



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

(11) PI 0806200-5 B1

(22) Data do Depósito: 11/01/2008

(45) Data de Concessão: 13/12/2016



(54) Título: MÉTODOS DE CONTROLE DE ERVAS E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA LINHAGEM VEGETAL HÍBRIDA DE SORGO

(51) Int.Cl.: A01H 1/00; A01H 5/00; A01H 5/10; C12N 15/29

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2007 US 60/880,125

(73) Titular(es): KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

(72) Inventor(es): MITCHELL R. TUINSTRA; KASSIM AL-KHATIB

“MÉTODOS DE CONTROLE DE ERVAS E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA LINHAGEM VEGETAL HÍBRIDA DE SORGO”

[001] O presente pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório Norte-Americano nº 60/880.125, depositado em doze de janeiro de 2007 e incorporado integralmente ao presente como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção fornece composições e métodos de produção de plantas de safras que são resistentes a herbicidas. Particularmente, a presente invenção fornece plantas de sorgo, tecidos vegetais e sementes de plantas que contêm genes de acetil-CoA carboxilase (ACC) alterados e proteínas que são resistentes à inibição por herbicidas que normalmente inibem a atividade da proteína ACC.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Sorgo é o segundo cereal alimentício mais importante cultivado nos Estados Unidos. A produção é economicamente fundamental para fazendas que operam em áreas pouco chuvosas, devido à capacidade do sorgo de tolerar calor e seca. As indústrias de criação de animais e bioenergia utilizam sorgo como um substrato de energia, de forma a torná-lo uma safra versátil.

[004] Em todo o mundo, sorgo é o quinto principal cereal. Como é tolerante à seca e ao calor, ele é facilmente o cereal alimentício mais amplamente cultivado nas regiões semiáridas da África subsahariana e na região peninsular central seca da Índia. Desta forma, sorgo é utilizado para consumo humano na maior parte das regiões mais secas do mundo, o que o torna uma safra alimentícia de importância fundamental nesses locais.

[005] O desenvolvimento de resistência a herbicidas em plantas oferece vantagens produtivas e econômicas significativas; por isso, o uso de herbicidas para controle de ervas ou plantas em safras tornou-se uma prática

quase universal. A aplicação desses herbicidas pode também resultar, entretanto, em morte ou crescimento reduzido da planta de safra desejada, tornando o tempo e o método de aplicação de herbicida crítico ou, em alguns casos, inviáveis.

[006] É de interesse específico para os fazendeiros o uso de herbicidas com maior potência, ampla eficácia de espectro contra ervas e rápida degradação no solo. Plantas, tecidos vegetais e sementes com resistência a esses compostos forneceriam uma solução atrativa ao permitirem o uso dos herbicidas para o controle do crescimento de ervas, sem risco de danos à safra. Uma dessas classes de herbicidas de amplo espectro são os compostos que inibem a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) em plantas. Esses herbicidas são incluídos nas famílias químicas de ariloxifenoxipropionato (FOP) e ciclo-hexanodiona (DIM). Sorgo, por exemplo, é suscetível a muitos herbicidas inibidores de ACC que se dirigem a espécies monocotiledôneas, tornando quase impossível o uso desses herbicidas no controle de ervas gramíneas.

[007] Foram encontradas certas espécies de ervas gramíneas que exibem sensibilidade alterada a herbicidas FOP e DIM. Uma espécie de grama, a grama preta (*A. myosuroides* (Huds.)), é uma erva gramínea importante na Europa. Foram encontradas diversas mutações no genoma de algumas plantas de grama preta que conferem resistência contra alguns herbicidas FOP e DIM, mas não todos (Délye et al, 2005, *Plant Phys.* 137: 794-806; Délye et al, 2002, *Theor. Appl. Genet.* 104: 1114-1120). Descobertas similares foram encontradas em ervas gramíneas mutantes, tais como erva castelhana anual (*L. rigidum* (Gaud.)); Délye et al, 2002, *Pest Manag. Sci.* 58: 474-478), cauda de raposa verde (*S. viridis* (L. Beauv.)); Zhang e Devine, 2000, *Weed Sci. Soc. Am.* 40: 33; Délye et al, 2002, *Planta* 214: 421-427) e aveia silvestre (*A. fatua* (L.)); Christoffers et al, 2002, *Genome* 45: 1049-1056). Um

híbrido de milho resistente a herbicidas (DK592 da Dekalb) possui uma mutação na enzima ACC similar à encontrada em ervas gramínea (Zagnitko et al, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6617-22).

[008] Devido à importância mundial de sorgo como planta de safra, são necessários híbridos de sorgo que sejam resistentes aos efeitos inibidores de herbicidas ACC, de forma a permitir maior rendimento de safra quando esses herbicidas forem utilizados no controle de ervas gramíneas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[009] A presente invenção fornece composições e métodos de produção de cultivares de sorgo que são resistentes a herbicidas. Particularmente, a presente invenção fornece plantas de sorgo, tecidos vegetais e sementes de plantas que contêm genes de acetil-CoA carboxilase (ACC) alterados e proteínas que são resistentes à inibição por herbicidas que normalmente inibem a atividade da proteína ACC.

[010] Sorgo cultivado (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é susceptível a muitos herbicidas inibidores de ACC dirigidos a espécies de ervas gramíneas ou monocotiledôneas. Conforme descrito no presente, entretanto, foi encontrado um genótipo de sorgo que exibe tolerância a herbicidas inibidores de ACC. Uma análise genética identificou diferenças genéticas em um germoplasma de sorgo selvagem que resulta em um fenótipo de resistência a herbicidas ACC.

[011] Em uma realização, a presente invenção fornece uma ou mais plantas de sorgo cujo germoplasma compreende uma mutação que torna a planta tolerante a herbicidas ACC. Além disso, em realizações adicionais, a presente invenção refere-se aos descendentes (tais como F1, F2, F3 etc.) de um cruzamento da mencionada planta em que o germoplasma dos mencionados descendentes possui a mesma mutação da planta original. Realizações da presente invenção fornecem, portanto, híbridos de sorgo cujo

germoplasma contém uma mutação, de tal forma que o fenótipo das plantas seja resistente a herbicidas ACC. Em algumas realizações, os mencionados descendentes (tais como F1, F2, F3 etc.) são o resultado de um cruzamento entre linhagens de sorgo de elite, pelo menos uma das quais contém um germoplasma que compreende uma mutação que torna a planta tolerante a herbicidas ACC.

[012] Em uma realização, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo em que o mencionado germoplasma híbrido de sorgo confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase em níveis do mencionado um ou mais herbicidas que normalmente inibiriam o crescimento de um híbrido de sorgo. Em algumas realizações, os mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase são das famílias químicas de ariloxifenoxipropionato (FOP) e ciclo-hexanodiona (DIM). Em algumas realizações, o mencionado germoplasma híbrido de sorgo que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase compreende uma ou mais mutações no gene acetil-CoA carboxilase encontrado em ATCC N^o PTA-8033 ou conforme encontrado em ATCC N^o PYA-8034.

[013] Em uma realização, a presente invenção fornece um método de controle de ervas nas proximidades de um híbrido de sorgo, que compreende o fornecimento de um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase, aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase a um campo que compreende um híbrido de sorgo, e controle de ervas nas proximidades do mencionado híbrido de sorgo, de tal forma que o crescimento de ervas seja prejudicado pela aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas e o crescimento do mencionado híbrido de sorgo não seja prejudicado. Em algumas realizações, os mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase são das famílias químicas de ariloxifenoxipropionato

(FOP) e ciclo-hexanodiona (DIM). Em algumas realizações, o mencionado híbrido de sorgo compreende uma ou mais mutações no gene acetil-CoA carboxilase encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034.

[014] Em uma realização, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo, em que o mencionado híbrido de sorgo compreende um germoplasma que compreende uma ou mais mutações nos genes de acetil-CoA carboxilase, de forma a conferir resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase ao mencionado híbrido. Em algumas realizações, o mencionado híbrido de sorgo é criado por meio de introgressão de um germoplasma de sorgo que compreende as mencionadas uma ou mais mutações para conferir resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase. Em algumas realizações, o mencionado híbrido de sorgo é criado por meio de incorporação de um gene heterólogo que compreende uma ou mais mutações para conferir resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase.

[015] Em uma realização, a presente invenção fornece um método de produção de uma linhagem vegetal de híbridos de sorgo resistente a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase que compreende a identificação de um germoplasma que confere a mencionada resistência a herbicidas, em que o mencionado germoplasma resistente a herbicidas é derivado de uma planta de sorgo resistente a herbicidas, e introdução do mencionado germoplasma em uma linhagem de planta de sorgo de elite. Em algumas realizações, a mencionada introdução do mencionado germoplasma na mencionada linhagem de planta de sorgo de elite é realizada por meio de introgressão. Em algumas realizações, a mencionada introdução do mencionado germoplasma na mencionada linhagem de planta de sorgo de elite é realizada por meio de introdução de um gene heterólogo.

[016] Em uma realização, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo, em que o germoplasma do mencionado híbrido conferiu resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase e resistência a um ou mais compostos de um ou mais grupos de herbicida que não sejam inibidores de acetil-CoA carboxilase.

