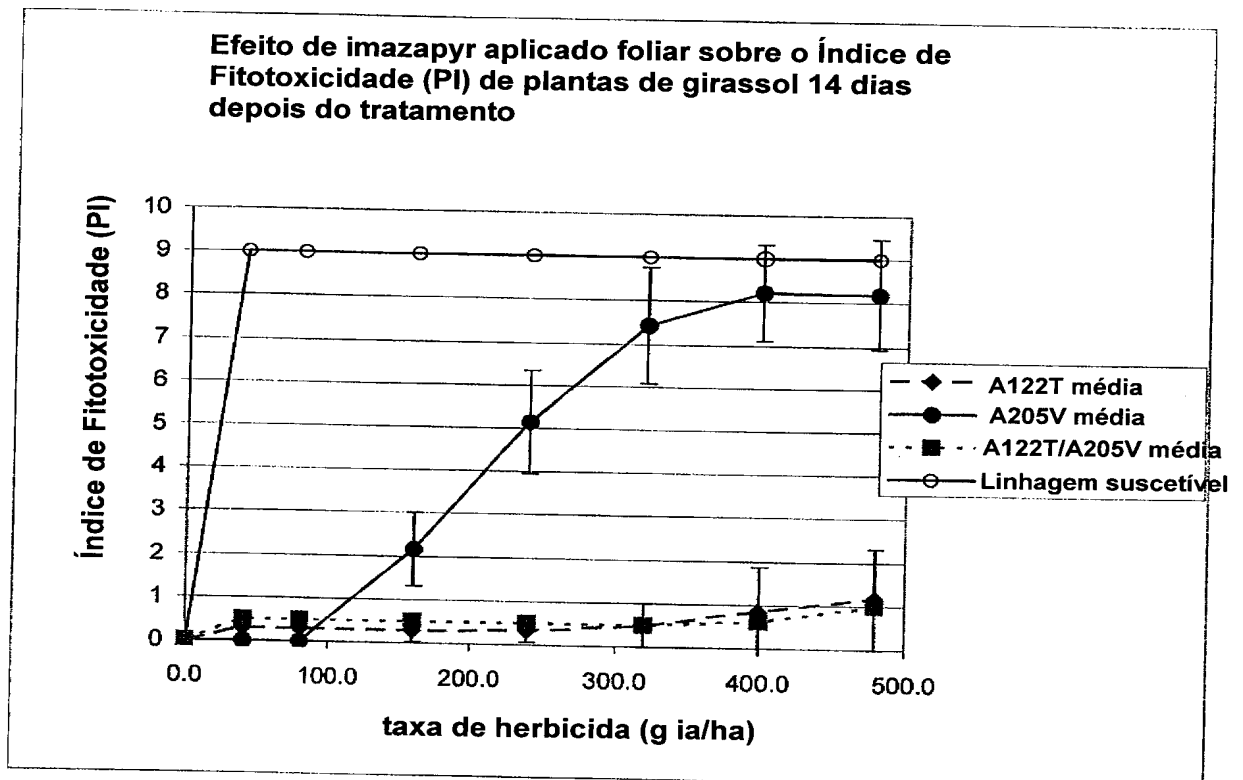


FIGURA 3

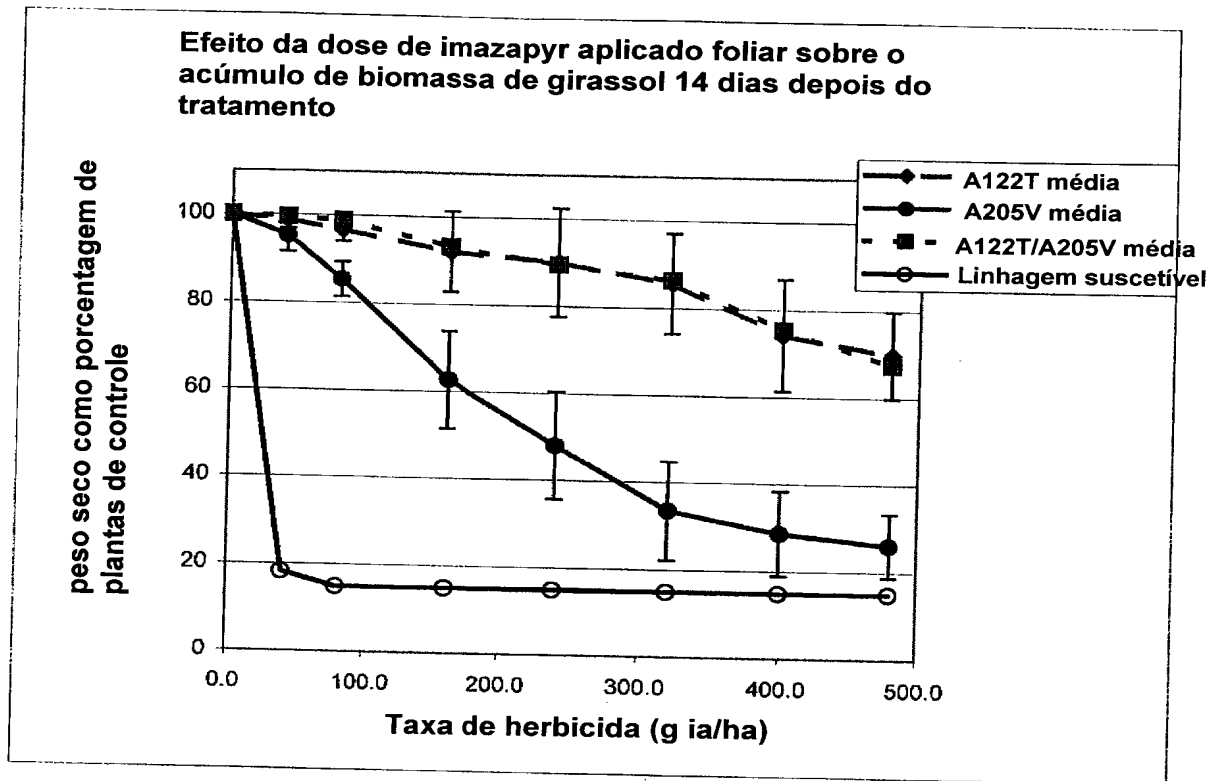


FIGURA 4

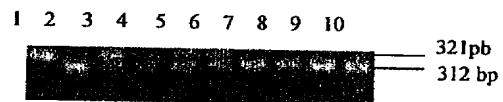


FIGURA 5

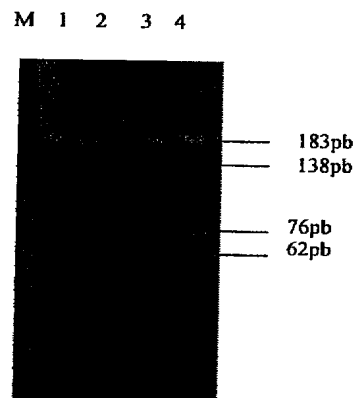


FIGURA 6

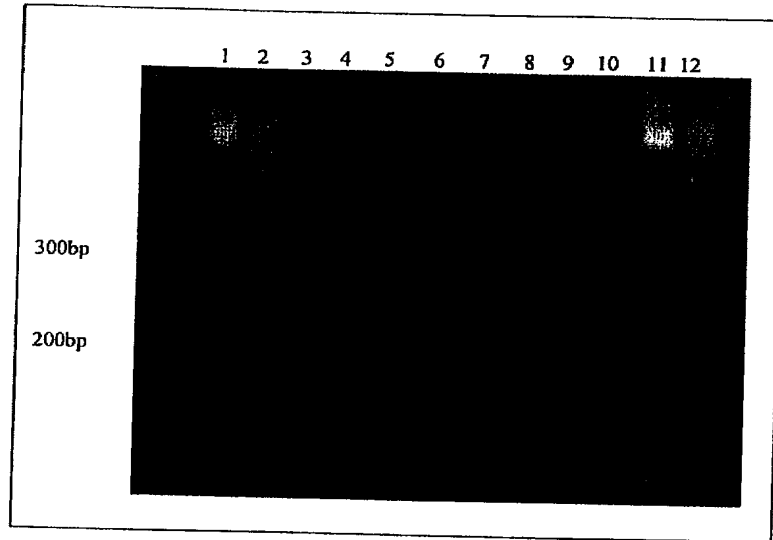


FIGURA 7

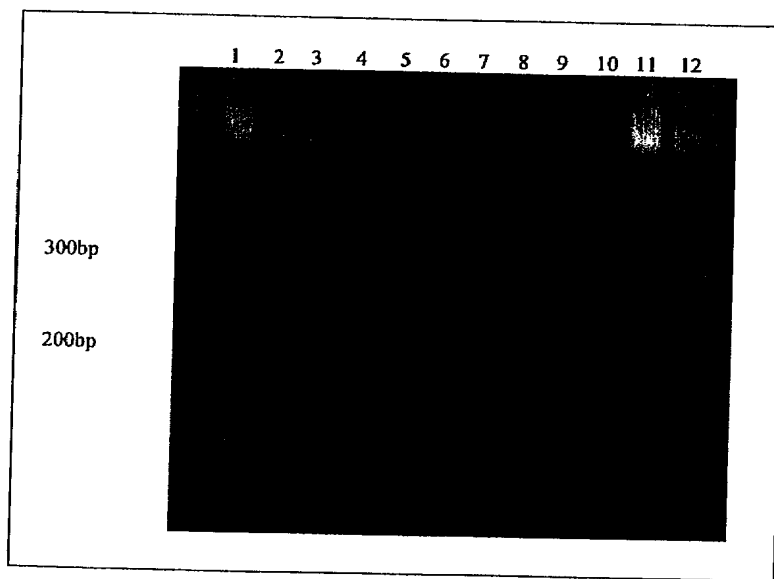


FIGURA 8

Iniciador Direto →

Hap6	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC	CACTCAACG	51
Hap1	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC	CACTCAACG	51
Hap2	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC		
Hap4	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC	TCAACC	48
Hap5	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC	TCAACC	42
Hap3	TGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCACCACCACCACCAC	TCAACC	42
	*****		60

Hap6	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		111
Hap1	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		111
Hap2	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		108
Hap4	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		102
Hap5	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		102
Hap3	ACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACGCGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGC		120

Hap6	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		171
Hap1	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		171
Hap2	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		168
Hap4	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		162
Hap5	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		162
Hap3	AGACGTGTTGGTGGGAAGCTCTGGAACGGGAAGGTGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCCGG		180

	▼		
Hap6	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 11)	195
Hap1	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 6)	195
Hap2	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 7)	192
Hap4	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 9)	186
Hap5	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 10)	186
Hap3	CGGCACGTCAATGGAGATCCACCA	(SEQ ID NO: 8)	204

