

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 414 438**

(51) Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2001 E 01911094 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1261252**

(54) Título: **Plantas de girasol tolerantes a las sulfonilureas**

(30) Prioridad:

**09.03.2000 US 188089 P
03.10.2000 US 237597 P
04.01.2001 US 259772 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2013

(73) Titular/es:

**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DELAWARE 19898, US**

(72) Inventor/es:

**GABARD, JEROME, M. y
HUBY, JEAN, PIERRE**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 414 438 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas de girasol tolerantes a las sulfonilureas

Campo de la invención

La presente invención se refiere plantas de girasol y, más en concreto, a semillas de girasol que han desarrollado resistencia a herbicidas de sulfonilurea a través de mutagénesis.

Antecedentes de la invención

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) es una especie diploide ($2n = 34$) cultivada en muchas regiones templadas, semisecas del mundo como fuente de aceite y de semillas para repostería. Los tipos de girasoles para aceite contienen del 40% al 48% de aceite en la semilla. El aceite de girasol es apreciado como aceite comestible, debido a su alto nivel de grasas insaturadas y color claro. El aceite de girasol se utiliza en ensaladas, como aceite para cocinar o para margarina. El contenido en proteínas de la harina de girasol preparada a partir de las semillas después de la extracción del aceite es útil como pienso para ganado. Las semillas de las variedades para aceite y para repostería del girasol cultivado son útiles como alimento para aves.

Sólo se han descubrieron y desarrollado relativamente pocos herbicidas para el control selectivo de hierbas adventicias en el girasol cultivado. Estos herbicidas incluyen alaclor, S-etildipropilcarbamotioato (EPTC), etalfluralina, trifluralina, pendimetalina, clorambeno, imazametabenz-metilo, setoxidimo y sulfentrazona. Son necesarios otros tratamientos para el control de las hierbas adventicias para proporcionar un mayor espectro de control de hierbas adventicias y para reducir el desarrollo de la resistencia a herbicidas de las hierbas adventicias.

Entre las hierbas adventicias que no están suficientemente controladas por los herbicidas que se emplean en la actualidad en el girasol cultivados se encuentran miembros de la familia Orobanchaceae. Estas hierbas adventicias son holoparásitos obligados de la raíz de una serie de plantas de hoja ancha, incluyendo el girasol. En particular, las especies de *Orobanche* que afectan al girasol incluyen *Orobanche aegyptiaca* Pers., *O. ramosa* L., *O. minor* Sm., *O. cumana* Wallr., y *O. cernua* Loefl. *O. cumana* Wallr. y *O. cernua* Loefl. (nombres alternativos para la misma especie) son una plaga grave para el girasol en el este de Europa y se han ido extendiendo a través del sur de Europa.

Orobanche es un riesgo a nivel mundial, y algunas especies, tales como *O. minor*, han aparecido como especies exóticas en EEUU. Las especies de *Orobanche* son muy difíciles de eliminar porque, excepto sus partes florales, viven dentro de la tierra y sus semillas son diminutas, se producen prolíficamente, se dispersan con facilidad y tienen una vida larga. Así, los herbicidas que se emplean en la actualidad en el girasol en general proporcionan un control inadecuado.

Desde el descubrimiento de los herbicidas de sulfonilurea hace más de veinte años, se han desarrollado para el mercado más de dos docenas de sulfonilureas para el control selectivo de hierbas adventicias en una amplia diversidad de cultivos (*The Pesticide Manual*, 11^a edición, C.D.S. Tomlin, ed., British Crop Protection Council, Surrey, Reino Unido, 1997). Los herbicidas de sulfonilurea tienen, como característica estructural molecular fundamental, un resto sulfonilurea (-S(O)₂NHC(O)NH(R)-). El extremo sulfonilo del resto está conectado directamente o a través de un átomo de oxígeno o un grupo amino o metileno opcionalmente sustituido, con un grupo cíclico o acíclico. En el extremo opuesto del puente de sulfonilurea, el grupo amino, que puede tener un sustituyente, tal como metilo (R es CH₃), en lugar de hidrógeno, está conectado a un grupo heterocíclico, generalmente un anillo de pirimidina o triazina simétrico, que tiene uno o dos sustituyentes, tales como metilo, etilo, metoxi, etoxi, metilamino, dimetilamino, etilamino y los halógenos. Puesto que el modo de acción de los herbicidas de sulfonilurea es la inhibición de la enzima acetolactato sintasa (ALS) que se encuentra en las plantas pero no en los animales, los herbicidas de sulfonilurea proporcionan una combinación valiosa de excelente eficacia contra hierbas adventicias y una toxicidad muy baja para animales.

Aunque las sulfonilureas se han desarrollado para el control selectivo de hierbas adventicias en una diversidad de cultivos, las variedades normales de girasoles cultivados son, en general, demasiado poco tolerantes para que las sulfonilureas sean útiles para el control selectivo de hierbas adventicias en cultivos de girasol. Sin embargo, se ha informado de que la aplicación antes de la emergencia de una dosis baja (de 2 a 6 g/ha) de clorsulfurona produce un control del 75-85% de *O. cernua* con tolerancia del girasol (L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1994, 34, 395-402). Aunque los herbicidas de sulfonilurea así han demostrado tener efecto sobre especies de *Orobanche*, la sensibilidad de las variedades normales de girasol a las sulfonilureas evita el uso de mayores tasas de aplicación para conseguir un mejor control de *Orobanche*.

Al-Khatib Kassim et al. (*Weed Science*, vol. 46, nº 4, julio de 1998 (1998-07), pp. 403-407) se refiere a la resistencia a imazetapiro en el girasol común (*Helianthus annuus*).

Anderson M.D. et al. (*Weed Science*, vol. 32, nº 3, 1984, pp. 310-314) se refiere al control de hierbas adventicias en el girasol (*Helianthus annuus*) con desmedifamo y fenmedifamo.

Podrían utilizarse mayores tasas de aplicación de herbicidas de sulfonilurea para controlar *Orobanche*, así como otras especies de hierbas adventicias, si se desarrollasen variedades de girasol más resistentes a las sulfonilureas.

Para poder ser incorporado con facilidad en programas de reproducción que combinan rasgos deseables, el rasgo para la tolerancia a las sulfonilureas debería ser altamente heredable (es decir, dominante o semidominante). Se ha utilizado la mutagénesis inducida para producir resistencia a sulfonilureas en la soja, tal como se analiza en la patente de EEUU 5.084.082, pero esta estrategia no se ha indicado para el girasol, que tiene una morfología de la semilla diferente comparada con la soja. Además, debido a que 99% de las mutaciones inducidas son recesivas (W. Gottschalk y G. Wolff, *Induced Mutations in Plant Breeding*, Springer-Verlag, Nueva York, 1983, en particular p. 12), las mutaciones dominantes son extremadamente raras. Para encontrar mutaciones de resistencia a herbicidas dominantes se requiere generalmente la selección de muchos miles de semillas mutagenizadas.

Por consiguiente, es necesario poder controlar a *Orobanche* y otras hierbas adventicias de modo selectivo utilizando herbicidas de sulfonilurea. Los solicitantes han realizado un programa de investigación exhaustivo para encontrar rasgos dominantes o semidominantes que proporcionen resistencia a sulfonilureas en el girasol cultivado.

Sumario de la invención

Esta solicitud describe un método para producir una línea de girasol que contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, en el que dicho método comprende: (a) tratar semillas de girasol con un agente mutagénico; (b) cultivar las semillas tratadas para producir plantas maduras para obtener semillas de segunda generación; (c) recolectar las semillas de segunda generación; (d) germinar las semillas de segunda generación en presencia de una cantidad selectivamente eficaz de un herbicida de sulfonilurea para seleccionar para la supervivencia sólo las semillas germinadas que contienen un rasgo que confiere tolerancia al herbicida de sulfonilurea; y (e) cultivar una semilla germinada superviviente para producir una planta madura para obtener, a través de autopolinización, semillas de la línea de girasol que contienen el rasgo heredable.

Esta invención se refiere a una semilla de girasol que contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, tal como se reivindica en la presente. El rasgo puede obtenerse a través de mutagénesis. Otra realización de esta invención es una planta de girasol tolerante a sulfonilureas, una de sus partes, tales como el polen o un óvulo, o un cultivo de tejido de células regenerables de esta, tal como se reivindica en la presente, cultivada a partir de la semilla tolerante a sulfonilureas mencionada anteriormente. La semilla y las plantas mencionadas anteriormente pueden contener también otros rasgos deseables, tales como resistencia al parasitismo de *Orobanche*.

También se describe un método para producir una semilla de girasol endogámica que tiene tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, que comprende cruzar un primer girasol progenitor con una segunda planta de girasol progenitora, y recolectar la semilla endogámica resultante, en el que la primera y la segunda planta de girasol progenitora tiene un rasgo altamente heredable que confiere tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea, en el que el rasgo se obtiene a través de mutagénesis. También se describe una semilla de girasol endogámica producida mediante este método, y una planta de girasol endogámica, o una de sus partes, tales como una semilla, producida mediante el cultivo de la semilla endogámica. También se describe un método para producir una semilla de girasol híbrida que tiene tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea, que comprende curzar un primer girasol progenitor con una segunda planta de girasol progenitora y recolectar la semilla de girasol híbrida resultante, en el que la primera o la segunda planta de girasol progenitora tiene un rasgo altamente heredable que confiere tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea, en el que el rasgo se obtiene a través de mutagénesis. También se describe una semilla de girasol híbrida producida mediante este método, y una planta de girasol híbrida, o una de sus partes, tales como una semilla, producida mediante el cultivo de la semilla híbrida.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para controlar la vegetación no deseada en un cultivo de las plantas de girasol tolerantes a sulfonilureas reivindicadas, comprendiendo dicho método aplicar al sitio de la vegetación una cantidad eficaz de un herbicida de sulfonilurea. Las realizaciones de este aspecto de la invención incluyen un método para controlar especies de *Orobanche* parásitas del girasol.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos para controlar plantas de girasol espontáneas de la invención en un cultivo de cereal mediante la aplicación de una cantidad eficaz de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), y en un cultivo de remolacha azucarera mediante la aplicación de una cantidad eficaz de una mezcla de triflusulfurona-metilo y fenmedifamo al sitio de la vegetación.

Descripción detallada de la invención

En la descripción y los ejemplos que aparecen a continuación, se emplea una serie de términos y expresiones. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a dichos términos y expresiones, se proporcionan las siguientes definiciones:

“Planta”: incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales a partir de los cuales pueden regenerarse plantas de girasol, callos vegetales, matas vegetales, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, anteras, pétalos u otras partes florales y seminales, hojas, tallos y raíces, incluyendo los ápices radiculares, y similares.

“Variedad o cultivar”: se refiere a un grupo de plantas dentro de la especie (por ejemplo, *Helianthus annuus*) que

comparten ciertas características constantes que las diferencian de la forma típica y de otras posibles variedades dentro de esa especie. Aunque posee al menos un rasgo distintivo, una “variedad” también puede caracterizarse por una cantidad sustancial de variación global entre individuos dentro de la variedad, basada principalmente en la segregación mendeliana de rasgos entre la progenie de sucesivas generaciones.