[017] Em uma realização, a presente invenção fornece um método de identificação de linhagens de plantas de sorgo resistentes à herbicidas de acetil-CoA carboxilase, que compreende o fornecimento de uma amostra de ácido nucleico de uma planta de sorgo, fornecimento de primers de amplificação para amplificar uma região de uma planta de sorgo correspondente a um gene de acetil-CoA carboxilase presente na mencionada amostra de ácido nucleico, aplicação dos mencionados primers de amplificação à mencionada amostra de ácido nucleico, de tal forma que ocorra a amplificação da mencionada região do mencionado gene de acetil-CoA carboxilase, e identificação de plantas de sorgo resistentes a herbicidas acetil-CoA carboxilase com base na presença de uma ou mais mutações que conferem resistência ao herbicida acetil-CoA carboxilase presente na mencionada amostra de ácido nucleico amplificada.

[018] Em uma realização, a presente invenção fornece sementes de sorgo, em que o mencionado germoplasma das mencionadas sementes compreende um gene de acetil-CoA carboxilase mutante de tal forma que a mencionada mutação confira resistência à inibição por herbicidas de acetil-CoA carboxilase. Em algumas realizações, o germoplasma das mencionadas sementes de sorgo compreende um gene acetil-CoA carboxilase mutante encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034. Em algumas realizações, a presente invenção fornece plantas de sorgo que crescem das mencionadas sementes e partes de plantas adicionais que compreendem as mencionadas plantas de sorgo cultivadas a partir das mencionadas sementes.

Em algumas realizações, o gene acetil-CoA carboxilase mutante é um fragmento funcional do gene encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034, de tal forma que o fragmento genético codifique um fragmento de proteína que seja suficiente para conferir resistência à inibição por herbicidas de acetil-CoA carboxilase a uma planta de sorgo. Em algumas realizações, a presente invenção fornece plantas de sorgo que crescem das mencionadas sementes e partes de plantas adicionais que compreendem as mencionadas plantas de sorgo cultivadas a partir das mencionadas sementes.

[019] Em algumas realizações, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo que compreende um gene que é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene acetil-CoA carboxilase encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034. Em algumas realizações, o gene de resistência a herbicida acetil-CoA carboxilase que é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo a SEQ ID N° 1 encontrado em ATCC N° PTA-8033 e/ou ATCC N° PYA-8034 compreende uma ou mais substituições de aminoácidos, tais como Trp₂₀₂₇Cys encontrada em SEQ ID N° 1.

[020] Em uma realização, a presente invenção fornece adicionalmente plantas híbridas de sorgo que possuem todas as características fisiológicas e morfológicas da mencionada planta de sorgo cultivada a partir da mencionada semente de sorgo. Em realizações adicionais, a presente invenção fornece cultivos de tecido e cultivos de tecido regenerados que surgem da mencionada semente de sorgo ou da mencionada parte de planta de sorgo que compreende uma mutação no mencionado gene de acetil-CoA carboxilase encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034.

[021] Em uma realização, a presente invenção fornece um método de produção de sementes de sorgo que compreende o cruzamento de uma planta que compreende um gene acetil-CoA carboxilase mutante encontrado em ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034 consigo próprio ou uma segunda planta de sorgo e coleta da mencionada semente do mencionado cruzamento. Em algumas realizações, os métodos de produção da mencionada semente de sorgo compreendem o plantio de uma linhagem de sorgo com semente parental em que a mencionada linhagem de semente parental compreende um germoplasma que confere resistência a herbicidas acetil-CoA carboxilase com uma linhagem de sorgo polinizador parental, em que o mencionado germoplasma de linhagem de semente e/ou polinizador compreende um germoplasma que confere resistência a herbicidas de acetil-CoA carboxilase, cultivo das mencionadas plantas de sorgo polinizador e de semente parental juntas, permissão que as mencionadas plantas de sementes parentais sejam polinizadas pelas mencionadas plantas polinizadoras parentais e colheita da semente resultante da mencionada polinização.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[022] A Figura 1 exibe a mutação de triptofano (TGG) em cisteína (TGC) no gene ACC de sorgo considerado associado à resistência a herbicida ACC.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

[023] Da forma utilizada no presente, os termos "variedade" e "cultivo" designam plantas que são definidas pela expressão das características resultantes de um dado genótipo ou combinação de genótipos, diferenciadas de qualquer outro agrupamento vegetal pela expressão de pelo menos uma das características e considerados uma unidade com respeito à sua adequação a terem sua propagação inalterada.

[024] Da forma utilizada no presente, o termo "híbrido" designa os descendentes ou a prole de parentes vegetais geneticamente dissimilares ou estoque produzido como resultado da polinização cruzada controlada em oposição a sementes não híbridas produzidas como resultado da polinização natural.

[025] Da forma utilizada no presente, o termo "progenicidade" designa gerações de uma planta, em que os ancestrais da geração podem ser rastreados de volta para a mencionada planta.

[026] Da forma utilizada no presente, o termo "derivado" de uma planta resistente a herbicidas inclui a prole daquela planta resistente a herbicidas, bem como qualquer derivado mutante, recombinante ou elaborado geneticamente daquela planta, seja da mesma espécie ou de uma espécie diferente, em que a(s) característica(s) de resistência a herbicidas da planta resistente a herbicidas original foi(ram) transferida(s) para a planta derivada.

[027] Da forma utilizada no presente, a expressão "tecido vegetal" inclui tecidos diferenciados e não diferenciados de plantas, incluindo os presentes em raízes, brotos, folhas, pólen, sementes e tumores, bem como células em cultivo (tais como células isoladas, protoplastas, embriões, calos etc.). O tecido vegetal pode estar na planta, no cultivo de órgãos, cultivo de tecidos ou cultivo de células.

[028] Da forma utilizada no presente, a expressão "parte de planta", da forma utilizada no presente, designa uma estrutura de planta ou tecido vegetal, tal como pólen, óvulo, tecido, vagem, semente e célula. Em algumas realizações da presente invenção, plantas transgênicas são plantas de safra.

[029] Da forma utilizada no presente, as expressões "safra" e "planta de safra" são utilizadas no seu sentido mais amplo. A expressão inclui, mas sem limitações, qualquer espécie de planta comestível por seres humanos

ou utilizada como alimento para animais, peixe ou animais marinhos, ou consumida por seres humanos, utilizada por seres humanos, observada por seres humanos, ou qualquer planta utilizada na indústria, comércio ou educação.

[030] Da forma utilizada no presente, as expressões "geração F" e "geração filial" designam qualquer das gerações consecutivas de plantas, células, tecidos ou organismos após um cruzamento biparental. A geração resultante de um acasalamento de um cruzamento biparental (ou seja, dois pais) é a primeira geração filial (denominada "F1" ou "F₁") com referência a uma semente e sua planta, enquanto a resultante do cruzamento de F1 individual é a segunda geração filial (denominada "F2" ou "F₂") com referência a uma semente e sua planta. Uma semente F2 e uma planta resultante são produzidas, por exemplo, por meio de autopolinização ou polinização cruzada de F1, enquanto gerações F posteriores são produzidas por meio de autopolinização ou polinização cruzada da geração imediatamente anterior.

[031] Da forma utilizada no presente, o termo "germoplasma" designa qualquer material genético de plantas que contenham unidades funcionais de hereditariedade.

[032] Da forma utilizada no presente, a expressão "germoplasma de elite", com referência a uma planta, designa material hereditário com superioridade genética comprovada.

[033] Da forma utilizada no presente, a expressão "planta de elite" designa qualquer planta que tenha resultado do cultivo e seleção de desempenho agrônômico superior.

[034] Da forma utilizada no presente, o termo "traço" indica uma característica observável e/ou mensurável de um organismo. A presente invenção descreve, por exemplo, plantas que são resistentes a herbicidas FOP e DIM.

[035] Da forma utilizada no presente, as expressões "marcador", "marcador de DNA" e "marcador molecular" com referência a um "marcador selecionável" designam um traço fisiológico ou morfológico que pode ser determinado como marcador para sua própria seleção ou para seleção de outros traços com relação próxima àquele marcador. Esse marcador poderá ser, por exemplo, um gene ou traço associado à tolerância a herbicidas, incluindo, mas sem limitações, repetição de sequências simples (SSR), polimorfismo de nucleotídeos isolados (SNP), inserções e/ou exclusões genéticas e similares.

[036] Da forma utilizada no presente, os termos "introgreir", "introgreindo" e "introgressão" designam técnicas de cultivo de polinização convencionais (ou seja, clássicas) para incorporar material genético externo a uma linha de estoque de cultivo. A presente invenção fornece, por exemplo, plantas de safra de sorgo que sofreram introgressão com um gene ACC mutante para tolerância a herbicidas pro meio de cruzamento de duas gerações de plantas.

[037] Da forma utilizada no presente, a expressão "tipo selvagem", quando utilizada com referência a um gene, designa um gene funcional comum ao longo de toda uma população vegetal. Um gene do tipo selvagem funcional é aquele que é mais freqüentemente observado em uma população e, portanto, é denominado arbitrariamente a forma "normal" ou "tipo selvagem" do gene.

