



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

**(11) PI 0807755-0 B1**

**(22) Data do Depósito: 21/02/2008**

**(45) Data de Concessão: 14/02/2018**



---

**(54) Título:** SEMENTE REVESTIDA E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA SEMENTE REVESTIDA

**(51) Int.Cl.:** A01C 1/06; A01N 25/26

**(52) CPC:** A01C 1/06,A01N 25/26

**(30) Prioridade Unionista:** 23/02/2007 US 60/903.087, 30/01/2008 US 12/011.819

**(73) Titular(es):** VAMTECH, L.L.C.

**(72) Inventor(es):** DONALD H. MARX; GREGORY KEITH LEWIS

## “SEMENTE REVESTIDA E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA SEMENTE REVESTIDA”

### Reivindicação de Prioridade

[001]O presente pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos número 60/903.087 depositado em 23 de fevereiro de 2007. Todo o conteúdo do pedido foi incorporado ao presente documento como referência.

### Antecedentes da Invenção

#### 1. Campo da Invenção

[002]As modalidades da invenção se referem a uma semente revestida. Modalidades adicionais da invenção se referem a um processo para produção de uma semente revestida. Mais especificamente, as modalidades da invenção se referem a uma semente revestida obtida pelo revestimento de uma semente com um fungicida e pelo menos um formononetinato de metal alcalino e formononetina. Modalidades adicionais podem se relacionar à provisão de uma semente revestida que foi geneticamente construída para produção de uma proteína possuindo atividade fungicida e/ou fungo de micorriza arbuscular vesicular (VAM) que melhora a composição e/ou qualquer outra proteína que confira qualquer outro traço. Os revestimentos da invenção estimulam o crescimento da planta e rendimentos das sementes revestidas por estímulo do crescimento do fungo de micorriza benéfico e impedem o crescimento de outros fungos patogênicos nas raízes. “MYCONATE®” é a marca registrada para preparações de formononetina e/ou formononetinato de potássio. No que se segue, quando o termo MYCONATE® for usado, devemos tomar cuidado para designar quando formononetina ou formononetinato de potássio for usado na preparação em questão. MYCONATE® é uma marca registrada da VAMTech, LLC.

#### 2. Antecedentes

[003]Micorriza é uma relação mutualística, simbiótica entre fungos de solo especial e raízes finas de plantas; não sendo o fungo nem a raiz, porém ao invés disto a estrutura formada destes dois parceiros (Muchovej, R.M. "Importance of Mi-

corrizae for Agricultural Crops" Florida Cooperative Extension Service Bulletin SS-AGR-170 (2001)). Micorriza arbuscular vesicular é um tipo de micorriza no qual os fungos penetram nas células corticais das raízes de uma planta vascular. As micorrizas arbusculares vesiculares são caracterizadas pela formação de estruturas únicas, tais como, arbúsculos e vesículas por fungos do reino *Glomeromycota*. Estes fungos ajudam as plantas a capturar água e nutrientes, tais como, fósforo e micronutrientes do solo. Esta simbiose é uma relação mutualística altamente envolvida entre o fungo e as plantas, a simbiose de planta mais prevalente conhecida (Simon, L. e outros "Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants" *Nature* 363:67-69 (1993)).

[004]É conhecida a ocorrência de micorrizas arbusculares vesiculares em aproximadamente 80% das famílias das plantas vasculares, incluindo colheitas agricolamente importantes (Schussler, A. e outros, "A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution" *Mycological Research* 105(12):1416 (2001)). Nos últimos 40 anos, avanços na fisiologia e ecologia do fungo de micorriza conduziram às aplicações dos fungos de VAM para aperfeiçoar os ecossistemas e produção agrícola. Uma de tais aplicações para aumentar a contribuição desta simbiose nas colheitas anuais é a maximização da atividade dos fungos indígenas através do uso de flavonóides para estimular o crescimento da micorriza arbuscular vesicular (Siqueira, J. O. e outros, "VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce herbicide injury" *Plant and Soil* 134:233- 242 (1991); Siqueira, J. O. e outros, "Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds" *New Phytologist* 118:87-93 (1991)).