- 5 “Línea”: significa un grupo de plantas que muestran menos variación entre individuos, en general como resultado de varias generaciones de autopolinización. Además, una línea puede incluir un grupo de plantas que se propagan de modo vegetativo a partir de una única planta progenitora, utilizando técnicas de cultivo de tejido o de células.
- “Semilla de girasol”: denominada, desde el punto de vista botánico, un “aqueno”; significa los componentes combinados del pericarpo y embrión.
- 10 “Línea mantenedora”: se refiere a una línea endogámica masculina fértil isogénica homóloga a la línea CMS. Una línea mantenedora tiene un citoplasma normal, que permite el cruzamiento con la línea CMS para obtener una progenie CMS.
- 15 “Planta estéril masculina citoplásrica (CMS) o línea endogámica”: significa una línea de girasol que no produce polen viable, es decir, una planta estéril masculina. La esterilidad masculina se hereda por vía materna, es decir, se emplea la planta estéril masculina como progenitor femenino en un cruzamiento con polen de otro girasol. Las líneas CMS se producen cruzando una línea endogámica progenitora recurrente (como masculino) con una línea no recurrente que tiene un rasgo de esterilidad masculina citoplásrica, y después retrocruzando a la línea recurrente hasta que se desarrolla una línea estéril masculina que es homóloga a la línea recurrente en todos los aspectos. Entonces la línea recurrente se considera la mantenedora. Las líneas CMS también se denominan líneas femeninas.
- 20 “Línea restauradora”: se refiere a una línea que posee el gen o los genes para restablecer la fertilidad masculina o polen viable al híbrido de girasol o línea endogámica y la progenie que tiene un citoplasma materno que provoca esterilidad masculina. Esta expresión, junto con una descripción de la esterilidad masculina citoplásrica, se analiza en Fick, “Breeding and Genetics”, en *Sunflower Science and Technology*, J.F. Carter, ed., 1978, pp. 279-338.
- 25 La presente invención se refiere a líneas de girasol que tienen rasgos de tolerancia a herbicidas de sulfonilurea altamente heredables raros obtenidas mediante mutagénesis inducida de modo químico o físico y selección artificial. Estas líneas son útiles para desarrollar variedades comerciales de cultivos de girasol que tienen resistencia a sulfonilureas, y así permiten el uso de estos herbicidas eficaces y benignos para el medioambiente para controlar de modo selectivo la vegetación no deseada. La vegetación no deseada que puede controlarse con herbicidas de sulfonilurea en variedades de girasol resistentes incluye hierbas adventicias parasitarias problemáticas, tales como especies de *Orobanche*.
- 30 La mutagénesis del girasol puede inducirse mediante un tratamiento con una diversidad de agentes mutagénicos conocidos en la técnica, que incluyen mutágenos físicos, tales como rayos X, rayos gamma, neutrones rápidos o térmicos, protones, y mutágenos químicos, tales como metansulfonato de etilo (EMS), sulfato de dietilo (DES), etilenimina (EI), propansultonato, *N*-metil-*N*-nitrosouretano (MNU), *N*-nitroso-*N*-metilurea (NMU), *N*-etil-*N*-nitrosourea (ENU), y azida de sodio.
- 35 Después, los mutantes de girasol resistentes a herbicidas de sulfonilurea se seleccionan mediante un tratamiento con una cantidad selectivamente eficaz de uno o más herbicidas de sulfonilurea. Pueden utilizarse muchos herbicidas de sulfonilurea en los tratamientos de selección, incluyendo herbicidas de sulfonilurea utilizados en el mercado, tales como amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfurona-metilo, clorimurona-etilo, clorsulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfurona-metilo, etoxisulfurona, flupirsulfurona-metilo, flazasulfurona, foramsulfurona, halosulfurona-metilo, imazosulfurona, yodosulfurona-metilo, mesosulfurona, metsulfurona-metilo, nicosulfurona, oxasulfurona, primisulfurona-metilo, prosulfurona, pirazosulfurona-etilo, rimsulfurona, sulfometuronametilo, tifensulfurona-metilo, triasulfurona, tribenuronametilo, trifloxisulfurona y triflusulfurona-metilo. Una cantidad selectivamente eficaz es la cantidad de herbicida de sulfonilurea que evita el crecimiento de plantas de girasol que carecen de una mutación dominante o semidominante que confiere resistencia a herbicidas de sulfonilurea. Una cantidad selectivamente eficaz dependerá del herbicida de sulfonilurea utilizado como agente de selección y puede ser determinada con facilidad mediante ensayos utilizando una gradación de concentraciones de herbicida de sulfonilurea. La elección del herbicida de selección influirá en el espectro de resistencia a herbicidas de sulfonilurea de los mutantes seleccionados, aunque es típica la resistencia cruzada y algunos mutantes seleccionados pueden ser más tolerantes a otros herbicidas de sulfonilurea que el herbicida de sulfonilurea utilizado como agente de selección. Para una selección eficaz, son deseables sulfonilureas con una fuerte actividad contra variedades de girasol habituales. La tifensulfurona-metilo y la metsulfurona-metilo actúan bien para seleccionar mutantes de girasol resistentes a sulfonilureas.
- 40 Encontrar mutaciones de resistencia a herbicidas dominantes generalmente requiere la selección de muchas decenas a cientos de miles de semillas mutagenizadas. Aunque esta selección puede realizarse utilizando una diversidad de equipos y procedimientos conocidos en la técnica el “sistema de selección hidropónica a gran escala” descrito en la patente de EEUU 5.084.082 es particularmente útil para recuperar mutantes de girasol resistentes a herbicidas de sulfonilurea.
- 45
- 50
- 55

Muchos de los siguientes ejemplos y ensayos se refieren a las líneas endogámicas de girasol "HA89A" y "HA89B", que comprenden colectivamente "HA89", identificada de modo alternativo como "H89" ("HA89A" se identifica de modo alternativo como "H89A", y "HA89B" se identifica de modo alternativo como "H89B"). "HA89" se creó en el U.S. Department of Agriculture's North Dakota Agricultural Experiment Station en Fargo, y se puso a disposición pública en octubre de 1971. "HA89A" consiste en la línea endogámica estéril masculina citoplásrica de "HA89"; "HA89B" es la línea endogámica mantenedora de "HA89A". "HA89A" (también denominada "CMS H89A", "CMS HA89A" y "CMS HA89") es una línea estéril masculina citoplásrica basada en el material de P. Leclercq, "Une Stérilité Mâle Cytoplasmique Chez le Tournesol", *Ann. Amélior. Plantes*, 1969, 19(2), 99-106. Para reproducir a "HA89A" se requiere la mantenedora "HA89B".

10 El siguiente ejemplo 1 ilustra la formación de líneas de girasol resistentes a las sulfonilureas a través del proceso de mutagénesis inducida y selección artificial. En este ejemplo, la línea de girasol progenitora utilizada fue "HA89B".

Ejemplo 1: Preparación de líneas de girasol resistentes a herbicidas de sulfonilurea

Parte A - Determinación de la concentración óptima de mutágeno

15 Se construyó un experimento de pequeño tamaño para definir la concentración de metansulfonato de etilo (EMS) requerida para inducir un número significativo de mutaciones en plantas de girasol, sin reducir significativamente la fertilidad de las plantas. Se incubaron lotes que contenían cada uno 6000 semillas de "HA89B" en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 5,6), suplementado con concentraciones de EMS entre 0 y 80 mM durante 18 horas a temperatura ambiente, lo cual provoca que las semillas se hinchen. Las semillas se enjuagaron en tiosulfato de sodio durante 1 minuto para descomponer el EMS, después en 5 lavados con agua consecutivos para eliminar las trazas de EMS.

20 20 El procedimiento de enjuagado global duró 5 horas. Las semillas se secaron durante 2 horas a 25 °C utilizando un secador de flujo de aire y después se dividieron en sublotes de 200 semillas cada uno. Para determinar el efecto del EMS sobre la germinación y la ramificación de la planta, los sublotes se sembraron en terreno llano justo después de secarse y tras 2, 4 y 6 días de conservación a 4 °C después del secado. Se utilizó la ramificación de la planta como medición visual de las frecuencias de mutación. Los sublotes de cada concentración de EMS también se sembraron en macetas justo después de secarse y se cultivaron hasta la madurez para determinar el efecto de los tratamientos con EMS sobre la formación de las semillas.

25 25

30 Basándose en estos ensayos, se descubrió que unas concentraciones de EMS que varían de 20 a 40 mM proporcionaban unos resultados óptimos con las semillas de "HA89B". La eficacia de germinación de las semillas tratadas con estas concentraciones de EMS sigue siendo mayor que 75% de la de las semillas sin tratar. Estas concentraciones parecen proporcionar unas frecuencias de mutación significativas, puesto que más de la mitad de las plantas estaban ramificadas, comparado con aproximadamente 12% de plantas procedentes de las semillas sin tratar. Además, más de la mitad de las plantas produjeron semillas viables.

Parte B - Mutagénesis del girasol a gran escala y selección

35 Se incubaron lotes que contenían 45.000 semillas cada uno de la línea de girasol "HA89B" en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 5,6) suplementado con EMS 20, 25, 30 o 35 mM durante 18 horas a temperatura ambiente con agitación continua, lo cual hace que las semillas se hinchen. Tal como se indica en la presente a continuación, la primera generación de semillas mutadas se identifica como "M₁". Las semillas se enjuagaron en tiosulfato de sodio durante 1 minuto para descomponer el EMS, después en 5 lavados con agua consecutivos para eliminar las trazas de EMS. El procedimiento de enjuagado global duró 5 horas. Las semillas se secaron durante 2 horas a 25 °C utilizando un secador de flujo de aire. Las semillas, incluyendo las semillas con un ápice radical emergente, se plantaron aproximadamente 48 horas después de empezar la mutagénesis de las semillas en cuatro parcelas separadas utilizando un plantador de semillas neumático para evitar dañar a las semillas hinchadas y germinadas. Las parcelas estaban a varios kilómetros de distancia de otros campos de girasol para evitar la polinización cruzada con híbridos cultivados o líneas endogámicas. Germinaron aproximadamente 120.000 plántulas de las 180.000 semillas plantadas y aproximadamente 100.000 plantas crecieron hasta la madurez. Se recolectaron las cabezas de los girasoles de cada parcela individual en la madurez, se juntaron y se mezclaron a fondo. La semilla de la progenie se identifica en lo sucesivo como "M₂", indicándose los cuatro lotes como "M₂-1", "M₂-2", "M₂-3" y "M₂-4", que corresponden a sus progenitores "M₁" tratados con EMS 35, 30, 25 y 20 mM, respectivamente. El rendimiento de las semillas M₂ recolectadas a partir de cada subparcela M₁ se resume en la tabla 1.

40 40

45 45

50

Tabla 1. Rendimientos de semillas M₂

Lote de M ₂	Concentración de EMS de tratamiento	Rendimiento (nº de semillas)
M ₂ -1	35 mM	182.600
M ₂ -2	30 mM	482.400
M ₂ -3	25 mM	184.000*
M ₂ -4	20 mM	4.017.100

* El rendimiento se redujo debido a daños graves por aves.

Las semillas "M₂" se sembraron en lechos hidropónicos individuales descritos como "sistema de selección hidropónica a gran escala" en la patente de EEUU 5.084.082 y se trataron con herbicidas de sulfonilurea. Para cada tratamiento, se añadieron 10.000 semillas por lecho. Se descubrió que la triflusulfurona-metilo era demasiado poco activa en el girasol como para ser un agente de selección eficaz. La mayoría de los tratamientos utilizan tifensulfurona-metilo a 20, 40 o 50 µg/l o rimsulfurona a 40 o 80 µg/l. Se descubrieron cinco plantas que mostraban resistencia a herbicidas de sulfonilurea durante diversos experimentos de selección; estas se identifican en la tabla 2.