[038] Da forma utilizada no presente, as expressões "modificado", "mutante" ou "mutante funcional", quando incluídas com referência a um gene ou produto genético, designam, respectivamente, um gene ou produto genético que exibe modificações de sequência e/ou propriedades funcionais (ou seja, características alteradas) em comparação com o produto genético ou gene do tipo selvagem. Desta forma, os termos

“modificado” e “mutante”, quando utilizados com referência a uma sequência de nucleotídeos, designam uma sequência de ácido nucleico que difere em um ou mais nucleotídeos entre si, normalmente sequência ácida de nucleotídeos relacionados, e a expressão “mutante funcional”, quando utilizada com referência a um polipeptídeo codificado pelo mencionado ácido nucleico “modificado” ou “mutante”, designa a proteína ou o polipeptídeo que retém a atividade. No presente pedido, a proteína mutante de ACC, ou seu “mutante funcional”, é um gene ACC que retém a sua atividade nativa para criar aminoácidos essenciais. Além disso, uma sequência de nucleotídeos “modificada” é interpretada como a encontrada no código genético degenerado conhecido pelos técnicos no assunto. O código genético é degenerado, por exemplo, porque existem casos nos quais códons diferentes especificam o mesmo aminoácido; um código genético no qual alguns aminoácidos podem ser codificados por mais de um códon cada um. Contempla-se que a presente invenção pode compreender essa degeneração (ou seja, em que um híbrido de sorgo compreende um gene ACC que é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo a SEQ ID Nº 1) conforme encontrado, por exemplo, no germoplasma de sorgo.

[039] Da forma utilizada no presente, o termo “heterólogo”, quando utilizado com referência a um gene ou ácido nucleico, designa um gene que tenha sido manipulado de alguma forma.

[040] Da forma utilizada no presente, o termo “parte” ou “fragmento funcional”, quando utilizado com referência a uma proteína (como em “um fragmento de uma dada proteína”, “um fragmento de proteína”, “uma parte de uma proteína”) designa fragmentos daquela proteína. Os fragmentos podem variar de tamanho de quatro resíduos de aminoácidos até a sequência

amino inteira menos um aminoácido. Na presente invenção, o fragmento de proteína é preferencialmente funcional, de tal forma que o fragmento de proteína confira resistência à inibição a herbicidas de ACC a uma dada planta.

[041] Acetil-CoA carboxilase (ACC) é uma enzima biotinilada que catalisa a carboxilação de acetil-CoA para produzir malonil-CoA. Esta carboxilação é uma reação reversível de duas etapas que consiste na carboxilação dependente de ATP do grupo biotina sobre o domínio de veículo carboxila por meio de atividade de biotina carboxilase seguida pela transferência do grupo carboxila de biotina em acetil-CoA pela atividade de carboxil transferase (Nikolau et al, 2003, *Arch. Biochem. Biophys.* 414:211-22). Acetil-CoA carboxilase não é apenas uma enzima fundamental em plantas para a biossíntese de ácidos graxos, um processo que ocorre em cloroplastas e mitocôndria, mas ACC também desempenha um papel na formação de ácidos graxos de cadeia longa e flavonóides, bem como em malonilação que ocorre no citoplasma. Existem duas isoformas de ACC, em que o ACC cloroplástico representa mais de 80% da atividade total de ACC (Herbert et al, 1996, *Biochem. J.* 318: 997-1006). Ariloxifenoxipropionato (FOP) e ciclo-hexanodiona (DIM) são duas classes de substâncias que conhecidamente inibem seletivamente ACC cloroplástico em gramas (Rendina et al, 1990, *J. Agric. Food Chem.* 38: 1282-1287).

[042] Sementes de 83 populações de sorgo selvagem da Bolívia foram plantadas e avaliadas para determinar a tolerância a herbicidas ACC. Um dos genótipos de sorgo selvagem, Bol-71, expressou altos níveis de tolerância a cada um dos herbicidas testados. Demonstrou-se no presente que o cruzamento do sorgo selvagem Bol-71 com linhagens vegetais de sorgo parentais de elite gera boa resistência a herbicida ACC e ajuste de sementes em híbridos F1. Sementes de Bol-71 e ATx623 cruzados, denominadas KSU

06GHATx623x174 (tal como prole F1), por exemplo, foram depositadas na ATCC conforme descrito no presente.

[043] Desta forma, uma realização da presente invenção fornece um germoplasma de sorgo que contém proteínas e genes ACC alterados. Em algumas realizações, a presente invenção fornece o uso de herbicidas ACC em campos de plantas de safra de sorgo híbrido para reduzir a quantidade de plantas de ervas monocotiledôneas presentes no mencionado campo de safra, em que o mencionado germoplasma de sorgo híbrido compreende uma enzima ACC alterada que confere resistência a herbicidas de ACC e as mencionadas plantas de ervas são susceptíveis a herbicida ACC.

[044] Em uma realização, a presente invenção fornece um germoplasma de sorgo que confere resistência à inibição por herbicidas ACC, isoladamente ou em conjunto com outros traços de resistência, tais como resistência a insetos contra a broca das hastes manchada *Chilo partellus* (Girijashankar et al, 2005, *Plant Cell Rep.* 24: 513-522, integralmente incorporado ao presente). Em algumas realizações, por exemplo, um híbrido de sorgo cujo germoplasma compreende um gene cryI Ac sintético de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sofre introgressão em uma linhagem de sorgo cujo germoplasma confere resistência a herbicidas ACC. Da mesma forma, a incorporação de resistência a herbicida ACC e resistência a insetos é realizada por meio de transgênese vegetal no mesmo híbrido de sorgo. Os técnicos no assunto reconhecerão os vários métodos descritos no presente que são aplicáveis à incorporação de dois ou mais atributos de resistência ao mesmo híbrido de sorgo.

[045] Em uma realização, a presente invenção fornece resistência a herbicida ACC em plantas de sorgo que compreendem, por exemplo, um germoplasma de ACC denominado KSU 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 depositado com números de acesso ATCC PTA-8033 e

PYA-8034, respectivamente, incorporados em variedades de sorgo de elite por meio de cultivo e seleção vegetal, de forma a proporcionar o desenvolvimento de híbridos de safras de sorgo tolerantes a herbicidas que tolerarão o uso de herbicidas inibidores de ACC para controle de ervas. O desenvolvimento desse traço de tolerância a herbicidas nos híbridos mencionados acima permite o uso desses herbicidas no controle de ervas monocotiledôneas que crescem na presença dessas safras. Em algumas realizações, a incorporação do germoplasma de resistência a ACC em linhagens de elite é realizada por meio de introgressão ou de métodos de cultivo clássicos. Em algumas realizações, a incorporação do gene de resistência de ACC em linhagens de elite é realizada por meio de transgênese de genes heterólogos. Em algumas realizações, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo, em que pelo menos um ancestral do híbrido de sorgo compreende um gene resistente a ACC de germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714, depositados com números de acesso ATCC PTA-8033 e PYA-8034, respectivamente. Em algumas realizações, o gene de resistência a herbicida ACC é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714. Em algumas realizações, o gene de resistência a herbicida ACC é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 que compreende uma substituição de aminoácido Trp₂₀₂Cys.

[046] Em algumas realizações, germoplasma resistente a herbicida ACC sofre introgressão em uma linhagem de sorgo de elite utilizando métodos de cultivo clássicos. Exemplos de métodos de cultivo clássicos para sorgo podem ser encontrados, por exemplo, em Sleper e Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops*, quinta edição, Blackwell Publishing, integralmente incorporado ao presente.

[047] Em uma realização, o germoplasma resistente a herbicida ACC sofre introgressão em uma planta de sorgo que fornece alimento para consumo humano. Em algumas realizações, o germoplasma resistente a herbicida ACC sofre introgressão em plantas de sorgo que fornecem alimentos para animais (tais como aves, bois, porcos, carneiros etc.). Em algumas realizações, o germoplasma resistente a herbicida ACC sofre introgressão em plantas de sorgo que são utilizadas em processos industriais, tais como produção de etanol. Em uma realização, o gene resistente a herbicida ACC é introduzido no genoma vegetal por meio de transgênese, utilizando vetores e tecnologias conhecidas na técnica.

[048] Em algumas realizações, a presente invenção fornece um germoplasma resistente a ACC de uma parte de planta de sorgo de linhagem Bol-71 e Atx623, em que a semente da mencionada planta de sorgo foi depositada com números de acesso ATCC PTA-8033 e PYA-8034, respectivamente, e a mencionada parte de planta de sorgo é uma ou mais dentre pólen, óvulo, tecido, vagem, semente e célula. Em uma realização, a presente invenção fornece um híbrido de F1 cujo germoplasma compreende um gene de resistência a ACC conforme descrito no presente. Em algumas realizações, o híbrido F1 é um cruzamento entre duas linhagens de sorgo de elite, pelo menos uma das quais contém um germoplasma que compreende um gene de resistência a ACC conforme descrito no presente.