[005]Os flavonóides constituem uma ampla classe de metabolitos secundários produzidos por plantas que são geralmente encontradas nas raízes, sementes e vários órgãos de plantas (Graham, T. L. "Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates" *Plant Physiology* 95(2):594-603 (1991)). Um tal flavonóide isolado de raízes de gravo desenvol-

vido sob condições de estresse com fosfato foi identificado e caracterizado como formononetina (4'-metóxi, 7-hidróxi isoflavona) (Nair, M. G. e outros, "Isolation and identification of vesicular-arbuscular micorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots" *Applied and Environmental Microbiology* 52(2):434-439 (1991)). Vários estudos demonstraram que a formononetina estimula a colonização das raízes e/ou formação da hifa e o crescimento de micorrizas arbusculares vesiculares quando aplicada às plantas em concentrações de 4 - 5 mg/L (Nair, M. G. e outros "Isolation and identification of vesicular-arbuscular micorrhiza-stimulatory compounds from trevo (*Trifolium repens*) roots" *Applied and Environmental Microbiology* 52(2):434-439 (1991); Siqueira, J.O. e outros "VA-micorrhizae and micorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce herbicide injury" *Plant and Soil* 134:233-242 (1991); Siqueira, J.O., "Stimulation of vesicular- arbuscular micorrhiza formation and growth of white trevo by flavonoid compounds" *New Phytologist* 118:87-93 (1991); Baptista, MJ. & J.O. Siqueira "Effect of flavonoids on spore germination and asymbiotic growth of the arbuscular micorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*" *Brazilian Journal of Plant Physiology* 6(2): 127- 134 (1994); Koide, R.T, e outros "Strategies for micorrhizal inoculation of six annual bedding plant species" *HortScience* 34(7): 1217-1220 (1999); Davies, F.T. e outros, "Influence of a flavonoid (formononetin) on micorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru" *Scientia Horticulturae* 106:318-329 (2005); Fries, L. L. M. "Influence of phosphorus and formononetin on isozyme expression in the *Zea mays-Glomus intraradices* symbiosis" *Physiologia Plantarum* 103:172-180 (1998); Ozan, A., e outros "Isozyme activity of developing *Trifolium-Glomus* micorrhiza and associated effects of the isoflavona formononetin" *Allelopathy Journal* 3(2):217-228 (1996); Da Silva, J.P. & Siqueira, J.O. "Soil-applied synthetic formononetin stimulates arbuscular micorrhizal formation in corn and soybean" *Brazilian Journal of Plant Physiology* 9(1):35-41 (1997); Da Silva, J.P. & Siqueira, J.O. "Micorrhizal colonization and growth of soybean influenced by different fungal species and application of the isoflavonoid formononetin" *Pesquisa Agropec-*

*uaría Brasileira* 33(6):953-959 (1998). Adicionalmente, vários estudos com formononetina obtiveram aumentos significativos no crescimento da planta e biomassa (Siqueira, J.O., e outros "Stimulation of vesicular-arbuscular micorrhiza formation and growth of white clove by flavonoid compounds" *New Phytologist* 118:87-93 (1991); Davies, F.T. "Influence of arbuscular micorrhizae indigenous to Peru and a flavonoid on growth, yield e leaf elemental concentration of 'Yungay' potatoes" *HortScience* 40(2):381-385) (2005); e reduziram as doenças das plantas (Elmer, W. "Influence of formononetin and NaCl on micorrhizal colonization and Fusarium crown and root rot of asparagus" *Plant Disease* 86(12):1318-1324 (2002)). A denominação química para formononetina é 4'-metóxi, 7-hidróxi isoflavona (Número CAS 485-72-3).

[006]Patentes US números 5.002.603; 5.085.682; e 5.125.955 reportam o emprego de formononetina, um isoflavonóide, como um estimulante para ao crescimento dos fungos de micorriza arbuscular vesicular ("fungos de VAM") nas raízes das plantas que formam a associação de micorriza benéfica. A Patente US número 5.691.275 reporta o emprego de formononetinato de metal alcalino como um estimulante para o crescimento de fungos de VAM. Os fungos de VAM permitem o crescimento melhorado da planta para muitas espécies de planta por aumento da absorção de nutrientes e água, síntese das substâncias que promovem o crescimento, tolerância à estiagem, tolerância à salinidade e ao choque de transplante e interação com outros microorganismos benéficos. (Turk, M. A., e outros, "Significance of Micorrizae" *World J. of Agricultural Sci.* 2(1): 16-20 (2006)).

[007]Vários fungicidas estão disponíveis para uso agrícola e hortícola. Estes incluem, por exemplo, aqueles listados na Tabela 1, que foi obtida em parte da Sweets, L., "Soybean Seed Treatment Fungicides," *Integrated Pest & Crop Management Newsletter* (Univ. of Missouri-Columbia) 16(1) (20 de janeiro de 2006) e em parte da University of Missouri Extension, "Disease Management - Corn" 2005 Missouri Pest Management Guide: Corn, Soybean, Winter Wheat; e University of Missouri Extension, MI 71: 2007 Missouri Pest Management Guide: Corn, Grain

Sorghum, Soybean, Winter Wheat e em parte do conhecimento e experiência pessoal dos inventores. Embora estes artigos foquem fungicidas para soja, milho e trigo de inverno, aqueles fungicidas podem ter emprego como tratamentos para sementes em muitas outras colheitas.