Tabla 2: Nombre, origen, herbicida de selección y frecuencia de plantas tolerantes a sulfonilureas confirmadas

Nombre	Procedente del lote de semillas	Selección con	Frecuencia de selección*
M7	M ₂ -2	tifensulfurona-metilo	4,2 x 10 ⁻⁶
M11	M ₂ -1	tifensulfurona-metilo	5,5 x 10 ⁻⁶
M12	M ₂ -2	tifensulfurona-metilo	4,2 x 10 ⁻⁶
M14	M ₂ -2	tifensulfurona-metilo	de 2,1 a 4,2 x 10 ⁻⁶
E24	M ₂ -1	rimsulfurona	5,5 x 10 ⁻⁶

* La frecuencia de selección se calcula como la proporción de plantas mutantes supervivientes comparado con el número total de semillas plantadas y tratadas con el agente de selección de sulfonilurea. Se supone que M7 y M12 tienen el mismo origen de mutación. Se cree que M11 y E24 son mutantes diferentes. La relación relevante de la mutación de M14 es desconocida, puesto que no se caracterizó más a fondo.

"M11" y "E24" se seleccionaron a partir del mismo lote de semillas mutagenizadas de M₁, pero con diferentes herbicidas de sulfonilurea. Como después se descubrió que "M11" no era tolerante a la rimsulfurona, es probable que "M11" y "E24" surgieran de diferentes acontecimientos de mutagénesis. "E24" era estéril y no se desarrolló más. "M14" también era estéril. De las cinco plantas rescatadas, sólo "M7", "M11" y "M12" eran fértiles y pudieron desarrollarse mediante cruzamiento. "M7" y "M12" pueden haber surgido del mismo acontecimiento de mutación.

Parte C - Ensayo de resistencia de la acetolactato sintasa a la inhibición por herbicidas de sulfonilurea

Se estudió la resistencia de la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS) a la inhibición por herbicidas de sulfonilurea para ambas líneas mutantes seleccionadas mediante selección artificial utilizando herbicidas de sulfonilurea y su progenitor susceptible a sulfonilureas ("H98B"). Se recogieron fragmentos de tejido foliar de las plantas de girasol después de cultivarlas en tierra de horticultura sin herbicida. Los tejidos foliares después se trituraron en nitrógeno líquido y se suspendieron en tampón de extracción (fosfato de potasio 100 mM, piruvato de sodio 1 mM; cloruro de magnesio 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol al 10% (en v/v), FAD 0,1 mM, cisteína 10 mM, leucina 1 mM, valina 1 mM, pH 7,5). El sobrenadante se recogió después de la centrifugación (15 min a 4 °C) de los residuos de tejido y después se trató con un volumen igual de disolución de sulfato de amonio acuosa saturada durante 1 hora. Las proteínas precipitadas se recogieron después de una centrifugación y se resuspendieron en tampón (fosfato de potasio 50 mM, piruvato de sodio 100 mM, cloruro de magnesio 10 mM, pH 7,25), y después se desalaron mediante una elución con el tampón de resuspensión a través de una columna Sephadex® (Pharmacia). Los extractos desalados se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 100 o 1000 ppb de tifensulfurona-metilo o rimsulfurona (se eligieron estos dos herbicidas por su uso como agentes de selección artificial en los experimentos hidropónicos). Entonces se ensayó la actividad ALS remanente.

Los ensayos se iniciaron añadiendo una disolución de la enzima (20 µl, incluido en el volumen de la mezcla de reacción final) y se terminaron mediante la adición de ácido sulfúrico acuoso (al 2,55% en v/v, 50 µl). Las mezclas de reacción acidificadas después se calentaron durante 15 minutos a 60 °C. Se añadió creatina (al 1,445% en p/v, 30 µl), seguido de α-naftol (al 6,516% en p/v, 90 µl), recién preparado en hidróxido de sodio acuoso (5 N) y se mantuvo en la oscuridad. Las disoluciones de nuevo se calentaron durante 15 minutos a 60 °C. Se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm a los 30 minutos después de terminar el ensayo. Las absorbancias se ajustaron restando la A⁵⁴⁰ media de controles a tiempo cero (que contienen acetonitrilo acuoso al 25% en lugar de disolución del compuesto) que se habían añadido antes que la enzima. Se calculó la actividad enzimática con relación a los controles de color total que contenían acetonitrilo acuoso al 25% en lugar de disolución del compuesto de ensayo.

Cada medición de la actividad ALS se reprodujo seis veces, y se promediaron las actividades medidas. Los resultados listados en la tabla 3 se expresan como porcentaje de actividad enzimática ALS remanente comparado con un control sin herbicida.

Tabla 3: Actividad ALS remanente después del tratamiento con sulfonilureas

Herbicida utilizado para el ensayo de ALS	Planta de origen	Actividad ALS con herb. 100 ppb	Actividad ALS con herb. 1000 ppb
Tifensulfurona-metilo	H89B	16%	4%
	M ₂ M7	50%	26%
	M ₂ M11	30%	16%
	M ₂ M12	50%	17%
	M ₂ M14	32%	17%
Rimsulfurona	H89B	8%	4%
	M ₂ E24	35%	25%

Los resultados del ensayo demuestran que las enzimas ALS de las líneas mutantes seleccionadas con tifensulfurona-metilo conservaban 2-6 veces más actividad que ALS de tipo salvaje de "H89B" en presencia de tifensulfurona-metilo. La enzima ALS de la línea mutante seleccionada con rimsulfurona conserva 4-6 veces más actividad que ALS de tipo salvaje de "H89B" en presencia de rimsulfurona. Por tanto, este ensayo confirma que las mutaciones que hacen que la enzima ALS sea resistente a la inhibición por sulfonilurea provocan resistencia de las líneas mutantes a herbicidas de sulfonilurea.

Utilidad

Las líneas de girasol resistentes a sulfonilureas obtenidas a través de mutagénesis inducida y selección artificial son útiles como fuente de resistencia a herbicidas en programas de cruzamiento de girasoles. Se producen líneas endogámicas autofertilizando plantas seleccionadas durante varias generaciones para producir líneas endogámicas que se reproducen de manera replicable y previsible y son muy uniformes. Las líneas tolerantes a sulfonilureas, tales como "M7", "M11" y "M12", derivadas de líneas mantenadoras aceptadas tales como "H89B", son particularmente útiles, porque facilitan la transferencia de resistencia dominante (altamente heredable) monogénica de una manera rápida y eficaz por medios convencionales sin sacrificar rasgos agronómicos y sin necesidad de un retrocruzamiento de gran alcance.

Por ejemplo, las líneas mantenadoras tolerantes a sulfonilureas pueden cruzarse con líneas que son estériles masculinas, que en la reproducción de girasoles se logran del modo más habitual a través de esterilidad masculina citoplásrica, para producir una progenie estéril masculina que tiene el rasgo de tolerancia a sulfonilureas. El rasgo de esterilidad masculina citoplásrica (CMS) se obtiene cruzando *Helianthus annuus* L. domesticado (como masculino) con *H. petiolaris* Nutt. (P. Leclercq, "Une Stérilité Mâle Cytoplasmique Chez le Tournesol", *Ann. Amélior. Plantes*, **1969**, 19(2), 99-106), o *H. maximiliani* Schrad. o *H. giganteus* L. (E.D.P. Whelan y W. Dedio, "Registration of Sunflower Germplasm Composite Crosses CMG-1, CMG-2, and CMB-3", *Crop Science*, **1980**, 20, 832), y después realizaron un retrocruzamiento repetido con *H. annuus* domesticado (como masculino). CMS es el resultado de factores que surgen del genoma citoplásrico, en oposición al nuclear. En la técnica está disponible una diversidad de métodos para conferir esterilidad masculina genética; véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 3.710.511, 3.861.709, 4.654.465, 4.727.219 y 5.432.068, y la publicación de patente europea 329.308-A y publicación PCT WO 90/08828.

La tolerancia a herbicidas de sulfonilurea altamente heredable puede utilizarse para producir cantidades experimentales o comerciales de semillas híbridas F₁. En estas aplicaciones, una línea resistente a herbicidas (que se convierte en estéril masculina por medios genéticos, químicos o manuales) se planta (como intercultivo o en filas separadas) en la misma parcela con una línea restauradora masculina pero sensible a herbicidas. Después de la polinización, el progenitor masculino se elimina de la parcela con un tratamiento con un herbicida de sulfonilurea que es selectivamente letal para el progenitor restaurador. La parcela entera (que contiene semillas F₁ nacidas de la línea femenina resistente a sulfonilureas) entonces puede recolectarse de una vez sin contaminación de semillas de la línea restauradora.

La hibridación permite combinar o "apilar" un rasgo altamente heredable para la tolerancia a sulfonilureas con otros rasgos deseables, por ejemplo, mayor rapidez de maduración, tolerancia a sequías, tolerancia al frío, mayor rendimiento de semillas, mayor contenido en aceite en las semillas, modificación de la composición de los constituyentes de ácidos grasos en el aceite, mayor contenido en proteínas de almacenamiento de las semillas, modificación en el contenido en aminoácidos en las proteínas de almacenamiento de las semillas, enanismo, resistencia al encorvamiento, resistencia a insectos y a enfermedades provocadas por bacterias, hongos y virus, y resistencia a plantas parasitarias, tales como *Orobanche*. Los rasgos de resistencia a enfermedades deseables que pueden combinarse con un rasgo de tolerancia a sulfonilureas incluyen la resistencia a la roya (provocada por *Puccinia helianthi*), el mildiú (provocado por *Plasmopara halstedii*), la pudrición carbonosa (provocada por *Macrophomnia phaseolina*), la mancha negra del tallo (provocada por *Phoma macdonaldii*), la podredumbre blanca (provocada por *Sclerotinia sclerotiorum*), y el cáncer del tallo (provocado por *Phomopsis helianthi*). Las patentes de EEUU 5.276.264 y 5.461.171 describen plantas de girasol que tienen rasgos para unos menores niveles de ácidos

grasos saturados en el aceite de la semilla. Las patentes de EEUU 4.627.192, 4.743.402, 5.866.765 y 5.866.766 describen líneas de girasol e híbridos que tienen rasgos para un alto contenido en ácido oleico en el aceite de la semilla. La patente de EEUU 5.959.175 describe un método para modificar la composición del aceite del girasol a través de la regulación genética. Las patentes de EEUU 4.378.655 y 4.527.352 describen híbridos de girasol semienanos y totalmente enanos. Se conocen rasgos de resistencia a *Orobanche* y se ha estudiado la herencia de genes que proporcionan resistencia a *Orobanche* (véase, por ejemplo, J.F. Miller y G.N. Fick, "The Genetics of Sunflower", en *Sunflower Technology and Production*, A.A. Scheneiter ed., nº 35, en Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, WI, EEUU, 1997, en particular pp. 476-477, y las referencias citadas allí).