[049] Em uma realização, a presente invenção fornece métodos de controle de ervas em um campo de plantas de safra de sorgo híbrido. Em

algumas realizações, o controle das ervas compreende a aplicação de um herbicida ACC ao mencionado campo de plantas de sorgo, de forma a inibir o crescimento das ervas sem prejudicar o crescimento de sorgo. Em algumas realizações, o herbicida ACC é aplicado a partir da família de herbicidas de ariloxifenoxipropionato (FOP), que inclui, mas sem limitações, compostos de clodinafop-propargil, ci-halofopbutil, diclofopmetil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, haloxifopetoxietil, haloxifopetotil, haloxifop-R-metil, propaquizafop, quizalofop-P-etil e quizalo-P-tefuril. Em algumas realizações, o herbicida ACC que é aplicado é da família de herbicidas de ciclo-hexanodionas (DIM) que inclui, mas sem limitações, compostos de aloxidim, butroxidim, clefoxidim, cletodim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim e tralcoxidim. Em algumas realizações, o herbicida ACC que é aplicado compreende uma combinação de compostos de famílias de herbicidas ACC FOP e DIM conforme descrito no presente. O presente pedido não se limita, entretanto, ao herbicida ACC utilizado e os técnicos no assunto apreciarão que estão sendo revelados novos herbicidas ACC a qualquer momento que inibem a enzima ACC.

[050] Em uma realização, a presente invenção fornece um híbrido de sorgo (tal como F1, F2, F3, F4 etc.), cujo germoplasma confere resistência a herbicidas de ACC e resistência a um ou mais herbicidas adicionais de um ou mais grupos de herbicidas diferentes. Grupos de herbicidas adicionais utilizados para inibir o crescimento de ervas incluem, por exemplo, mas sem limitações, inibidores da síntese de lipídios (tais como ariloxifenoxipropionatos, ciclo-hexanodionas, benzofuranos, ácidos clorocarbônicos, fosforoditioatos, tiocarbamatos), inibidores da fotossíntese no fotossistema II (tais como carbamatos de fenila, piridazinonas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, uracilas, amidas, ureias, benzotiadiazinonas, nitrilas, fenilpiridinas), inibidores da fotossíntese no fotossistema I (tais como bipyridílios), inibidores de protoporfirinogene oxidase (tais como difeniléteres, N-

fenilftalimidas, oxadiazóis, oxizolidinodionas, fenilpirazóis, pirimidinodionas, tiadiazóis), inibidores da biossíntese de carotenóides (tais como piridazinonas, piridinocarboxamidas, isoxazolidinonas, triazóis), inibidores de 4-hidroxfenilpiruvatodioxigenase (tais como calistemonas, isoxazóis, pirazóis, tricetonas), inibidores de EPSP sintetase (tais como glicinas), inibidores de glutamino sintetase (tais como ácidos fosfínicos), inibidores de di-hidropteroato sintase (tais como carbamatos), inibidores da montagem de microtúbulos (tais como benzamidas, ácidos benzóicos, dinitroanilinas, fosforoamidatos, piridinas), inibidores da divisão celular (tais como acetamidas, cloroacetamidas, oxiacetamidas), inibidores da síntese de paredes celulares (tais como nitrilas, triazolocarboxamidas) e inibidores do transporte de auxina (tais como ftalamatos, semicarbazonas). Em algumas realizações, a presente invenção fornece híbridos de F1 a partir de linhagens de sorgo de elite que compreende resistência a um ou mais herbicidas ACC isoladamente ou em conjunto com resistência a herbicidas para um ou mais dos grupos de herbicidas mencionados acima.

[051] Em uma realização, a presente invenção fornece o uso de um transgene que compreende um gene heterólogo tal como um gene que codifica uma proteína ACC mutante para fornecer o traço agrônômico selecionado de resistência a herbicida ACC. Em uma realização, o transgene compreende um gene ACC mutante conforme encontrado no germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 depositado com os números de acesso ATCC PTA-8033 e PYA-8034, respectivamente. Em algumas realizações, o transgene é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 (por exemplo, SEQ ID Nº 1). Em algumas realizações, o gene de resistência a herbicida

ACC é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 que compreende uma substituição de aminoácido Trp₂₀₂₇Cys.

CULTIVO CLÁSSICO DE SORGO

[052] As safras de campo vêm sendo cultivadas classicamente por meio de técnicas que se utilizam do(s) método(s) de polinização das plantas. Uma planta é considerada "autopolinizadora" caso o pólen de uma flor possa ser transmitido para a mesma ou para outra flor, enquanto as plantas são consideradas de "polinização cruzada" caso o pólen necessite vir de uma flor em uma planta diferente para que ocorra a polinização.

[053] As plantas que se autopolinizam e são selecionadas ao longo de muitas gerações tornam-se homozigóticas na maior parte, se não em todos os seus locais genéticos, de forma a produzir uma população uniforme de prole de cultivo verdadeiro. Um cruzamento entre duas plantas homozigóticas com fundos diferentes ou duas linhagens homozigóticas diferentes produzirá uma população uniforme de plantas híbridas que serão mais provavelmente heterozigóticas em uma série de locais genéticos. Um cruzamento de duas plantas que são heterozigóticas em uma série de locais genéticos produzirá uma geração de plantas híbridas que são geneticamente diferentes e não são uniformes.

[054] Plantas de sorgo são plantas autopolinizadoras, mas podem também ser cultivadas por meio de polinização cruzada. O desenvolvimento de híbridos de sorgo necessita do desenvolvimento de pais polinizadores (restauradores da fertilidade) e linhagens parentais de sementes utilizando o sistema restaurador da fertilidade e esterilidade de machos citoplasmáticos, o cruzamento de pais de sementes e pais polinizadores e a

avaliação dos cruzamentos. Programas de cultivo de pedigree combinam traços desejáveis; no presente pedido, o trato desejável é a resistência da planta a herbicidas ACC. Este trato é colocado no conjunto de cultivo de uma ou mais linhagens, de tal forma que novas linhagens cultivadas sejam criadas por meio de cruzamento, seguido por seleção de plantas com o traço desejado, seguida por mais cruzamento etc. Novos cultivos são cruzados com outras linhagens cultivadas (tais como linhagens vegetais de elite como as descritas no presente).

[055] O cultivo de pedigree começa com o cruzamento de dois genótipos, tais como Bol-71 e uma linhagem de sorgo de elite (tal como Tx430, 00MN7645, BTx623, ATx623, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 e Tx643, Tx2737, Tx2783 e HP162). Pai de sorgo selvagem Bol-71, por exemplo, foi cruzado com linhagens parentais de sorgo de elite que incluem Tx430, 00MN7645, BTx623 e ATx623. Caso os dois pais originais não forneçam todas as características desejadas, podem ser incluídas outras fontes na população de cultivo. Caso se deseje um híbrido tal que se desejasse a resistência a herbicida ACC e a resistência a outro grupo herbicida descrito no presente, plantas com esses dois atributos poderão ser cruzadas utilizando métodos de cultivo clássicos. No método de pedigree, plantas superiores são autofecundadas e selecionadas em gerações sucessivas. Nas gerações sucessivas, a condição heterozigótica dá lugar às linhagens homogêneas como resultado de autopolinização e seleção. Tipicamente, no método de pedigree, são praticadas cinco ou mais gerações de autofecundação e seleção (tais como S1, S2, S3, S4, S5 etc.).

[056] Utiliza-se retrocruzamento para aprimorar uma linhagem vegetal. O retrocruzamento transfere um traço desejável específico de uma fonte para outra que não possui o traço. Isso é conseguido, por exemplo, cruzando-se um doador (tal como Bol-71) em uma linha de cultivo (tal como

uma linha de elite conforme descrito no presente). A prole deste cruzamento é retrocruzada em seguida na linhagem cultivada de elite, seguida por seleção na prole resultante em busca do traço desejado (tal como resistência a herbicidas ACC). Após cinco ou mais gerações de retrocruzamento com seleção do traço desejado, a prole é tipicamente heterozigótica para o(s) local(is) que controla(m) o fenótipo desejado, mas será similar ao pai de elite para os demais traços genéticos. O último retrocruzamento é tipicamente autofecundado para gerar uma prole de cultivo pura para o gene sendo transferido.

[057] Em programas de cultivo de sorgo híbrido atuais, estão sendo desenvolvidas novas linhagens parentais para linhagens parentais de sementes (tais como Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 e Tx643) ou linhagens parentais de pólen (tais como Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645 e HP162), dependendo se elas contêm ou não genes restauradores da fertilidade; as linhagens parentais de semente não possuem genes de restauração da fertilidade e são estéreis machos em certos citoplasmas (também conhecidos como plantas de linhagem "A") e férteis machos em outros citoplasmas (também conhecidos como plantas de linhagem "B"), enquanto as linhagens parentais de pólen não são estéreis machos e contêm genes restauradores da fertilidade (também conhecidos como plantas de linhagem "R"). As linhagens parentais de sementes são tipicamente criadas para que sejam citoplasmaticamente estéreis machos, de forma que as anteras são mínimas a não existentes nessas plantas, de forma que necessitam de polinização cruzada. As linhagens parentais de sementes produzirão apenas sementes e o citoplasma somente é transmitido por meio do ovo. O pólen para polinização cruzada é fornecido por meio das linhagens parentais de pólen que contêm os genes necessários para restauração completa da fertilidade no híbrido de F1 e

o cruzamento combina-se com o pai de semente estéril macho para produzir um único híbrido cruzado com alto rendimento com boa qualidade de cereal.