← **Iniciador Inverso**

FIGURA 9

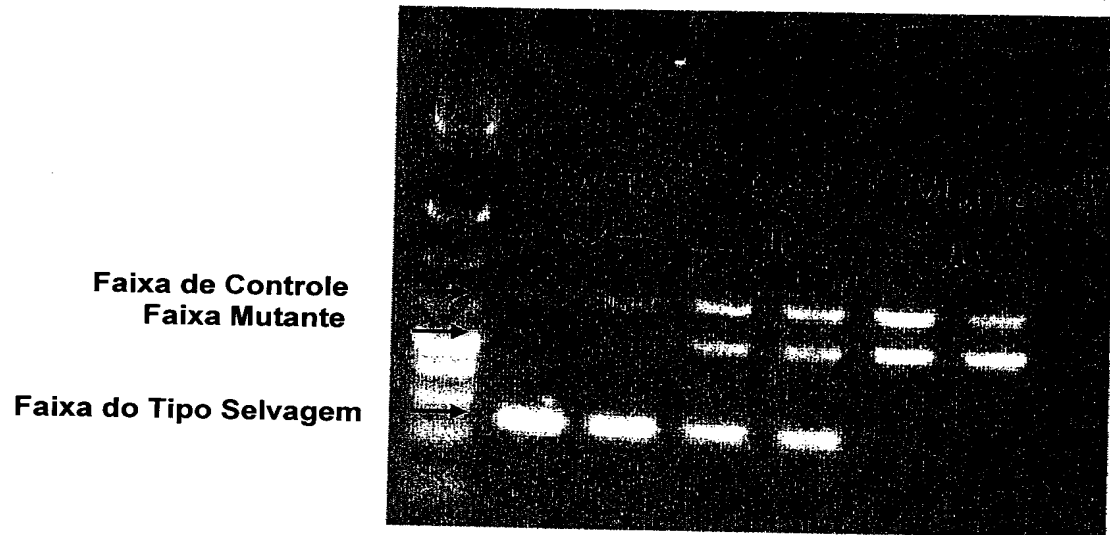


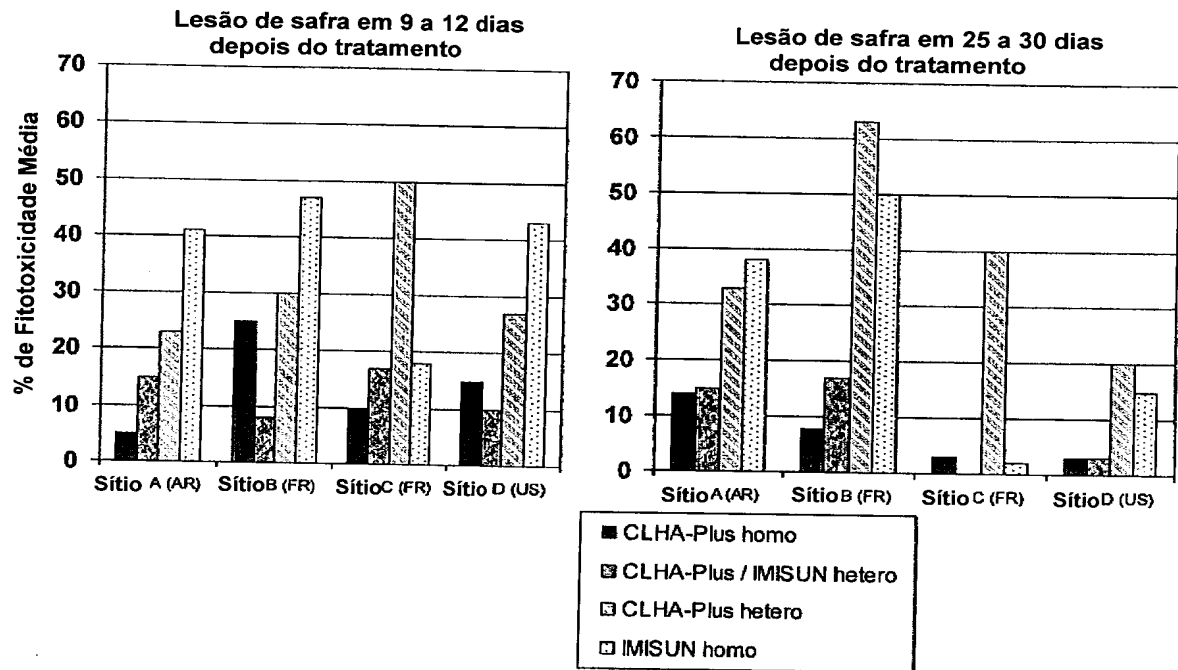
FIGURA 10

FIGURA 11

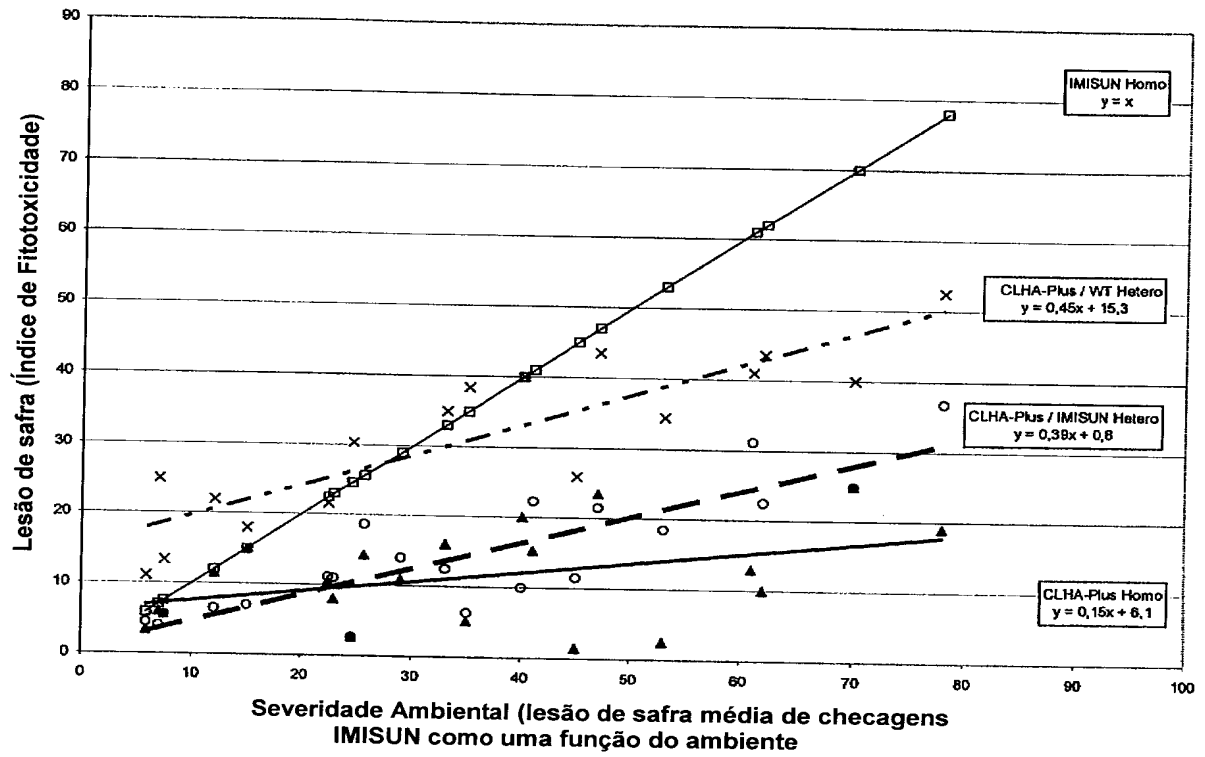


FIGURA 12

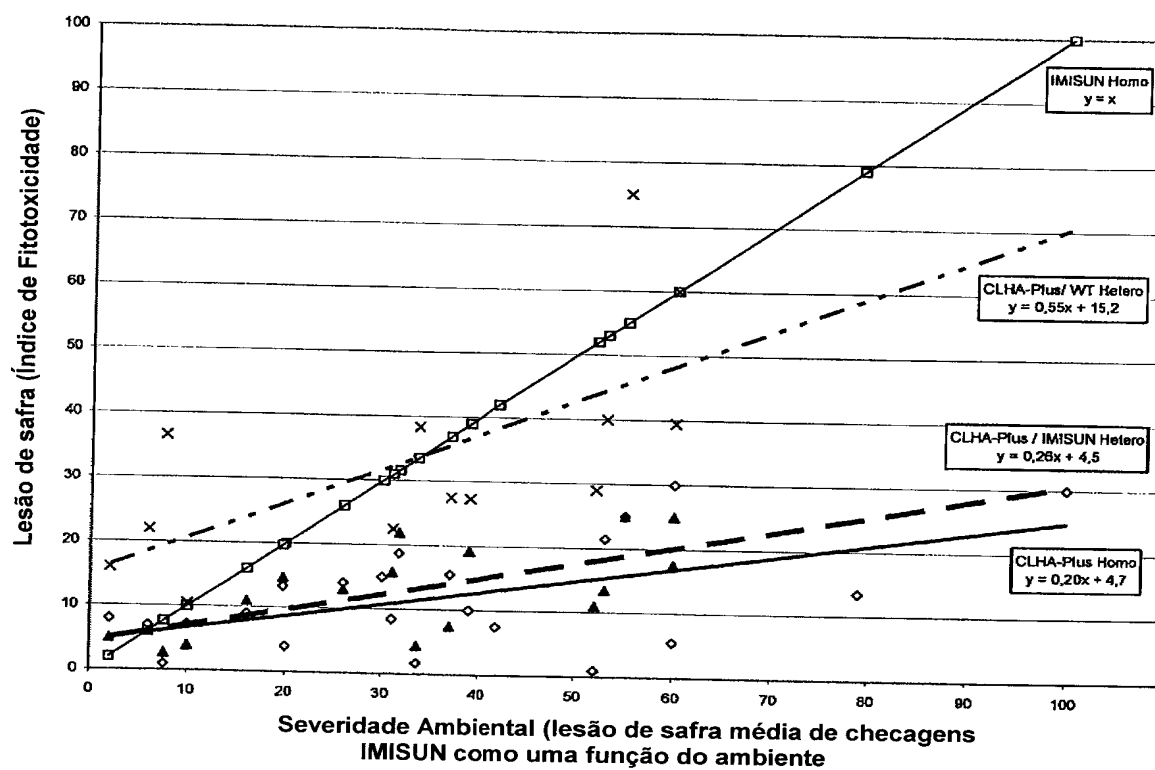


FIGURA 13

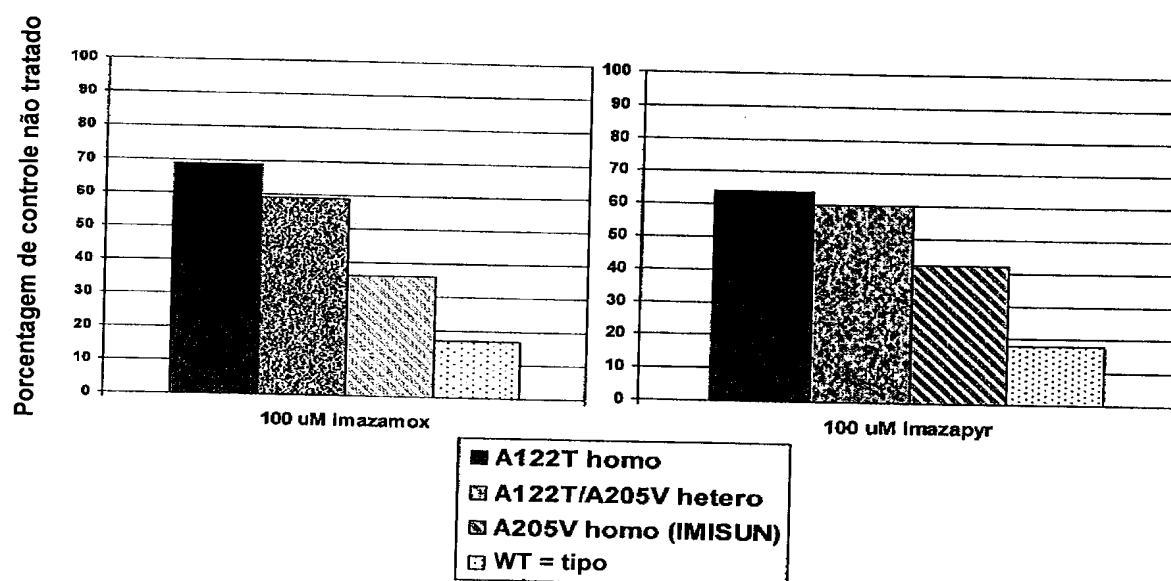
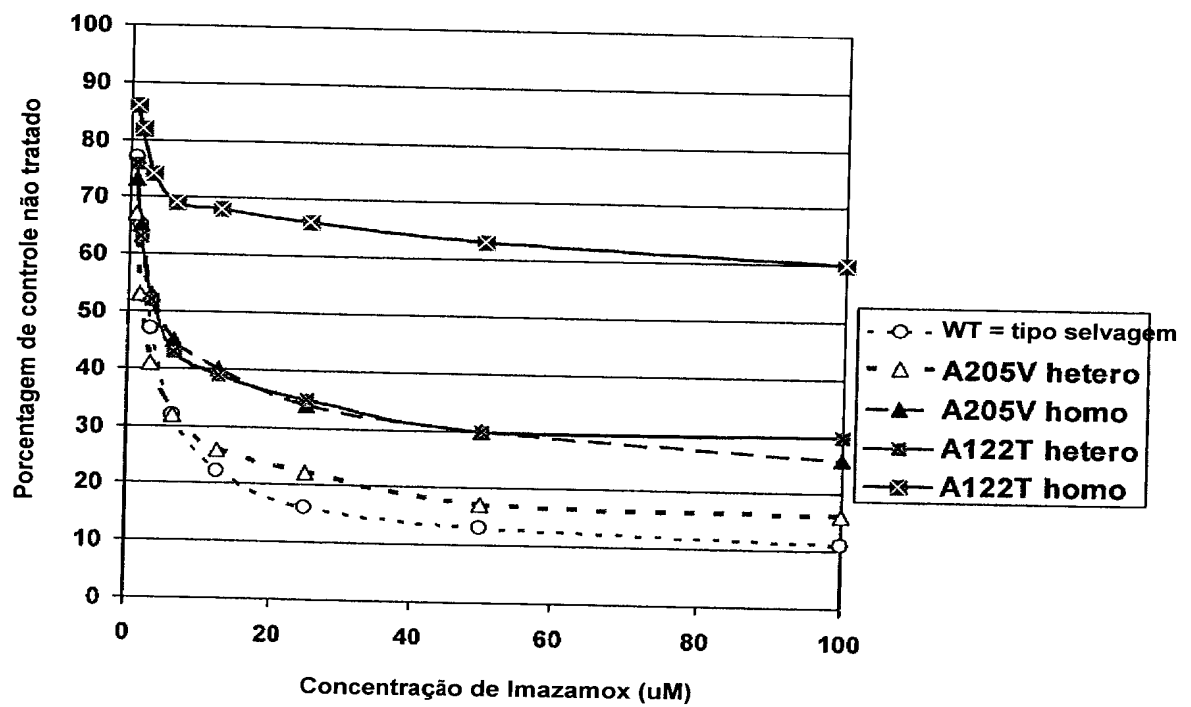


FIGURA 14

RESUMO

“PLANTA DE GIRASSOL, MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE GIRASSOL HÍBRIDA, PARA CONTROLAR ERVAS DANINHAS NA VIZINHANÇA DE UMA PLANTA DE GIRASSOL, PARA COMBATER VEGETAÇÃO INDESEJADA, PARA CONTROLAR OROBANCA QUE CRESCE SOBRE UMA PLANTA DE GIRASSOL, E PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL, SEMENTE DE GIRASSOL, E, KIT PARA GENOTIPAR ACETOIDROXIÁCIDO SINTASE GRANDE DE GIRASSOL”

Plantas de girassol resistentes a herbicida que compreendem dois alelos resistentes a herbicida diferentes do gene da subunidade 1 grande da acetoidroxiácido sintase de girassol (AHASL1) são descritas. Métodos para fabricar estas plantas de girassol e métodos para controlar ervas daninhas ou outra vegetação indesejada que cresce na vizinhança destas plantas de girassol são divulgados. Tais métodos envolvem o uso de herbicidas que inibem a acetoidroxiácido sintase. Métodos para controlar ervas parasíticas que crescem nas plantas de girassol também são descritos. São adicionalmente fornecidos métodos para determinar o genótipo de plantas de girassol para o gene AHASL1.