La reproducción de girasoles se ha convertido en una técnica establecida (véase, por ejemplo, *Sunflower Science and Technology*, J.F. Carter ed., nº 19, en Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, WI, EEUU, 1978, en particular el capítulo 9 (pp. 279-338), G.N. Fick, "Breeding and Genetics", capítulo 10 (pp. 339-369), E.D.P. Whelan, "Cytology and Interspecific Hybridization", y capítulo 11 (pp. 371-386), D.L. Smith, "Planting Seed Production", y *Sunflower Technology and Production*, A.A. Scheneiter, ed., nº 35, en Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, WI, EEUU, 1997, en particular el capítulo 8 (pp. 395-439), G.N. Fick y J.F. Miller, "Sunflower Breeding", capítulo 9 (pp. 441-495), J.F. Miller y G.N. Fick, "The Genetics of Sunflower", capítulo 10 (pp. 497-558), C.C. Jan, "Cytology and Interspecific Hybridization", y capítulo 11 (pp. 559-593), D.L. Bidney y C.J. Scelonge, "Sunflower Biotechnology"). El girasol puede reproducirse mediante técnicas de autopolinización y polinización cruzada. El desarrollo de una variedad híbrida de girasol implica tres etapas: (1) la selección de plantas de diversas agrupaciones de germoplasma para los cruzamientos iniciales; (2) la autofertilización de las plantas seleccionadas de los cruzamientos de reproducción durante varias generaciones para producir una serie de líneas endogámicas que, aunque son diferentes entre sí, se reproducirán de manera replicable y previsible y son muy uniformes; y (3) el cruzamiento de las líneas endogámicas seleccionadas con líneas endogámicas no relacionadas para producir una progenie híbrida (F_1). Durante el proceso de reproducción endogámica en el girasol, el vigor de las líneas disminuye. El vigor se restablece cuando dos líneas endogámicas diferentes se cruzan para producir una progenie híbrida (F_1). Una consecuencia importante de la homocigosidad y la homogeneidad de las líneas endogámicas es que el híbrido creado cruzando un par definido de líneas endogámicas será siempre el mismo. Cuando las líneas endogámicas que crean un híbrido superior se han identificado, puede producirse un suministro continuo de semillas híbridas utilizando estos progenitores endogámicos, y entonces pueden generarse plantas de girasol híbridas a partir de este suministro de semillas híbridas. La producción de híbridos de girasol comerciales a gran escala, tal como se practica en la actualidad, requiere el uso de alguna forma de sistema de esterilidad masculina, tal como se describió anteriormente.

Además de la reproducción sexual, las plantas de girasol pueden propagarse a través de técnicas de cultivo de tejido y de células, que conservan inherentemente la estructura genética de la planta original. Sin embargo, el genoma también puede alterarse en la etapa de cultivo celular mediante el uso de técnicas de mutagénesis o de transferencia de genes muy conocidas (por ejemplo, infección con *Agrobacterium tumefaciens*, bombardeo de partículas balístico). Fundamentalmente, cualquier tejido vegetal con células capaces de división celular puede utilizarse para la propagación de plantas por medio de técnicas de cultivo de tejido y de células. Los cultivos pueden iniciarse a partir de embriones, polen, óvulos, anteras, pétalos y otras partes florales y seminales, hojas, tallos y raíces, incluyendo los ápices radiculares. Los tejidos procedentes del área vascular de los tallos y las raíces son particularmente adecuados. Las patentes de EEUU 4.670.391, 4.670.392, 4.673.648, 4.681.849, 4.687.743 y 5.030.572 describen método para regenerar plantas de girasol a partir de cultivos celulares derivados de tejidos de girasol. Así, es evidente a partir de la bibliografía que en la técnica actual estos métodos para obtener plantas de girasol a partir de cultivos celulares y cultivos de tejido son ahora muy conocidos. Así, otro aspecto de esta invención es proporcionar células según se reivindican en la presente que, tras el crecimiento y la diferenciación, producen plantas de girasol que tienen un rasgo de tolerancia a sulfonilureas.

Las variedades de girasol tolerantes a sulfonilureas extienden la utilidad de los herbicidas de sulfonilurea y proporcionan al agricultor de girasoles más opciones para el control de hierbas adventicias. Con menores restricciones para la seguridad del cultivo, puede aumentar el énfasis en obtener un buen control de hierbas adventicias problemáticas. Estas hierbas adventicias incluyen hierbas parasitarias, tales como los jopos (*Orobanche* spp.) y las tiñas (*Cuscuta* spp.). Los jopos que afectan al girasol incluyen *Orobanche aegyptiaca* Pers., *O. ramosa* L., *O. minor* Sm., *O. cumana* Wallr., y *O. cernua* Loefl. Las tiñas que afectan al girasol incluyen *Cuscuta glomerata* Choisy, *C. indecora* Choisy, y *C. pentagona* Engelm. El control de las especies de *Orobanche* mediante sulfonilureas en variedades de girasol resistentes a las sulfonilureas es particularmente valioso, puesto que *Orobanche* ha sido difícil de controlar utilizando herbicidas lo suficientemente seguros para variedades de girasol comunes. Además, las variedades de girasol resistentes a sulfonilureas proporcionan una oportunidad para combinar herbicidas que tienen espectros complementarios de control de hierbas adventicias y diferentes modos de acción. Estas mezclas de herbicidas permiten al agricultor controlar otras especies de hierbas adventicias, al mismo tiempo que reducen el riesgo de favorecer biotipos de hierbas adventicias resistentes a herbicidas, que podrían prevalecer tras un uso repetido de herbicidas con el mismo modo de acción.

Un tratamiento con sulfonilureas selectivamente letales también podría utilizarse para eliminar plantas con características distintas a las de la variedad sensibles a herbicidas de las poblaciones resistentes a sulfonilureas que se han contaminado debido a manipulaciones descuidadas de las semillas. Los campos de producción de semillas a gran escala pueden limpiarse con facilidad de plantas con características distintas a las de la variedad pulverizando

todo el campo con un tratamiento herbicida que sea letal para las plantas sensibles al herbicida.

Puede utilizarse de modo ventajoso una amplia variedad de herbicidas de sulfonilurea para controlar las hierbas adventicias en girasoles resistentes a sulfonilureas, que incluyen amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfurona-metilo, clorimurona-etilo, clorsulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfurona-metilo, etoxisulfurona, flupirsulfurona-metilo, flazasulfurona, foramsulfurona, halosulfurona-metilo, imazosulfurona, yodosulfurona-metilo, mesosulfurona, metsulfurona-metilo, nicosulfurona, oxasulfurona, primisulfurona-metilo, prosulfurona, pirazosulfurona-etilo, rimsulfurona, sulfometuron-metilo, tifensulfurona-metilo, triasulfurona, tribenurona-metilo, trifloxisulfurona y triflusulfurona-metilo. Aunque una línea de girasol resistente a sulfonilureas concreta generalmente demuestra una tolerancia apreciable a una diversidad de sulfonilureas, se garantizan unos altos niveles de tolerancia a la sulfonilurea concreta utilizada como agente de selección durante la selección artificial tras una mutagénesis inducida. Sin embargo, la mutagénesis selectiva y la selección artificial también pueden producir unos altos niveles de tolerancia a sulfonilureas distintas de la utilizada como agente de selección.

En general, los herbicidas de sulfonilurea se aplican a girasoles resistentes a sulfonilureas en tasas similares a las aplicadas a otros cultivos. Los herbicidas de sulfonilurea pueden aplicarse a cultivos de girasol para antes de la emergencia y después de la emergencia. Para el control de muchas hierbas adventicias, incluyendo hierbas parasitarias tales como *Orobanche*, la aplicación después de la emergencia en general proporciona la mayor eficacia para una tasa de aplicación concreta. Sin embargo, las aplicaciones antes de la emergencia y de revestimiento de semillas pueden ser útiles en combinación con tratamientos después de la emergencia para el control de *Orobanche*. Además, dividiendo las aplicaciones en más de un tratamiento (es decir, aplicaciones divididas) se puede mejorar el control de *Orobanche*, al mismo tiempo que se reduce el riesgo de fitotoxicidad para el girasol. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las tasas de aplicación, así como la programación necesaria para alcanzar el nivel deseado de control de hierbas adventicias y seguridad del cultivo.

Con las líneas de girasol resistentes a sulfonilureas descritas específicamente "M7", "M11" y "M12" y sus híbridos, son particularmente útiles la tribenurona-metilo, la metsulfurona-metilo y la etametsulfurona-metilo para el control selectivo de hierbas adventicias, incluyendo *Orobanche*. Para un control eficaz de hierbas adventicias con una tolerancia del cultivo adecuada, la tribenurona-metilo en general se aplica en el intervalo de 5 a 50 g/ha, siendo preferidos de 8 a 40 g/ha, y siendo más preferidos de 15 a 30 g/ha para la mayoría de los usos. Para un control eficaz de hierbas adventicias con una tolerancia del cultivo adecuada, la metsulfurona-metilo en general se aplica en el intervalo de 1 a 12 g/ha, siendo preferidos de 2 a 10 g/ha, y siendo más preferidos de 4 a 8 g/ha para la mayoría de los usos. Para un control eficaz de hierbas adventicias con una tolerancia del cultivo adecuada, la etametsulfurona-metilo en general se aplica en el intervalo de 5 a 50 g/ha, siendo preferidos de 10 a 40 g/ha, y siendo más preferidos de 15 a 30 g/ha para la mayoría de los usos.

Los siguientes ensayos demuestran la tolerancia a herbicidas de variedades de girasol obtenidas a partir de la reproducción convencional de las líneas resistentes a sulfonilureas "M7", "M11" y "M12", y el control de hierbas adventicias en estas variedades utilizando herbicidas de sulfonilurea.

Ensayo A - Demostración de la resistencia a herbicidas de sulfonilurea

En un pequeño ensayo de campo, las variedades de girasol descritas en la tabla 4 se pulverizaron después de la emergencia con una diversidad de tratamientos con herbicidas de sulfonilurea.

Tabla 4. Descripción de variedades de girasol, incluyendo las líneas endogámicas mutantes e híbridos

nº	Nombre	Descripción
A	Híbrido control: H89A x RHA274	USDA CMS H89A ("USDA" significa United States Department of Agriculture, "CMS" significa línea estéril masculina citoplásrica) cruzada con la línea restauradora USDA RHA274
B	Línea endogámica control: H89A	USDA CMS H89A (línea endogámica estéril masculina citoplásrica)
C	GA-M ₄ M12 x RHA247	Mutante híbrido con la generación M ₄ de la línea mutante M12 por la parte femenina
D	GA-M ₄ M11 x RHA247	Mutante híbrido con la generación M ₄ de la línea mutante M11 por la parte femenina
E	GA-M ₄ M7 x RHA247	Mutante híbrido con la generación M ₄ de la línea mutante M7 por la parte femenina
F	H89A x M ₄ M12	USDA CMS H89A cruzado con la generación M ₄ de la línea mutante M12 por la parte masculina
G	H89A x M ₄ M11	USDA CMS H89A cruzado con la generación M ₄ de la línea mutante M11 por la parte masculina

nº	Nombre	Descripción
H	H89A x M ₄ M7	USDA CMS H89A cruzado con la la generación M ₄ de la línea mutante M7 por la parte masculina
I	BC ₃ -M ₄ M12	Retrocruzamiento de tercera generación de la línea mutante endogámica M12
J	BC ₃ -M ₄ M11	Retrocruzamiento de tercera generación de la línea mutante endogámica M11
K	BC ₃ -M ₄ M7	Retrocruzamiento de tercera generación de la línea mutante endogámica M7

Para generar los híbridos C, D y E, la cuarta generación de las líneas mutantes mantenadoras autopolinizadas M₄M12, M₄M11 y M₄M7 se esterilizaron de modo químico aplicando a la etapa floral de capullo "en estrella" una pequeña cantidad de disolución de ácido giberélico para esterilizar el polen según el método general descrito en *Sunflower Science Technology*, J.F. Carter ed. (nº 19 en la serie "Agronomy"), pp. 339-386. Este tratamiento permite

- 5 a las plantas mantenadoras comportarse como líneas endogámicas CMS y permite la producción de híbridos resistentes heterocigóticos, proveniendo la fuente de resistencia a herbicidas de la parte femenina. Estos cruzamientos permiten evaluar el efecto sexual de la fuente de mutación cuando se introduce en la parte femenina de un cruzamiento, tal como se describe en los cruzamientos C, D y E frente a la parte masculina de un cruzamiento, según se describe en los cruzamientos F, G y H. Los marcadores I, J y K identifican las líneas mutantes CMS de tercera generación cruzadas con las líneas mantenadoras de cuarta generación para mantener el rasgo mutante altamente heredable en un entorno resistente homocigótico estéril masculino. Los expertos en la técnica de la reproducción de girasoles entienden el significado de estos cruzamientos.