[058] Tipicamente, este sistema restaurador da fertilidade e esterilidade macho citoplasmático é realizado para a produção de sementes híbridas por meio do plantio de blocos de fileiras de plantas estéreis machos (pai de semente) e blocos de fileiras de plantas restauradoras da fertilidade (pai de pólen), de tal forma que as plantas parentais de sementes sejam polinizadas pelo vento com pólen da planta parental de pólen. Este processo produz um híbrido com cruzamento único vigoroso que é colhido e plantado pelo consumidor.

[059] Plantas parentais de sementes estéreis machos podem também ser criadas por meio do cultivo genético de genes nucleares estéreis machos recessivos em uma população específica, mas o sistema restaurador da fertilidade e esterilidade macho citoplasmático é tipicamente o sistema utilizado para o cultivo de sorgo híbrido. Sleper e Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops*, quinta edição, Blackwell Publishing, fornece uma boa análise de procedimentos de cultivo de sorgo atuais e é integralmente incorporado ao presente.

[060] A presente invenção não se limita às linhagens de sorgo parentais de elite relacionadas e os técnicos no assunto reconhecerão que qualquer linhagem de sorgo de elite será igualmente propensa às composições e métodos descritos no presente.

TRANSGÊNICOS VEGETAIS

[061] Genes heterólogos destinados a expressão em plantas são montados em primeiro lugar em vetores de expressão que contêm um gene heterólogo e elementos de controle de tradução e transcrição apropriadas, cujos métodos são bem conhecidos dos técnicos no assunto. Os métodos incluem métodos de DNA recombinante *in vitro*, métodos sintéticos e

recombinação genética *in vivo*. Exemplos de métodos são amplamente descritos na técnica (vide, por exemplo, Sambrook et al (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, e Ausubel, F. M. et al (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque NY, incorporado ao presente como referência).

[062] Geralmente, estes vetores compreendem uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo ligado operativamente a uma sequência promotora e outras reguladoras (tais como amplificadores, sinais de poliadenilação etc.) necessárias para expressão em uma planta.

[063] Os promotores incluem, mas sem limitações, promotores constitutivos, promotores específicos de tecidos, órgãos e desenvolvimento e promotores indutíveis. Exemplos de promotores incluem, mas sem limitações: promotor constitutivo 35S de vírus mosaico da couve-flor; promotor indutível por feridas de tomate, leucino amino peptidase (Chao et al, 1999, *Plant Physiol.* 120: 979-992, incorporado ao presente como referência); um promotor quimicamente indutível de fumo, Relativo a Patogênese 1 (induzido por ácido salicílico e S-metil éster de ácido benzotiadiazolo-7-carbotioico); um promotor de choque de calor (Patente Norte-Americana nº 5.187.267, incorporada ao presente como referência); um promotor indutível por tetraciclina (Patente Norte-Americana nº 5.057.422, incorporada ao presente como referência); e promotores específicos de sementes.

[064] Os conjuntos de expressão podem compreender adicionalmente quaisquer sequências necessárias para expressão de mRNA. Estas sequências incluem, mas sem limitar-se a terminais de transcrição, amplificadores tais como introns, sequências virais e sequências destinadas ao direcionamento do produto genético a organelas e compartimentos celulares específicos.

[065] Uma série de terminais de transcrição é disponível para uso em expressão de sequências utilizando os promotores tais como os descritos no presente. Os terminais de transcrição são responsáveis pelo término da transcrição além do transcrito e sua poliadenilação correta. Terminais de transcrição apropriados e os que conhecidamente funcionam em plantas incluem, mas sem limitações, o terminal CaMV 35S, o terminal tml, o terminal rbcS E9 de ervilha e o terminal de nopalina e octopino sintase (Odell et al, 1985, *Nature* 313: 810; Rosenberg et al, 1987, *Gene*, 56: 125; Guerineau et al, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 262: 141; Proudfoot, 1991, *Cell*, 64: 671; Sanfacon et al, 1990, *Genes Dev.* 5: 141; Mogen et al, 1990, *Plant Cell*, 2: 1261; Munroe et al, 1990, *Gene*, 91: 151; Ballas et al, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 7891; Joshi et al, 1987, *Nucleic Acid Res.*, 15: 9627, todos os quais são incorporados ao presente como referência).

[066] Em algumas realizações, construções de expressão do gene heterólogo de interesse incluem uma ou mais sequências consideradas aumentando a expressão genética do interior da unidade de transcrição. Estas sequências podem ser utilizadas em conjunto com a sequência de ácido nucleico de interesse para aumentar a expressão em plantas. Demonstrou-se que diversas sequências de introns aumentam a expressão, particularmente em células monocotiledôneas. Sequências introns vêm sendo incorporadas rotineiramente em vetores de transformação vegetal, tipicamente dentro do líder não traduzido.

[067] Em algumas realizações, uma construção para expressão da sequência de ácido nucleico heteróloga de interesse também inclui um regulador tal como um sinal de localização nuclear (Kalderon et al, 1984, *Cell* 39: 499; Lassner et al, 1991, *Plant Molecular Biology* 17: 229), uma sequência de consenso de tradução vegetal (Joshi, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 6643), um introns (Luehrsen e Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225: 81) e

similares, ligados operativamente à seqüência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo.

[068] Ao preparar a construção que compreende a seqüência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo ou codifica uma seqüência projetada para reduzir a expressão do gene heterólogo, diversos fragmentos de DNA podem ser manipulados de forma a fornecer as seqüências de DNA na orientação desejada (tal como com ou sem sentido) e, conforme apropriado, no quadro de leitura desejado. Adaptadores ou ligantes podem ser empregados, por exemplo, para unir os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem ser utilizadas para fornecer locais de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de locais de restrição e similares. Com este propósito, emprega-se preferencialmente mutagênese *in vitro*, reparo de primers, restrição, combinação, ressecção, ligação e similares, em que são envolvidas inserções, exclusões ou substituições (tais como transições e transversões).

[069] Numerosos vetores de transformação são disponíveis para transformação vegetal. A seleção de um vetor para uso dependerá do método de transformação preferido e da espécie alvo para transformação. Para certas espécies alvo, são preferidos diferentes marcadores de seleção de herbicidas ou antibióticos. Marcadores de seleção utilizados rotineiramente em transformações incluem o gene *nptII* que confere resistência a canamicina e antibióticos relacionados (Messing e Vierra, 1982, *Gene* 19: 259; Bevan et al, 1983, *Nature* 304: 184, todos os quais são incorporados ao presente como referência), o gene de barra que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White et al, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18: 1062; Spencer et al, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 79: 625, todos os quais incorporados ao presente como referência), o gene *hph* que confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochliger e Diggelmann, 1984, *Mol. Cell. Biol.* 4: 2929, incorporado ao presente como

referência) e o gene dhfr que confere resistência a metotrexato (Bourouis et al, 1983, *EMBO J.*, 2: 1099, incorporado ao presente como referência).

[070] Em algumas realizações, o vetor de plasmídeo Ti (T-DNA) é adaptado para uso em um processo de transfecção mediado por *Agrobacterium* tal como na Patente Norte-Americana nº 6.369.298 (sorgo) e nas Patentes Norte-Americanas nº 5.981.839, 6.051.757, 5.981.840, 5.824.877 e 4.940.838, todas as quais são integralmente incorporadas ao presente como referência. A construção de plasmídeos Ti e Ri recombinantes geralmente segue os métodos tipicamente utilizados com vetores mais comuns, tais como pBR322. Pode-se fazer uso adicional de elementos genéticos acessórios às vezes encontrados com os plasmídeos nativos e às vezes construídos com sequências exógenas. Estas podem incluir, mas sem limitações, genes estruturais para resistência a antibióticos como genes de seleção.

[071] Existem dois sistemas de vetor de plasmídeo Ti e Ri recombinantes agora em uso. O primeiro sistema é denominado sistema "cointegrado". Neste sistema, o vetor impulsor que contém o gene de interesse é inserido por meio de recombinação genética em um plasmídeo de Ti não oncogênico que contém os elementos com ação cis e ação trans necessários para transformação vegetal, tais como no vetor impulsor pMLJ1 e no plasmídeo de Ti não oncogênico pGV3850. O uso de T-DNA como uma região formadora de flanco em uma construção para integração em um plasmídeo Ti ou Ri foi descrito em EPO nº 116.718 e nos Pedidos PCT nº WO 84/02913, 02919 e 02920; Herrera-Estrella, 1983, *Nature* 303: 209-213; Fraley et al, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 4803-4807; Horsch et al, 1984, *Science* 223: 496-498; e DeBlock et al, 1984, *EMBO J.* 3: 1681-1689 todos os quais são incorporados ao presente como referência.

[072] O segundo sistema é denominado sistema "binário", no qual são utilizados dois plasmídeos e o gene de interesse é inserido em um

vetor impulsor que contém os elementos com ação cis necessários para transformação vegetal. As outras funções necessárias são fornecidas em trans pelo plasmídeo Ti não oncogênico conforme exemplificado pelo vetor impulsor pBIN19 e pelo plasmídeo Ti não oncogênico PAL4404. Alguns destes vetores são disponíveis comercialmente.