10 Se realizaron aplicaciones a voleo después de la emergencia de herbicidas de sulfonilurea formulados en la etapa 6 del desarrollo foliar utilizando cuatro réplicas distribuidas al azar. Se eligieron las tasas de aplicación para que se correspondiesen con las tasas de uso habituales de estos herbicidas en los cultivos que están registradas en Europa. Todos los herbicidas, excepto la metsulfurona-metilo, se pulverizaron en combinación con el alcohol etoxilado no iónico Citowet® al 0,25% en volumen del producto formulado por volumen de agua aplicada por hectárea.

15 La evaluación del máximo (es decir, el pico) de daños a las variedades de girasol por los herbicidas de sulfonilurea se midió mediante evaluaciones visuales, que se listan en la tabla 5. Una evaluación del 0% de fitotoxicidad significa que no hay daños en el cultivo. Una evaluación de daños del 15% al 20%, que indica que las plantas no se vieron significativamente afectadas de modo adverso y se recuperaron rápida y completamente, es el límite de daños considerado aceptable por los agricultores. Una evaluación del 100% significa la completa destrucción de todas las plantas.

20 25 Tabla 5. Máxima fitotoxicidad después de los tratamientos con sulfonilureas

Ingrediente activo	Tasa (g de i.a./ha)*	Variedades de girasol										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Primsulfurona-metilo	30	100	100	71	75	74	66	73	69	35	55	51
Nicosulfurona	30	33	54	12	13	13	15	20	16	8	23	14
Rimsulfurona	15	100	100	99	99	98	98	98	96	90	95	95
Rimsulfurona	30	100	100	100	100	100	100	100	100	97	98	97
Triflusulfurona-metilo	20	100	100	19	19	20	16	15	10	4	6	8
Triflusulfurona-metilo	40	100	100	38	40	38	33	36	33	13	14	10
Tifensulfurona-metilo	35	100	100	75	81	83	78	81	80	34	52	36
Tifensulfurona-metilo	70	99	100	88	92	93	89	90	90	53	79	79
Metsulfurona-metilo	6	100	100	8	7	0	4	6	4	7	11	8
Tribenurona-metilo	22,5	100	100	0	6	2	0	3	0	4	0	4
Triasulfurona	20	100	100	94	99	97	98	98	98	93	95	95

* Las tasas de aplicación en los tratamientos se refieren a la cantidad de ingrediente activo en los herbicidas formulados en unidades de g/ha.

Los controles híbrido y endogámico sensible (A y B) fueron destruidos por todos los herbicidas de sulfonilurea ensayados, excepto la nicosulfurona. Las líneas endogámicas resistentes homocigóticas BC₃-M₄M12 (I), BC₃-M₄M11 (J) y BC₃-M₄M7 (K) fueron resistentes a la metsulfurona-metilo, la tribenurona-metilo y, en menor grado, la

5 triflusulfurona-metilo a 20 g de i.a./ha, marginalmente tolerantes a la nicosulfurona, y menos susceptibles que las líneas convencionales a la tifensulfurona-metilo y la primisulfurona-metilo. Las tres líneas fueron tan susceptibles como las líneas convencionales a la rimsulfurona y la triasulfurona a las tasas de aplicación ensayadas. Los híbridos resistentes heterocigóticos (C a H) fueron tan tolerantes como las tres líneas resistentes homocigóticas a la metsulfurona-metilo y la tribenuronona-metilo, pero las líneas resistentes homocigóticas fueron más tolerantes a la primisulfurona-metilo, la nicosulfurona y la tifensulfurona-metilo. Estos resultados son indicativos de mutaciones altamente heredables (es decir, de tipo dominante o semidominante).

Ensayo B - Evaluación de la resistencia a herbicidas que inhiben ALS

10 Se realizó un experimento en invernadero para evaluar el espectro de tolerancia de tres mutantes resistentes homocigóticos a diversos herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS) como su modo de acción. Las líneas endogámicas ensayadas fueron las mantenedoras autopolinizadas de 5^a generación M₅M7, M₅M11 y M₅M12, así como los retrocruzamientos estériles masculinos de 4^a generación BC₄-M₅M7, BC₄-M₅M11 y BC₄-M₅M12. Los tratamientos con los herbicidas formulados se aplicaron después de la emergencia en la etapa foliar 4. Las tasas de aplicación de los herbicidas de ensayo se eligieron para que coincidiesen con las tasas que se utilizan habitualmente en los cultivos para los que están registrados. La tasa de aplicación del imazetapiro se eligió para que se correspondiese con la tasa recomendada para controlar hierbas adventicias parasitarias en girasol por L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1995, 9, 819-824. El girasol endogámico H89 de tipo salvaje no se incluyó en este ensayo, porque se sabe que muchos de los herbicidas ensayados son eficaces para controlar girasoles espontáneos como hierba adventicia. Los tratamientos se duplicaron. La evaluación del máximo de daños a las variedades de girasol por causa de los herbicidas de sulfonilurea se midió mediante evaluaciones visuales; los valores medios se listan en la tabla 6. Una evaluación del 0% de fitotoxicidad significa que no hay daños en el cultivo. Una evaluación de daños del 15% al 20% indica que las plantas no se vieron significativamente afectadas de modo adverso y se recuperaron rápida y completamente. Una evaluación del 100% significa la completa destrucción de todas las plantas.

25 Tabla 6. Máxima fitotoxicidad después de los tratamientos con herbicidas

Ingrediente activo	Tasa (g de i.a./ha)*	Variedades de girasol (descritas en la tabla 2)					
		M ₅ M7	M ₅ M11	M ₅ M12	BC ₄ -M ₅ M7	BC ₄ -M ₅ M11	BC ₄ -M ₅ M12
Halosulfurona-metilo	45	50	60	60	60	65	65
Flupirsulfurona-metilo-sodio	10	62,5	50	57,5	42,5	60	50
Amidosulfurona	30	52,5	60	45	47,5	57,5	55
Tribenuronona-metilo	22,5	12,5	0	7,5	10	17,5	20
Rimsulfurona	15	52,5	65	55	45	47,5	65
Sulfosulfurona	22,5	50	60	65	47,5	57,5	50
Etametsulfurona-metilo	15	10	0	0	5	10	0
Clorsulfurona	20	47,5	50	45	45	50	45
Imazetapiro (sal de amonio)	25	22,5	30	22,5	20	25	30
Piritiobac-sodio	70	37,5	50	40	35	42,5	40

* Las tasas de aplicación en los tratamientos se refieren a la cantidad de ingrediente activo en los herbicidas formulados en unidades de g/ha.

30 Los resultados confirman la buena tolerancia de la progenie homocigótica de las tres fuentes de mutantes a la tribenuronona-metilo. También se descubrió que todos los mutantes eran extremadamente resistentes a la etametsulfurona-metilo. Se observó una tolerancia marginal a una tasa de uso baja del imazetapiro. Sin embargo, puesto que el germoplasma de girasol no resistente a sulfonilureas también muestra una tolerancia marginal similar al imazetapiro, no puede considerarse que la tolerancia marginal observada esté provocada por las mutaciones de resistencia a sulfonilureas. Se descubrió que los mutantes eran algo sensibles a la rimsulfurona, la halosulfurona-metilo, la flupirsulfurona-metilo (sal de sodio), la amidosulfurona, la sulfosulfurona, la clorsulfurona y el piritiobac-sodio.

Ensayo C - Evaluación de la fitotoxicidad de las sulfonilureas en híbridos de girasol resistentes

35 Se realizó un ensayo de fitotoxicidad en un campo abierto utilizando los híbridos BC₄-M₅M7 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino) y BC₄-M₅M12 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino), en los que la tolerancia de cada híbrido probablemente se basa en distintos acontecimientos de mutagénesis. PHA155 es una línea restauradora desarrollada por Pioneer Hi-Bred International que puede

utilizarse como progenitor masculino en cruzamientos con líneas de girasol estériles masculinas citoplásmicas (CMS).

Los herbicidas de ensayo se aplicaron como composiciones formuladas después de la emergencia en la etapa foliar 6 del girasol en tres réplicas distribuidas al azar. Para las aplicaciones después de la emergencia, los herbicidas de ensayo se aplicaron en una disolución mezclada en tanque acuosa que contenía tensioactivo de alcohol graso etoxilado Witco Trend 90® al 0,1% en v/v. También se estudiaron en este ensayo dos tratamientos de revestimiento de semillas con sulfonilureas (tribenurona-metilo y metsulfurona-metilo) utilizando herbicidas formulados, de nuevo utilizando tres réplicas. La evaluación de los daños a las variedades de girasol debidos a los herbicidas de sulfonilurea se midió mediante evaluaciones visuales; los valores medios se listan en la tabla 7. Una evaluación del 0% de fitotoxicidad significa que no hay daños en el cultivo. Una evaluación de daños del 15% al 20% indica que las plantas no se vieron significativamente afectadas de modo adverso y se recuperaron rápida y completamente. Una evaluación del 100% significa la completa destrucción de todas las plantas.

Tabla 7. Fitotoxicidad para los híbridos BC₄-M₅M7 x PHA155 y BC₄-M₅M12 x PHA155 después de los tratamientos con herbicidas

Ingrediente activo	Tasa*	Evaluación después del tratamiento					
		BC ₄ -M ₅ M7 x PHA155			BC ₄ -M ₅ M12 x PHA155		
		7 DAT#	15 DAT	30 DAT	7 DAT	15 DAT	30 DAT
<i>Después de la emergencia:</i>							
Tribenurona-metilo	11,25	25	20	8	17	18	8
Tribenurona-metilo	22,5	37	38	22	22	18	13
Metsulfurona-metilo	3	28	28	15	23	23	22
Metsulfurona-metilo	6	55	58	43	43	50	33
Triflusulfurona-metilo	7,5	38	40	28	22	22	25
Triflusulfurona-metilo	15	57	53	40	38	45	43
Clorimurona-etilo	6,25	83	73	67	70	80	68
Clorimurona-etilo	12,5	85	83	83	80	90	88
Nicosulfurona	18,75	37	40	18	28	20	18
Nicosulfurona	37,5	57	55	50	42	52	50
Rimsulfurona	15	87	92	93	87	90	90
<i>Tratamiento de las semillas:</i>							
Tribenurona-metilo	22,5	57	38	32	10	23	11
Metsulfurona-metilo	6	88	73	57	83	75	57

* Las tasas de aplicación en los tratamientos se refieren a la cantidad de ingrediente activo en los herbicidas formulados en unidades de g de i.a./ha.