[073] Em algumas realizações, a sequência de ácido nucleico de interesse é dirigida a um local específico sobre o genoma da planta. A integração dirigida ao local da sequência de ácido nucleico de interesse no genoma de célula vegetal pode ser atingida, por exemplo, por meio de recombinação homóloga utilizando sequências derivadas de *Agrobacterium*. Geralmente, as células vegetais são incubadas com uma linhagem de *Agrobacterium* que contém um vetor direcionador no qual as sequências que são homólogas a uma sequência de DNA no interior do local alvo são ladeadas por sequências de DNA de transferência (T-DNA) de *Agrobacterium*, conforme descrito anteriormente (Patente Norte-Americana nº 5.501.967, incorporada ao presente como referência). Os técnicos no assunto sabem que a recombinação homóloga pode ser atingida utilizando vetores de direcionamento que contêm sequências que são homólogas a qualquer parte do gene vegetal alvo, seja pertencentes aos elementos reguladores do gene ou às regiões de codificação do gene. Recombinação homóloga pode ser atingida em qualquer região de um gene vegetal, desde que seja conhecida a sequência de ácido nucleico de regiões que ladeiam o local a ser dirigido. *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria comum do solo que causa tumor bacteriano do colo por meio de transferência de parte do seu DNA ao hospedeiro vegetal. O DNA transferido (T-DNA) é integrado de forma estável ao genoma vegetal, em que a expressão gera a síntese de hormônios vegetais e, portanto, o crescimento tumoral das células. Um suposto complexo macromolecular forma-se no processo de transferência de T-DNA da célula bacteriana na célula vegetal.

[074] Em algumas realizações, os ácidos nucleicos descritos no presente são utilizados para construir vetores derivados de vírus de RNA (+) de plantas (tais como vírus mosaico de bromo, vírus mosaico de fumo, vírus mosaico da alfafa, vírus mosaico do pepino, vírus mosaico do tomate e suas combinações e híbridos). Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo inserido pode ser expresso a partir desses vetores na forma de proteína de fusão (tal como proteína de fusão de proteína de revestimento) ou do seu próprio promotor subgenômico ou outro promotor. Métodos de construção e uso desses vírus são descritos nas Patentes Norte-Americanas nº 5.846.795, 5.500.360, 5.173.410, 5.965.794, 5.977.438 e 5.866.785, todas as quais são incorporadas ao presente como referência.

[075] Em algumas realizações, uma sequência de ácido nucleico heterólogo de interesse que compreende um transgene ACC mutante conforme encontrado, por exemplo, no germoplasma denominado KSU 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 depositado com os números de acesso ATCC PTA-8033 e PYA-8034, respectivamente, é introduzida diretamente em uma planta. Em algumas realizações, o transgene é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 (por exemplo, SEQ ID Nº 1). Em algumas realizações, o transgene é pelo menos 70% homólogo, pelo menos 80% homólogo, pelo menos 85% homólogo, pelo menos 90% homólogo, pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo ou pelo menos 99% homólogo ao gene de herbicida resistente a ACC encontrado no germoplasma 06GH701-715bk ou KSU 06GHATx623x714 que compreende uma substituição de aminoácido Trp₂₀₂₇Cys.

[076] Um vetor útil para métodos de transferência genética direta em combinação com seleção pelo herbicida Basta (ou fosfinotricina) é uma versão modificada do plasmídeo pCIB246 com um promotor CaMV 35S em fusão operacional ao gene GUS de *E. coli* e o terminal de transcrição de CaMV 35S (WO 93/07278, incorporada ao presente como referência).

[077] Após a ligação operativa de uma seqüência de ácido nucleico que codifica o gene heterólogo a um promotor apropriado e inserção em um vetor apropriado para o método de transformação específico utilizado (tal como um dos vetores descritos acima), o DNA recombinante descrito acima pode ser introduzido na célula vegetal em uma série de formas reconhecidas na técnica. Os técnicos no assunto apreciarão que a seleção do método depende do tipo de planta destinada a transformação. Em algumas realizações, o vetor é mantido de forma episomal. Em algumas realizações, o vetor é integrado ao genoma. Em algumas realizações, a transformação direta no genoma de plastídeos é utilizada para introduzir o vetor na célula vegetal (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 5.451.513, 5.545.817 e 5.545.818; e o Pedido de Patente PCT nº WO 95/16783, todos os quais são integralmente incorporados ao presente como referência).

[078] O método básico de transformação de cloroplastas envolve a introdução de regiões de DNA de plastídeo clonado que ladeiam um marcador selecionável junto com o ácido nucleico que codifica as seqüências de interesse em um tecido alvo apropriado (utilizando, por exemplo, transformação biolística ou de protoplasta com cloreto de cálcio ou PEG). As regiões laterais de 1 a 1,5 kb, denominadas, seqüências de direcionamento, facilitam a recombinação homóloga com o genoma de plastídeo e, desta forma, permitem a substituição ou modificação de regiões específicas do plastoma. Inicialmente, são utilizadas mutações pontuais no rRNA de cloroplasta 16S e genes *rps12* que conferem resistência a espectinomicina e/ou estreptomicina

como marcadores selecionáveis de transformação (Svab et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 8526); Staub e Maliga, 1992, *Plant Cell*, 4: 39, todos os quais são incorporados ao presente como referência). A presença de locais de clonagem entre esses marcadores permite a criação de um plastídeo dirigido à introdução de vetor de moléculas de DNA exógenas (Staub e Maliga, 1993, *EMBO J.*, 12: 601). São obtidos aumentos substanciais da freqüência de transformação por meio de substituição dos genes de resistência a antibióticos de proteína r ou rRNA recessivos com um marcador selecionável dominante, o gene *aadA* bacteriano que codifica a enzima desintoxicante de espectinomicina aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase (Svab e Maliga, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 913). Outros marcadores selecionáveis úteis para transformação de plastídeos são conhecidos na técnica e englobados dentro do escopo da presente invenção. Plantas homoplasmáticas para genomas de plastídeo que contêm as duas sequências de ácidos nucleicos separadas por um promotor conforme a presente invenção são obtidas e preferencialmente são capazes de alta expressão de RNAs codificados pela molécula de DNA.

[079] Em uma realização, os vetores úteis na prática da presente invenção são microinjetados diretamente em células vegetais (Crossway, 1985, *Mol. Gen. Genet.*, 202: 179). Em algumas realizações, o vetor é transferido para a célula vegetal utilizando polietileno glicol (Krens et al, 1982, *Nature* 296: 72; Crossway et al, 1986, *BioTechniques* 4: 320); a fusão de protoplastas com outras entidades tais como minicélulas, células, lisossomos ou outros corpos de superfície de lipídios fusíveis (Fraley et al, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 79: 1859); e transformação de protoplastas (EP 0.292.435); transferência genética direta (Paszkowski et al, 1984, *EMBO J.*, 3: 2717; Hayashimoto et al, 1990, *Plant Physiol.* 93: 857).

[080] Em algumas realizações, o vetor pode também ser introduzido nas células vegetais por meio de eletroporação (Fromm, et al, 1985,

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 5824; Riggs et al, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 5602). Neste método, protoplastas vegetais sofrem eletroporação na presença de plasmídeos que contêm a construção genética. Impulsos elétricos com alta resistência de campo permeabilizam de forma reversível biomembranas que permitem a introdução dos plasmídeos. Protoplastas de plantas eletroporados reformam a parede celular, dividem-se e formam calos vegetais.

[081] Além da transformação direta, em algumas realizações, os vetores que compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica um gene heterólogo são transferidos utilizando transformação mediada por *Agrobacterium* (Hinchee et al, 1988, *Biotechnology* 6: 915; Ishida et al, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 745, todos os quais são incorporados ao presente como referência). *Agrobacterium* é um gênero representativo da família gram-negativa Rhizobiaceae. As suas espécies são responsáveis por tumores das plantas tais como tumor bacteriano do colo e doença de raízes com pelos. Na característica de tecido dediferenciado dos tumores, são produzidos e catabolisados derivados de aminoácidos conhecidos como opinas. Os genes bacterianos responsáveis pela expressão de opinas são uma fonte conveniente de elementos de controle para conjuntos de expressão quimérica. Sequências genéticas heterólogas (tais como sequências de ácido nucleico ligadas operativamente a um promotor conforme a presente invenção) podem ser introduzidas em células vegetais apropriadas, por meio do plasmídeo de Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (descrito anteriormente). O plasmídeo de Ti é transmitido para células vegetais mediante infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e é integrado de forma estável no genoma da planta (Schell, 1987, *Science*, 237: 1176). Espécies que são susceptíveis a infecção por *Agrobacterium* podem ser transformadas *in vitro*. Métodos de transformação para produção de plantas de sorgo transgênicas utilizando transformação

mediada por *Agrobacterium* são fornecidos na Patente Norte-Americana nº 6.369.298.

[082] Em algumas realizações, o vetor é introduzido por meio de aceleração de partículas balísticas (Patente Norte-Americana nº 4.945.050; Casas et al, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 11212, todas integralmente incorporadas ao presente como referência).