Días después del tratamiento.

15 Los híbridos utilizados en este ensayo eran heterocigóticos en el gen de resistencia. Tal como se muestran los resultados del ensayo A, puede esperarse que las variedades homicogóticas en el gen de resistencia tengan mayor resistencia que los híbridos BC₄-M₅M7 x PHA155 y BC₄-M₅M12 x PHA155 a algunos de los herbicidas utilizados en el ensayo C. Los datos en la tabla 7 muestran que la fitotoxicidad en estos dos híbridos fue mayor poco después de la aplicación del herbicida y después disminuyó. Para la tribenurona-metilo a 11,25 g de i.a./ha se observaron pocas lesiones 30 días después del tratamiento. Para la aplicación después de la emergencia a estos híbridos, se descubrió que la tribenurona-metilo era la sulfonilurea más selectiva, seguida de la metsulfurona-metilo, la nicosulfurona, la triflusulfurona-metilo, la clorimurona-etilo y la rimsulfurona. La aplicación después de la emergencia a estos híbridos es menos fitotóxica que el revestimiento de semillas.

Ensayo D - Uso de sulfonilureas para controlar a *Orobanche cumana* en girasoles resistentes

25 Se emplearon diversas líneas endogámicas o híbridos procedentes de los mutantes resistentes M7 y M12 para demostrar el control de la especie de hierba adventicia parasitaria *Orobanche cumana*. El objetivo de este ensayo es evaluar la eficacia de la tribenurona-metilo para controlar a *Orobanche cumana* antes y después de la emergencia del cultivo de la tierra. Se evaluaron diversos tratamientos con herbicidas utilizando seis réplicas de cada tratamiento. Los tratamientos investigan los siguientes modos de aplicación: revestimiento de semillas, incorporación a la tierra antes de la emergencia, aplicación a voleo antes de la emergencia a la tierra desnuda, y aplicación a voleo después de la emergencia. Todos los tratamientos con herbicidas emplearon composiciones de herbicidas formuladas.

Revestimiento de semillas

Para los tratamientos de revestimiento de semillas, se añadieron 3 mg de semillas de *Orobanche cumana* a cada maceta que contenía una mezcla de cultivo con 60% de tierra margosa seca, 20% de arena y 20% de turba, conteniendo la mezcla de cultivo un contenido en materia orgánica del 4,2% y un pH de 8,05. Las macetas se colocaron en bandejas de plástico y se regaron hasta el grado del 25% de peso de la tierra. Las macetas se mantuvieron en un invernadero durante 8 a 10 días a aproximadamente 24 °C durante el día y a 20 °C durante la noche. Se sembraron a mano 8 semillas del mutante resistente de girasol BC₄-M₅M12 en las macetas contaminadas con *Orobanche*, al final del periodo de incubación de las semillas de la hierba adventicia parasitaria.

Antes de sembrar, las semillas de girasol se revistieron con una composición formulada que contenía tribenurona-metilo al 25%. Las semillas primero se revistieron utilizando un lecho fluido de laboratorio de mesa equipado con un dispositivo de revestimiento ("Strea I Aerocoater", fabricado por Niro Aeromatic, Haupstrasse 145, CH-4416 Bubendorf, Suiza) y una disolución de revestimiento que contenía aproximadamente 23% de Sepiret 8330® aproximadamente al 23% (composición de revestimiento comercializada por Seppic, 75 quai d'Orsay, Paris 75321 cedex 07, Francia) y agua al 77% a una tasa de 3 l/100 kg de semillas. Despues del revestimiento, las semillas se secaron en un secador de lecho fluido a 35 °C. Despues las semillas se sellaron en una bolsa de plástico que contenía una disolución acuosa que equivale al 5% del peso de las semillas que contiene la composición de tribenurona-metilo. La cantidad de tribenurona-metilo era de 0,00001, 0,1 o 10 mg de i.a./g de semillas. La bolsa se agitó con fuerza durante 3 minutos para distribuir uniformemente la disolución de tribenurona-metilo por la superficie de las semillas. Las semillas revestidas despues se secaron a temperatura ambiente y se conservaron hasta la siembra. Se eligió la concentración máxima para proporcionar una tasa de uso similar a la tasa máxima de tribenurona-metilo utilizada en Europa para el control de hierbas adventicias en cultivos de cereal.

Incorporación a la tierra antes de la emergencia

Para los tratamientos con una incorporación a la tierra antes de la emergencia, una mezcla acuosa de la composición de tribenurona-metilo se pulverizó sobre tierra que contenía semillas de *Orobanche cumana*. La tierra despues se mezcló a fondo a mano y se dispensó a las macetas. Las cantidades de tribenurona-metilo utilizadas en estos tratamientos se expresan en g de i.a./ha basándose en el volumen de la tierra y las dimensiones de la maceta. Las cantidades aplicadas fueron 11,25 y 22,5 g de i.a./ha.

Aplicación a voleo antes de la emergencia

Para las aplicaciones a voleo antes de la emergencia, dos días despues de sembrar las semillas de girasol, las macetas se pulverizaron con una mezcla acuosa de la composición de tribenurona-metilo a unas tasas de aplicación de 11,25 y 22,5 g de i.a./ha.

Aplicación a voleo despues de la emergencia

Para aplicaciones a voleo despues de la emergencia en la etapa foliar 6 a 8 del girasol, las macetas se pulverizaron con una mezcla acuosa de la composición de tribenurona-metilo a unas tasas de aplicación de 2,25 y 11,25 g de i.a./ha.

Evaluación

Se evaluó el efecto de los diversos tratamientos 35 días despues de sembrar. Las raíces del girasol se limpian mediante un lavado con agua, y se determinó la presencia de nódulos de *Orobanche* de modo visual y pesando la masa radical húmeda, en comparación con plantas control sin infestación por *Orobanche*. Comparado con los nódulos observados en las plantas control, los nódulos de *Orobanche* controlados no mostraron crecimiento y tenían un color marrónáceo, y no presentaban un ápice blanco de crecimiento del tallo. Los nódulos provocados por *Orobanche* aumentan el peso radical, y se descubrió una correlación ($r = 0,7$) entre las puntuaciones visuales y las mediciones del peso. Así, la técnica del pesado puede utilizarse para corroborar las puntuaciones de eficacia visual. También se puntuó la emergencia de *Orobanche* pero se descubrió que era menos útil para evaluar la eficacia del tratamiento en las programaciones de evaluación de este ensayo. Los resultados de estos tratamientos se listan en la tabla 8.

Tabla 8. Descripciones de los tratamientos de *Orobanche* utilizando tribenurona-metilo y resultados

Revestimiento de las semillas (mg de i.a./g)			Incorporación a la tierra antes de la emergencia (g de i.a./ha)		Pulverización a voleo antes de la emergencia (g de i.a./ha)		Pulverización a voleo despues de la emergencia (g de i.a./ha)		Control (%)
0,00001	0,1	10	11,25	22,5	11,25	22,5	2,25	11,25	
									0
X									8

Revestimiento de las semillas (mg de i.a./g)			Incorporación a la tierra antes de la emergencia (g de i.a./ha)		Pulverización a voleo antes de la emergencia (g de i.a./ha)		Pulverización a voleo después de la emergencia (g de i.a./ha)		Control (%)
0,00001	0,1	10	11,25	22,5	11,25	22,5	2,25	11,25	
	X								37
		X							82
X							X		63
X								X	70
	X						X		85
	X							X	80
		X					X		82
		X						X	89
			X						55
				X					72
					X				40
						X		X	78
							X		63
								X	88

En aplicaciones individuales, los revestimientos de las semillas y las aplicaciones después de la emergencia ofrecieron el mejor control de *Orobanche*. El revestimiento de las semillas utilizando 10 mg de i.a./g de semillas, o la aplicación después de la emergencia de 11,25 g de i.a./ha produjeron cada uno más del 80% de control de *Orobanche*, según se mide por su efecto sobre las raíces. La combinación de los modos de aplicación permite disminuir las tasas para cada modo de aplicación, o en las mismas tasas ofrecen mayor control. El mejor tratamiento global, que ofrece 89% de control, fue de un revestimiento a 10 mg de i.a./g de semillas, seguido de una aplicación después de la emergencia de 11,25 g de i.a./ha.

Ensayo E - Uso de sulfonilureas para controlar a *Orobanche cumana* en girasoles resistentes

Basándose en los resultados del ensayo D, se desarrolló un protocolo modificado para incluir tres programaciones de tratamientos después de la emergencia. En este ensayo se empleó el híbrido BC₄-M₅M12 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino) descrito en el ensayo C. Se ensayaron diversos programas de herbicidas utilizando tres réplicas. Se aplicó una composición formulada de herbicida de tribenuronametilo a 11,5 y 22,5 g de i.a./ha, y se aplicó una composición formulada de herbicida de metsulfuronametilo a 3 y 6 g de i.a./ha. Se aplicaron revestimientos a las semillas con estos herbicidas formulados a 6 kg de semilla en una cantidad tal que, considerando la distribución de las semillas revestidas en cada maceta, las tasas de aplicación del ingrediente activo (i.a.) herbicida por hectárea fueron las indicadas.

Los tratamientos se aplicaron de modo similar a los métodos descritos en el ensayo D. Las aplicaciones antes de la emergencia fueron sólo a voleo, y no se incorporaron a la tierra. Para la aplicación antes de la emergencia, las macetas se pulverizaron utilizando unas tasas altas de los herbicidas dos días después de sembrar las semillas de girasol. Los tratamientos después de la emergencia se aplicaron en la etapa foliar 4-6 del girasol (que se corresponde con la etapa temprana de fijación de *Orobanche*; identificada como "T1"), en la etapa foliar 6-8 del girasol (que se corresponde con la etapa intermedia de fijación de *Orobanche*; nódulos con diámetro < 5 mm; identificada como "T2"), y en la etapa foliar 8-12 del girasol (que se corresponde con la etapa tardía de fijación de *Orobanche*; identificada como "T3"). Las aplicaciones de la etapa intermedia incluyen tasas de aplicación altas y bajas de cada herbicida.

Para la comparación, también se incluyeron en este ensayo otros herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa, que en la bibliografía se indica que proporcionan un buen control de hierbas adventicias de *Orobanche* (L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1994, 34, 395-402; L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1995, 39, 819-824; J. Hershenhorn et al., *Weed Technology*, 1998, 12, 108-114).