[083] Em algumas realizações, após seleção de material vegetal transformado que pode expressar um gene heterólogo que codifica uma de suas proteínas ou variantes heterólogas, plantas inteiras são regeneradas. Regeneração vegetal de protoplastas cultivados é descrita em Evans et al, *Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1: (MacMillan Publishing Co., Nova Iorque (1983); Vasil, I. R. (Ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984) e Vol. III (1986), integralmente incorporadas ao presente como referência. Sabe-se que muitas plantas podem ser regeneradas de tecidos ou células cultivadas que incluem, mas sem limitações, todas as espécies principais de cana de açúcar, beterraba de açúcar, algodão, frutas e outras árvores, legumes e vegetais, e monocotiledôneas (tais como as plantas descritas acima). Os meios de regeneração variam de uma espécie de planta para outra, mas geralmente é fornecida em primeiro lugar uma suspensão de protoplastas transformados que contêm cópias do gene heterólogo. É formado o tecido de calo e brotos podem ser induzidos a partir do calo e enraizados em seguida.

[084] Alternativamente, a formação de embriões pode ser induzida a partir da suspensão de protoplastas. Estes embriões germinam e formam plantas maduras. O meio de cultivo geralmente conterá vários aminoácidos e hormônios, tais como auxina e citoquininas. Brotos e raízes normalmente desenvolvem-se simultaneamente. A regeneração eficiente

dependerá do meio, do genótipo e do histórico do cultivo. A capacidade de reprodução e regeneração depende do controle dessas variáveis.

[085] Os exemplos a seguir são fornecidos para demonstrar e ilustrar adicionalmente certas realizações preferidas e aspectos da presente invenção e não devem ser interpretados como limitadores do seu escopo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

RESISTÊNCIA CONTRA HERBICIDAS EM GENÓTIPO DE SORGO SELVAGEM

[086] Sementes de 83 populações de sorgo selvagem da Bolívia foram plantadas em uma estufa para comparação com Tx2783, um genótipo de sorgo de elite susceptível a herbicida. Genótipos de sorgo selvagem foram plantados em placas contendo terra de vasos MetroMix 360 (Sun Gro) e cultivados em estufa. Tx2783 foi plantado com os acessos selvagens em cada placa para comparação. Em uma seleção utilizando cletodim, as plantas foram pulverizadas com 40 g de ingrediente ativo cletodim por acre⁻¹ em dezoito dias após o plantio. Tx2783 e muitos dos sorgos selvagens morreram, mas as entradas tolerantes a herbicida foram transplantadas para vasos para aumento das sementes. Em uma seleção utilizando fluoazifop-P, placas com Tx2783 e acessos selvagens foram pulverizadas com uma taxa de 54 g de ingrediente ativo fluazifop-P por acre⁻¹ em dezoito dias após o plantio e com 163 g de ingrediente ativo fluazifop-P por acre⁻¹ em 32 dias após o plantio. Tx2783 e muitos dos sorgos selvagens morreram, mas as entradas tolerantes a herbicida foram transplantadas para vasos para aumento das sementes. Em um terceiro experimento, plantas foram pulverizadas com uma taxa de 22 g de ingrediente ativo quizalofop por acre⁻¹ em dezoito dias após o plantio com 50 g de ingrediente ativo quizalofop por acre⁻¹ em 32 dias após o plantio. Tx2783 e muitos dos sorgos selvagens morreram, mas as entradas tolerantes a herbicida foram transplantadas para vasos para aumento das sementes. Um dos

genótipos de sorgo selvagem, Bol-71, expressou altos níveis de tolerância a cada um dos herbicidas.

EXEMPLO 2

CRUZAMENTOS DE GENÓTIPO DE SORGO SELVAGEM BOL-71 COM LINHAGENS DE SORGO DE ELITE E DETERMINAÇÃO DA HERANÇA

[087] Bol-71 foi cruzado com linhagens parentais de sorgo de elite que incluem Tx430, 00MN7645, BTx623 e ATx623. O conjunto de sementes foi excelente em todos os cruzamentos, o que indica que o genótipo selvagem foi sexualmente compatível com sorgo cultivado e pôde ser utilizado em um programa de cultivo de plantas para produzir variedades de sorgo tolerantes a herbicidas.

[088] O modo de herança de tolerância a herbicidas foi determinado por meio do plantio de sementes de Bol-71, geração F1 de cruzamento de ATx623 x Bol-71 e Pioneer 84G62 (controle susceptível a herbicidas) em placas contendo terra de vasos MetroMix 360 em uma estufa utilizando um projeto de bloco completo aleatório ($n = 3$). As plantas foram pulverizadas com 20 g de ingrediente ativo fluazifop-P por acre⁻¹ em quatorze dias após o plantio. Pioneer 84G62 morreu em doze a dezesseis dias após a pulverização. Os genótipos ATx623 x Bol-71 e Bol-71 não exibiram danos por herbicida, o que indica que o traço de tolerância a herbicidas foi transmitido para sorgo cultivado e que a tolerância a herbicidas foi ao menos parcialmente dominante em híbridos de F1.

EXEMPLO 3

SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA A ACC

[089] Foram iniciados esforços de sequenciamento genético para determinar se uma mutação genética poderia explicar o fenótipo de tolerância a herbicidas. DNA foi extraído de genótipos tolerantes a herbicidas Bol-71 e R91 e genótipos susceptíveis a herbicidas Bol-36, ATx623 e Tx430. A

reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando primers descritos por Delye e Michel (*Weed Research* 2005, 45: 323-330; integralmente incorporado ao presente como referência) foi utilizada para amplificar regiões do gene ACC associadas à expressão de tolerância a herbicidas. O sequenciamento de DNA (instalação de sequenciamento de DNA da Universidade Estadual do Kansas) de produtos de PCR resultantes de genótipos de sorgo susceptíveis e tolerantes a herbicidas revelou que os genótipos susceptíveis continham a sequência de tipo selvagem para o gene ACC relatada para sorgo (sequência de banco de dados Conjuntos de Transcritos Vegetais do Instituto de Pesquisa Genômica (TIGR) denominada TA3768_4558; integralmente incorporada ao presente como referência; vide também a Tabela 1 abaixo) e outras espécies de safras de cereal; os genótipos tolerantes a herbicidas continham, entretanto, uma mutação genética de TGG para TGC que resulta em uma conversão de aminoácido Trp₂₀₂₇Cys (SEQ ID Nº 1) na enzima (Fig. 1; vide Delye e Michel, *Weed Research* 2005 para numeração de aminoácidos). Esta mutação é similar à descrita na grama preta tolerante a herbicidas (*Alopecurus myosuroides* Huds.) de Delye *et al.* (*Plant Physiology* 2005). A grama preta é uma espécie de erva e o único lugar na natureza em que essa mutação foi relatada. A mutação não foi relatada em sorgo ou outra espécie de safra, nem descrita como alvo de desenvolvimento de safras tolerantes a herbicidas.

TABELA 1

SEQUÊNCIA DE ACC CARBOXILASE DE SORGO (SEQ ID Nº 1)

```
TGGCAGAGCAAANCTTGGAGGAATTCCTGTGGGTGTCATAGCTGTGGAGACACAGAC
CATGATGCAGCTTGTCCCTGCTGATCCAGGTCAGCTTGATTCCCATGAGCGATCCGT
TCCTCGGGCTGGACAAGTGTGGTTCCCAGATTCTGCAACCAAGACAGCTCAGGCATT
ATTAGACTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTGTTTATCCTGGCTAACTGGAGAGGTTT
```

CTCTGGTGGACAGAGAGATCTCTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGGTCAACAATTGT
CGAGAACCTTAGGACATATAATCAGCCTGCGTTTGTCTACATTCCCTATGGCTGGAGA
GCTTCGTGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTCGATAGCAAAATAAATCCAGACCGCATTGA
GTGTTATGCTGAGAGGACTGCCAAAGGTAATGTTCTCGAACCTCAAGGGTTAATTGA
AATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAAGACTGTATGGGTAGGCTTGACCCCGAGTT
GATAAATCTGAAAGCAAACTCCAAGATGTAAAGCATGGAAATGGAAGTCTACCAGA
CATAGAATCCCTTCAGAAGAGTATAGAAGCACGTACGAAACAGTTGCTGCCTTTATA
TACCCAGATTGCAATACGGTTTGCTGAATTGCATGATACTTCCCTAAGAATGGCAGC
TAAAGGCGTGATTAAGAAAGTTGTAGACTGGGAAGAATCACGCTCTTTCTTCTATAA
AAGGCTACGGAGAAGGATCTCTGAAGATGTTCTTGCAAAAGAAATAAGACATATAGT
CGGTGACAACTTCACTCACCAATCAGCAATGGAGCTCATCAAGGAATGGTACCTGGC
TTCTCCAGCCACAGCAGGAAGCACTGGATGGGATGACGATGATGCATTTGTTGCCTG
GAAGGACAGTCCTGAAAAC TACAATGGATATATCCAAGAGCTAAGGGCTCAAAAAGT
GTCTCAGTCGCTCTCTGATCTCACTGACTCCAGTTCAGATCTACAAGCATTCTCGCA
GGGTCTTTCTACGCTATTAGATAAGATGGATCCCTCTCAAAGAGCGAAGTTTGTTCA
GGAAGTCAAGAAGGTCCTTGGTTGATGATATGATACCAACACATCCAACACTATGTG
CATGCTACATGTTTTTGTTC AAGTACATACATAGAAGGATATTGCTTGGCCTCGTTT
GCTTGGCCGTTTGATCATGTCTGATCTAAGTCGACCATTATTTGTTGAAACTTCCTT
TTTGGACCTGGTGCTATGGTTGATGAATGTATATTGGACGTGTGCGACTGTGCGTTC

```
TGCCAGGTGTAAGCTCAAATGTTTAGACAGACCGAGTTATGGTTAGGAAGAGCACGA  
GTGAACATGTTCTGGTTTTGCAGTGGTTCAGGAAGGCAGAAAGTTGTTTCACTGTAG  
TTCTGAGATGTACTACCAGCGGCCCCCTGCTGTAATTTTAGGGTGTATAATGCGGAT  
ACTAGTAAAACAATTGAGTGGTTCATTAAATTTTGAAGTCGAATAATGTTTTTCTAG  
GCATATGTACCGTACCTCTACGTGAAATAAATGCTGTTGAAATAGCATTGACACCA  
GAATATATGTACCTTACCTAAGAGCTAAGTATTATAATACAACAAGTTGCTGGCCGT  
AAGATTTCTTT
```