- 5 Los resultados se evaluaron según se describe para el ensayo D y se listan en la tabla 9.
- 10 Los resultados del ensayo D se desarrolló un protocolo modificado para incluir tres programaciones de tratamientos después de la emergencia. En este ensayo se empleó el híbrido BC₄-M₅M12 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino) descrito en el ensayo C. Se ensayaron diversos programas de herbicidas utilizando tres réplicas. Se aplicó una composición formulada de herbicida de tribenuronametilo a 11,5 y 22,5 g de i.a./ha, y se aplicó una composición formulada de herbicida de metsulfuronametilo a 3 y 6 g de i.a./ha. Se aplicaron revestimientos a las semillas con estos herbicidas formulados a 6 kg de semilla en una cantidad tal que, considerando la distribución de las semillas revestidas en cada maceta, las tasas de aplicación del ingrediente activo (i.a.) herbicida por hectárea fueron las indicadas.
- 15 Los tratamientos se aplicaron de modo similar a los métodos descritos en el ensayo D. Las aplicaciones antes de la emergencia fueron sólo a voleo, y no se incorporaron a la tierra. Para la aplicación antes de la emergencia, las macetas se pulverizaron utilizando unas tasas altas de los herbicidas dos días después de sembrar las semillas de girasol. Los tratamientos después de la emergencia se aplicaron en la etapa foliar 4-6 del girasol (que se corresponde con la etapa temprana de fijación de *Orobanche*; identificada como "T1"), en la etapa foliar 6-8 del girasol (que se corresponde con la etapa intermedia de fijación de *Orobanche*; nódulos con diámetro < 5 mm; identificada como "T2"), y en la etapa foliar 8-12 del girasol (que se corresponde con la etapa tardía de fijación de *Orobanche*; identificada como "T3"). Las aplicaciones de la etapa intermedia incluyen tasas de aplicación altas y bajas de cada herbicida.
- 20 Para la comparación, también se incluyeron en este ensayo otros herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa, que en la bibliografía se indica que proporcionan un buen control de hierbas adventicias de *Orobanche* (L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1994, 34, 395-402; L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1995, 39, 819-824; J. Hershenhorn et al., *Weed Technology*, 1998, 12, 108-114).
- 25 Los resultados se evaluaron según se describe para el ensayo D y se listan en la tabla 9.

Tabla 9. Tratamientos de *Orobanche* y resultados

Herbicida	Revest. de las semillas (g de i.a./ha)	Antes de la emergencia (g de i.a./ha)	Después de la emergencia		Control (%)	Lesiones (%)
			(g de i.a./ha)	Programación		
Tribenurona-metilo		22,5			70	70
Metsulfurona-metilo		6			-	100
Tribenurona-metilo	11,25		11,25	T2	88	50
Metsulfurona-metilo	3		3	T2	-	100
Tribenurona-metilo			22,5	T2	75	0
Metsulfurona-metilo			6	T2	97	25
Tribenurona-metilo			11,25 + 11,25	T1 + T3	90	0
Metsulfurona-metilo			3 + 3	T1 + T3	96	0
Tribenurona-metilo		11,25	11,25	T2	78	0
Metsulfurona-metilo		3	3	T2	87	0
Tribenurona-metilo		22,5			0	0
Metsulfurona-metilo		6			30	0
Clorsulfurona		2			13	0
Clorsulfurona		10			58	0
Imazetapiro, sal de amonio		40			60	0
Imazetapiro, sal de isopropilamina			15	T3	72	0
Triflusulfurona-metilo			18,75	T2	75	0

Los tratamientos que implican aplicación antes de la emergencia sólo tienen un pequeño efecto sobre *Orobanche* a las tasas ensayadas, probablemente debido al poco riego de la tierra que hizo que los herbicidas no alcancasen las raíces del girasol. Los tratamientos que implican revestimiento de semillas tuvieron un efecto sustancial sobre *Orobanche*, pero fueron considerablemente fitotóxicos a estas tasas de aplicación para las variedades de girasol en este ensayo.

5 Los tratamientos que implican aplicación después de la emergencia produjeron los mejores resultados en este ensayo. Se descubrió que la metusulfurona-metilo era más eficaz para controlar a *Orobanche* y también había más probabilidad de que provocase fitotoxicidad en el girasol incluso a tasas de aplicación más bajas, que la tribenurona-metilo. Una aplicación dividida de metsulfurona-metilo de 3 g de i.a./ha a cada uno de T1 y T3 proporciona el mismo nivel excelente de control de *Orobanche* que 6 g de i.a./ha a T2, pero elimina la fitotoxicidad en el girasol.

10 Los tratamientos que implican aplicación después de la emergencia produjeron los mejores resultados en este ensayo. Se descubrió que la metusulfurona-metilo era más eficaz para controlar a *Orobanche* y también había más probabilidad de que provocase fitotoxicidad en el girasol incluso a tasas de aplicación más bajas, que la tribenurona-metilo. Una aplicación dividida de metsulfurona-metilo de 3 g de i.a./ha a cada uno de T1 y T3 proporciona el mismo nivel excelente de control de *Orobanche* que 6 g de i.a./ha a T2, pero elimina la fitotoxicidad en el girasol.

La clorsulfurona, el imazetapiro, el imazapiro y la triflusulfurona-metilo fueron menos eficaces para controlar a *Orobanche*. El imazetapiro y la triflusulfurona-metilo provocan síntomas de fitotoxicidad transitorios, pero los girasoles se recuperaron completamente.

15 Ensayo F - Aplicación secuencial de sulfonilureas para controlar a *Orobanche cumana*

Se realizó un experimento en invernadero para identificar el mejor programa secuencial comparado con la aplicación directa de tribenurona-metilo o metsulfurona-metilo para el control de *Orobanche cumana* (raza F). También se estudió el intervalo de dosis para la eficacia óptima. Ambos herbicidas se utilizaron como composiciones formuladas. En este ensayo se utilizaron los dos híbridos BC₄-M₅M7 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino) y BC₄-M₅M12 (progenitor femenino) x línea restauradora PHA155 (progenitor masculino) descritos en el ensayo C. BC₄-M₅M7 x PHA155 se denomina a continuación "híbrido 7", y BC₄-M₅M12 x PHA155 se denomina a continuación "híbrido 12".

20 El tratamiento de revestimiento de semillas se realizó como se describe para el ensayo D. Los tratamientos después de la emergencia se aplicaron en la etapa foliar 2-4 del girasol (que se corresponde con la etapa temprana de fijación de *Orobanche*; identificada como "T1"), en la etapa foliar 6 del girasol (que se corresponde con la etapa intermedia de fijación de *Orobanche*; nódulos con diámetro < 5 mm; identificada como "T2"), y en la etapa foliar 8 del girasol (que se corresponde con la etapa tardía de fijación de *Orobanche*; identificada como "T3").

El imazapiro, que es una imidazolinona en lugar de una sulfonilurea, pero que también inhibe la acetolactato sintasa, se incluyó como referencia puesto que se ha indicado que controla a *Orobanche* en el girasol (L. García-Torres et al., *Weed Research*, 1995, 9, 819-824).

- 5 La eficacia se evaluó de modo visual según se describe para el ensayo D, excepto que la eficacia se evaluó diez días más tarde que para los ensayos D y E. La última evaluación permite observar si existe reducción en la eficacia debido a una emergencia tardía de *Orobanche* o crecimiento de los nódulos tratados. La eficacia para controlar a *Orobanche* fijado a las raíces se manifestó por nódulos que comprenden tejidos necróticos negros sin área meristemática activa aparente. Estos nódulos pueden aplastarse con facilidad con los dedos.

Los tratamientos y los resultados se resumen en la tabla 10.

10 Tabla 10. Tratamientos secuenciales de *Orobanche* y resultados en el híbrido 7 y el híbrido 12

Herbicida	Revest. de las semillas (g de i.a./ha)	Después de la emergencia (g de i.a./ha)			% de control en el híbrido 7	% de control en el híbrido 12
		T1	T2	T3		
Tribenuronametilo	11,25		11,25		77	78
	11,25			11,25	82	83
		11,25			77	73
				11,25	78	80
	22,5				72	73
		22,5			82	83
					87	87
	11,25			11,25	85	85
Metsulfuronametilo		3		3	92	90
		3			65	63
				3	93	95
Imazapiro, sal de isopropilamina				15	97	97

El ensayo demuestra que no se obtienen beneficios por revestir las semillas y después realizar un tratamiento después de la emergencia, comparado con un único tratamiento después de la emergencia. Los tratamientos después de la emergencia tardíos producen un mejor control que los tratamientos después de la emergencia más tempranos, probablemente porque se ajustan mejor a la fase de alargamiento de la actividad del meristemo de los nódulos de *Orobanche*. En este ensayo en invernadero, un único tratamiento después de la emergencia tardío con 3 g de i.a./ha de metsulfuronametilo produjo un control excelente, comparable a 15 g de i.a./ha de imazapiro. Fueron necesarios 22,5 g de i.a./ha de tribenuronametilo para un buen control de *Orobanche*.

Ensayo G - Control de girasoles resistentes a sulfonilureas como hierbas adventicias espontáneas

- 20 Los cultivos de girasol a menudo se rotan con cereales, tales como trigo, o a veces con otros cultivos, tales como remolacha azucarera. Como parte de su espectro de control de hierbas adventicias, los herbicidas de sulfonilurea a menudo se utilizan para eliminar plantas de girasol espontáneas que aparecen en los cultivos rotativos. El objetivo de este ensayo es evaluar los herbicidas que pueden utilizarse para controlar plantas de girasol resistentes a sulfonilureas que aparecen como hierbas adventicias espontáneas.

- 25 Este ensayo utiliza a la progenie del girasol resistente a sulfonilureas BC₂-M₃M11 y BC₂-M₃M12, derivada de M11 y M12, respectivamente. Además, se incluyó un híbrido susceptible a sulfonilureas, H89A x RHA274, para la comparación. Las plantas se pulverizaron con los herbicidas formulados en la etapa foliar 4. La eficacia de los tratamientos en los girasoles se evaluó de modo visual 4 semanas después de la aplicación, utilizando una escala en la que 0 significa que no hay control de los girasoles, 85 significa un nivel de eficacia suficiente para evitar que las plantas florezcan y se propaguen, y 100 significa la completa destrucción de los mutantes. Las respuestas se listan en la tabla 11.

Tabla 11. Efecto de diversos herbicidas sobre el girasol normal y resistente a sulfonilureas

Tratamiento	Tasa (g de i.a./ha)	Eficacia en H89A x RHA274	Eficacia en BC ₂ -M ₃ M11	Eficacia en BC ₂ -M ₃ M12
Tifensulfurona-metilo	10	100	2	10
	20	100	17	16
	40	100	50	32
	60	100	74	58
Tribenurona-metilo	10	100	0	0
	20	100	0	0
	40	100	3	0
	60	100	10	14
Metsulfurona-metilo	4	100	8	18
Triflusulfurona-metilo	15	82	13	8
Fenmedifamo	240	0	0	7
2,4-D	530	100	100	100
Tifensulfurona-metilo + Metsulfurona-metilo	40 + 4	100	83	100
Tifensulfurona-metilo + Tribenurona-metilo	20 + 10	100	26	26
	40 + 20	100	76	60
Metsulfurona-metilo + 2,4-D	4 + 530	100	100	100
Triflusulfurona-metilo + Fenmedifamo	15 + 240	100	40	63

Los resultados confirman el nivel de resistencia de excelente a muy bueno de los mutantes que se originan de M11 y M12 a la tribenurona-metilo hasta 60 g de i.a./ha. Los datos también confirman la tolerancia de los mutantes a la metsulfurona-metilo, la triflusulfurona-metilo y la tifensulfurona-metilo (que se utilizó en la selección artificial original), pero en un menor grado que a la tribenurona-metilo.