[090] Todas as publicações e patentes mencionadas no presente pedido são incorporadas ao presente como referência. Diversas modificações e variações dos métodos descritos e composições de acordo com a presente invenção serão evidentes para os técnicos no assunto sem abandonar o escopo e o espírito da presente invenção. Embora a presente invenção tenha sido descrita com relação a realizações preferidas específicas, dever-se-á compreender que a invenção reivindicada no presente não deverá ser limitada indevidamente a essas realizações específicas. De fato, diversas modificações dos modos descritos de condução da presente invenção que são óbvios para os técnicos nos campos relevantes destinam-se a encontrar-se dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE CONTROLE DE ERVAS, nas proximidades de um híbrido de sorgo, caracterizado pelo fato de que o germoplasma do mencionado híbrido de sorgo confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase em níveis do mencionado um ou mais herbicidas que normalmente inibiriam o crescimento de um híbrido de sorgo, em que mencionado germoplasma do mencionado híbrido de sorgo que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase compreende:

(i) uma sequência compreendendo a SEQ ID NO:1 que adicionalmente compreende uma substituição de nucleotídeo de guanina substituída por citosina na posição 220; ou

(ii) mutações no gene da acetil-CoA carboxilase conforme encontrado no ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034;

em que o mencionado método compreende:

a) fornecimento dos mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase;

b) aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase a um campo que compreende o mencionado híbrido de sorgo; e

c) controle de ervas nas proximidades do mencionado híbrido de sorgo, de tal forma que o crescimento das ervas seja prejudicado pela aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas e o crescimento do mencionado híbrido de sorgo não seja prejudicado.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase são selecionados a partir de um grupo que consiste em ariloxifenoxipropionatos e ciclo-hexanodionas.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os mencionados herbicidas ariloxifenoxipropionatos são selecionados a partir do grupo que consiste em clodinafop-propargil, ci-halofopbutil, diclofopmetil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, haloxifopetoxietil, haloxifopetotil, haloxifop-R-metil, propaquizafop, quizalofop-P-etil, quizalo-P-tefuril, e suas combinações.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que sementes do híbrido de sorgo são revestidas com um herbicida acetil-CoA carboxilase.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mencionado híbrido de sorgo é criado por meio de incorporação de um gene heterólogo que compreende uma ou mais mutações para conferir resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase.

6. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA LINHAGEM VEGETAL HÍBRIDA DE SORGO, resistente a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase, caracterizado pelo fato de que o germoplasma do mencionado híbrido de sorgo confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase em níveis do mencionado um ou mais herbicidas que normalmente inibiriam o crescimento de um híbrido de sorgo, em que mencionado germoplasma do mencionado híbrido de sorgo que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase compreende:

(i) uma sequência compreendendo a SEQ ID NO:1 que adicionalmente compreende uma substituição de nucleotídeo de guanina substituída por citosina na posição 220; ou

(ii) mutações no gene da acetil-CoA carboxilase conforme encontrado no ATCC N° PTA-8033 ou ATCC N° PYA-8034;

em que o mencionado método compreende:

a) identificação de um germoplasma que confere a mencionada resistência a herbicidas, em que o mencionado germoplasma resistente a herbicidas é derivado de um híbrido de sorgo resistente a herbicidas; e

b) introdução do mencionado germoplasma em uma linhagem vegetal de sorgo de elite por meio de introdução de um gene heterólogo.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que os mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase são selecionados a partir de um grupo que consiste em ariloxifenoxipropionatos e ciclo-hexanodionas.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que os mencionados herbicidas ariloxifenoxipropionatos são selecionados a partir do grupo que consiste em clodinafop-propargil, ci-halofopbutil, diclofopmetil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, haloxifopetoxietil, haloxifopetotil, haloxifop-R-metil, propaquizafop, quizalofop-P-etil, quizalo-P-tefuril, e suas combinações.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que sementes do híbrido de sorgo são revestidas com um herbicida acetil-CoA carboxilase.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o mencionado germoplasma resistente a herbicida compreende resistência a um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase e resistência a um ou mais compostos de um ou mais grupos de herbicidas que não sejam herbicidas de acetil-CoA carboxilase.

11. MÉTODO DE CONTROLE DE ERVAS, nas proximidades de um híbrido de sorgo, caracterizado pelo fato de que o germoplasma do mencionado híbrido de sorgo confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase em níveis do mencionado um ou mais

herbicidas que normalmente inibiriam o crescimento de um híbrido de sorgo, em que mencionado germoplasma do mencionado híbrido de sorgo que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase compreende uma sequência compreendendo a SEQ ID NO:1 que adicionalmente compreende uma substituição de nucleotídeo de guanina substituída por citosina na posição 220;

em que o mencionado método compreende:

- a) crescimento do dito híbrido de sorgo a partir de uma semente, em que a mencionada semente é designada ATCC N^o PYA-8034;
- b) aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase a um campo que compreende o mencionado híbrido de sorgo; e
- c) controle de ervas nas proximidades do mencionado híbrido de sorgo, de tal forma que o crescimento das ervas seja prejudicado pela aplicação dos mencionados um ou mais herbicidas e o crescimento do mencionado híbrido de sorgo não seja prejudicado.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os mencionados um ou mais herbicidas de acetil-CoA carboxilase são selecionados a partir de um grupo que consiste em ariloxifenoxipropionatos e ciclo-hexanodionas.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os mencionados herbicidas ariloxifenoxipropionatos são selecionados a partir do grupo que consiste em clodinafop-propargil, ci-halofofbutil, diclofopmetil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, haloxifopetoxietil, haloxifopetotil, haloxifop-R-metil, propaquizafop, quizalofop-P-etil, quizalo-P-tefuril, e suas combinações.

Bol- 71: Tolerância a herbicida ACC
 R91: Tolerância a herbicida ACC
 Bol-36: Susceptível a herbicida ACC
 ATx623: Susceptível a herbicida ACC

Tx430: Susceptível a herbicida ACC
 Bol-36: Susceptível a herbicida ACC
 R91: Tolerância a herbicida ACC
 Bol-71: Tolerância a herbicida ACC
 R91: Tolerância a herbicida ACC
 ATx623: Susceptível a herbicida ACC

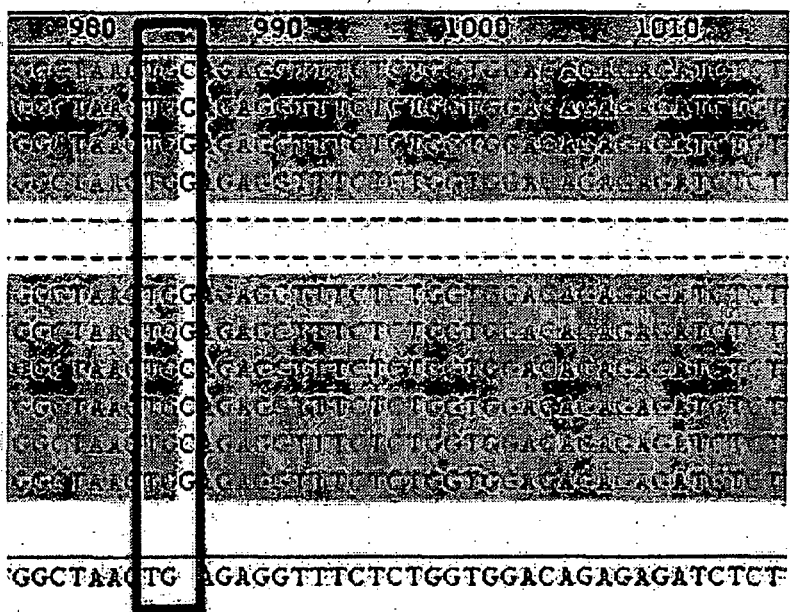


Fig.1