5 La combinación de tifensulfurona-metilo con metsulfurona-metilo mostró una buena eficacia contra los mutantes, mientras que la combinación de tifensulfurona-metilo con tribenurona-metilo no fue lo suficientemente activa en cualquiera de las tasas de aplicación como para ser útil para el control de girasoles resistentes a sulfonilureas en cultivos de cereal rotativos, en los que los herbicidas generalmente se aplican sólo una vez durante la temporada de cultivo.

10 Las respuestas de ambos mutantes a 2,4-D, que se utiliza con frecuencia para el control de hierbas adventicias en cereales, fueron exactamente las mismas para los girasoles susceptibles a sulfonilureas; los mutantes fueron completamente destruidos por 2,4-D solo o en combinación con la metsulfurona-metilo.

15 El fenmedifamo, utilizado para el control de hierbas adventicias en la remolacha azucarera, era ineficaz por sí solo para controlar girasoles espontáneos resistentes a sulfonilureas o susceptibles a sulfonilureas. Sin embargo, cuando se combina con la triflusulfurona-metilo, la eficacia mejoró de modo sinérgico, comparado con la triflusulfurona-metilo sola. El control de hierbas adventicias en la remolacha azucarera requiere 2-3 aplicaciones de herbicida por temporada para controlar a las hierbas adventicias de modo eficaz en este cultivo de crecimiento lento. Tras esta práctica agronómica, 2-3 aplicaciones de mezclas de triflusulfurona-metilo y fenmedifamo a los mutantes de girasoles espontáneos probablemente retrasarán su crecimiento de modo suficiente para evitar la floración y la propagación.

20 Ensayo H - Control de hierbas adventicias en girasoles

Este ensayo mide el efecto de tres herbicidas de sulfonilurea (tribenurona-metilo, metsulfurona-metilo y etametsulfurona-metilo), así como dos herbicidas comparativos (sal de isopropilamina de imazapiro y aclonifeno) para el control de hierbas adventicias importantes desde el punto de vista agronómico en cultivos de girasol a unas tasas de aplicación típicas para el uso de estos herbicidas en otros cultivos.

25 Las parcelas (2 m x 5 m) se labraron para eliminar la cubierta de hierbas adventicias y después se sembraron en hilera con las siguientes hierbas adventicias: *Capsella bursa-pastoris*, *Atriplex patula*, *Chenopodium album*, *Stellaria*

5 *media*, *Mercurialis annua*, *Polygonum persicaria*, *Amaranthus retroflexus*, *Polygonum convolvulus*, *Polygonum aviculare*, *Viola arvensis*, *Matricaria inodora*, *Anagallis arvensis*, *Sinapsis arvensis*, *Setaria viridis*, *Solanum nigrum* y
10 *Echinochloa crus-galli*. Tras 21 días desde la siembra, cuando las hierbas adventicias habían alcanzado la etapa foliar 2 a 6, se aplicaron los tratamientos con herbicidas a las parcelas según un diseño en bloque completamente aleatorizado, y cada tratamiento con herbicidas se replicó tres veces. Los herbicidas se pulverizaron utilizando boquillas aventadoras planas convencionales que se mueven en perpendicular a las líneas sembradas utilizando unos volúmenes de agua pulverizada de aproximadamente 296 l/ha. Para los tratamientos con tribenurona-metilo, metsulfurona-metilo, etametsulfurona-metilo y sal de isopropilamina de imazapiro, se añadió 0,1% en volumen del adyuvante de tensioactivo de alcohol graso etoxilado Witco Trend® 90 a las mezclas de pulverización para acelerar el efecto herbicida. La tribenurona-metilo se aplicó a 22,5 g de i.a./ha, la metsulfurona-metilo se aplicó a 6 g de i.a./ha, la etametsulfurona-metilo se aplicó a 16 g de i.a./ha, la sal de isopropilamina del imazapiro se aplicó a 15 g de i.a./ha, y el aclonifeno se aplicó a 1200 g de i.a./ha.

15 Las evaluaciones del control de hierbas adventicias se realizaron mediante inspección visual 36 días después del tratamiento con herbicidas. Se empleó un sistema de evaluación visual basado en una escala de porcentaje del 0% al 100% comparado con una parcela control sin tratar adyacente. En esta escala, 0 indica que no existen diferencias visuales con relación a un control sin tratar, y 100 indica el control completo de las especies de hierbas adventicias concretas. Los resultados se listan en la tabla 12.

Tabla 12. Efecto de los herbicidas sobre hierbas adventicias importantes desde el punto de vista agronómico en cultivos de girasol

Especie de hierba adventicia	Tribenurona-metilo	Metsulfurona-metilo	Etametsulfurona-metilo	Sal de isopropilamina de imazapiro	Aclonifeno
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	100	100	100	100	100
<i>Atriplex patula</i>	100	100	0	85	0
<i>Chenopodium album</i>	100	100	0	87	100
<i>Stellaria media</i>	100	100	79	100	100
<i>Mercurialis annua</i>	100	100	0	47	50
<i>Polygonum persicaria</i>	100	100	0	100	70
<i>Amaranthus retroflexus</i>	93	99	82	84	40
<i>Polygonum convolvulus</i>	93	92	0	94	23
<i>Polygonum aviculare</i>	90	100	0	0	30
<i>Viola arvensis</i>	100	100	0	0	57
<i>Matricaria inodora</i>	100	100	67	43	0
<i>Anagallis arvensis</i>	100	100	100	100	100
<i>Sinapsis arvensis</i>	100	100	97	100	100
<i>Setaria viridis</i>	65	47	0	93	40
<i>Solanum nigrum</i>	100	97	70	100	20
<i>Echinochloa crus-galli</i>	65	47	33	27	0

20 Los resultados listados en la tabla 12 demuestran que la tribenurona-metilo y la metsulfurona-metilo proporcionan un excelente control de hierbas adventicias de amplio espectro a unas tasas de aplicación para las que otros ensayos demuestran que las líneas de girasol de la invención son tolerantes.

Depósitos

25 Los depósitos de las líneas de girasol M7, M11, M12 y PHA155 han sido mantenidos por Pioneer Hi-Bred International, Inc., 800 Capital Square, 400 Locust Street, Des Moines, Iowa 50309-2340, EEUU, desde antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El 2 de agosto de 2000, los solicitantes hicieron el depósito de la línea de girasol M7 en the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20110, EEUU, que consistió en al menos 2500 semillas de la forma estéril masculina citoplásmica SU7F (ATCC nº de depósito PTA-2296) y la forma mantenedora de línea complementaria SU7G (ATCC nº de depósito PTA-2295). Los solicitantes también depositaron en el ATCC el 2 de agosto de 2000 al menos 2500 semillas de la línea de girasol restauradora PHA155 (ATCC nº de depósito PTA-2294). El 8 de diciembre de 2000, los solicitantes hicieron el depósito de la línea de girasol M11 que

consistió en al menos 250 semillas de la forma estéril masculina citoplásica SU11F (ATCC nº de depósito PTA-2767) y la forma mantenedora de línea complementaria SU11G (ATCC nº de depósito PTA-2768), y de la línea de girasol M12 que consistió en al menos 250 semillas de SU12F (ATCC nº de depósito PTA-2769) y SU12G (ATCC nº de depósito PTA-2770), que se cree que comprenden cada una principalmente la forma restauradora de la línea M12. Estos depósitos de las líneas de girasol SU7F y SU7G (M7), SU11F y SU11G (M11), SU12F y SU12G (M12) y PHA155 se mantendrán en el depósito del ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 30 años, o durante 5 años después de la petición más reciente, cualquiera que sea más largo, y serán reemplazadas si ya no son viables durante este periodo. Además, los solicitantes han cumplido todos los requisitos de 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, que incluyen proporcionar una indicación de la viabilidad de las muestras. Los solicitantes no imponen restricciones sobre la disponibilidad del material depositado al ATCC después de la expedición de una patente a partir de esta solicitud. Sin embargo, el solicitante no tiene autoridad para descartar cualquier restricción impuesta por la ley acerca de la transferencia de material biológico o su transporte en el comercio. El solicitante no puede descartar ninguna infracción de los derechos del solicitante concedidos bajo esta patente o bajo the Plant Variety Protection Act (7 USC 2321 et seq.). Se realizarán otros depósitos de las líneas de girasol M11 y M12 en el ATCC según sea necesario para asegurar la disponibilidad sujeta a las condiciones descritas anteriormente en la presente para los depósitos SU7F, SU7G y PHA155.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una semilla de girasol que contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, en la que dicho rasgo está contenido dentro de:
- 5 (i) la línea de girasol M7, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M7 en ATCC nº de depósito PTA-2295 y PTA-2296; o
 - (ii) la línea de girasol M11, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M11 en ATCC nº de depósito PTA-2767 y PTA-2768; o
 - (iii) la línea de girasol M12, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M12 en ATCC nº de depósito PTA-2769 y PTA-2770.
- 10 2.- Una semilla de girasol que contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, en la que dicho rasgo puede obtenerse a través de mutagénesis, en la que dicha semilla es:
- (i) una semilla de la línea de girasol denominada M7, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M7 en ATCC nº de depósito PTA-2295 y PTA-2296; o
 - 15 (ii) una semilla de la línea de girasol denominada M11, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M11 en ATCC nº de depósito PTA-2767 y PTA-2768; o
 - (iii) una semilla de la línea de girasol denominada M12, habiéndose depositado semillas representativas de dicha línea M12 en ATCC nº de depósito PTA-2769 y PTA-2770.
- 20 3.- Una semilla de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que contiene además un rasgo que confiere resistencia al parasitismo por *Orobanche*.
- 25 4.- Una planta de girasol, o una de sus partes que contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que puede obtenerse cultivando la semilla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 5.- El polen de la planta de la reivindicación 4, en el que el polen contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 35 6.- Un óvulo de la planta de la reivindicación 4, en el que el óvulo contiene un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 40 7.- Un cultivo de tejido de células regenerables procedentes de la planta de la reivindicación 4, en el que las células contienen un rasgo dominante o semidominante que confiere tolerancia a herbicidas de sulfonilurea según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 45 8.- Un método para controlar la vegetación no deseada en un cultivo de plantas de girasol de la reivindicación 4, que comprende aplicar al sitio de la vegetación una cantidad eficaz de un herbicida de sulfonilurea.
- 9.- Un método de la reivindicación 8, en el que la vegetación no deseada comprende una hierba adventicia parasitaria.
- 10.- Un método de la reivindicación 9, en el que la hierba adventicia parasitaria es una especie de *Orobanche*.
- 11.- Un método de la reivindicación 8, en el que el herbicida de sulfonilurea es la tribenuronametilo.
- 12.- Un método de la reivindicación 8, en el que el herbicida de sulfonilurea es la metsulfuronametilo.
- 13.- Un método de la reivindicación 8, en el que el herbicida de sulfonilurea es la etamsulfuronametilo.
- 14.- Un método de la reivindicación 8, en el que el herbicida de sulfonilurea se aplica después de la emergencia al cultivo de plantas de girasol.
- 15.- Un método para controlar plantas de girasol espontáneas de la reivindicación 4 en un cultivo de cereales, que comprende aplicar al sitio de las plantas de girasol espontáneas una cantidad eficaz de 2,4-D.
- 16.- Un método para controlar plantas de girasol espontáneas de la reivindicación 4 en un cultivo de remolacha azucarera, que comprende aplicar al sitio de las plantas de girasol espontáneas una cantidad eficaz de una mezcla de triflusulfuronametilo y fenmedifamo.