Tabela 1

Ingrediente Ativo	Exemplos de Marcas Registradas de Produtos (Empresas)
Metalaxila	Allegiance Dry (Trace Chemicals LLC) Allegiance-FL (Gustafson LLC) Allegiance-LS (Gustafson LLC)
Mefenoxarn	Apron XL LS (Syngenta)
Azoxistrobina	Protege FL (Gustafson LLC) Dynasty (Syngenta)
Captano	Bean Guard (Trace Chemicals LLC.) Captano 30-DD (Gustafson LLC) Captano 400 (Gustafson LLC) Captano 400 C (Gustafson LLC) Enhance (Trace Chemicals LLC) HiMoly/Captan-D (Trace Chemicals LLC) Rival Flowable (Gustafson LLC) Vitavax M DC (Helena)
Carboxina	Bean Guard (Trace Chemicals LLC) Enhance (Trace Chemicals LLC) Kernel Guard Supreme (Trace Chemicals LLC) RTU-Vitavax-Thiram (Gustafson LLC) VitaFlo-280 (Gustafson LLC) Vitavax CT (Helena) Vitavax M DC (Helena) Vitavax M (Helena) Vitavax-PCNB (Gustafson LLC) Vitavax T-L (Trace Chemicals LLC) Vitavax-200 (Gustafson LLC) Vitavax-34 (Gustafson LLC)
Fludioxonila	Maxim 4FS (Syngenta)

Mancozeb	Dithane DF Rainshield (Dow AgroSciences) Dithane F-45 Rainshield (Dow AgroSciences) Dithane M45 (Dow AgroSciences) Manzate 75 F (Griffin LLC) Manzate 80 WP (Griffin LLC) Manzate Flowable (Griffin LLC) Penncozeb 75 DF (Cerexagri) Penncozeb 80 WP (Cerexagri)
Maneb	Manex (Griffin LLC)
PCNB	Rival Flowable (Gustafson LLC) RTU-PCNB (Gustafson LLC) Vitavax-PCNB (Gustafson LLC)
TBZ (tiabendazol)	LSP (Gustafson LLC) Rival Flowable (Gustafson LLC) RTU Flowable (Gustafson LLC)
Tiram	Protector-D (Trace Chemicals LLC) Protector-L (Trace Chemicals LLC) RTU Flowable (Gustafson LLC) RTU-Vitavax-Tk~iram (Gustafson LLC) Triple Noctin L (Trace Chemicals LLC) 42-S Thiram (Gustafson LLC) Vitaflo-280 (Gustafson LLC) Vitavax CT (Helena) Vitavax M (Helena) Vitavax T-L (Trace Chemicals LLC) Vitavax-200 (Gustafson LLC)
Trifloxiestrobina	Trilex (Gustafson LLC)
Fosetil A1	Alliete Super (Bayer CropScience)
Difenoconazol	Dividend (Syngenta)
Tebuconazol	Raxil T (Bayer CropScience)
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak Concentrate Biological Fungicide (Gustafson LLC) Kodiak Flowable Biological Fungicide (Gustafson LLC) Kodiak HB (Trace Chemicals LLC)
Triadimenol	Baytan 30 (Gustafson LLC)
Difenoconazo + mefenoxam	
Azoxiestrobina + metalaxila	SoyGard (Gustafson LLC)
Captano + carboxina + metalaxila	Bean Guard Allegiance (Trace Chemicals LLC)

Captano + diazinon	Caplan-Diazinon Seed Treater (Trace Chemicals LLC)
Captano + lindano	Sorghum Guard (Trace Chemicals LLC)
Captano + diazinon + lindano	Kernel Guard (Trace Chemicals LLC)
Captano + diazinon + lindano + Metalaxila	Agrox Premiere (Agrilience LLC)
Captano + PCNB + tiabendazol + Metalaxila	Rival Pak (Gustafson LLC)
Carboxina + maneb + lindano	Enhance Plus (Trace Chemicals LLC)
Carboxina + diazinon + lindano	Germate Plus (Trace Chemicals LLC) Kickstart (Helena Chemical Corporation)
Carboxina + metalaxila + imidacloprida	Latitude (Gustafson LLC)
Carboxina + PCNB + metalaxila	Prevail (Trace Chemicals LLC)
Carboxina + permetrina	Kernel Guard Supreme (Trace Chemicals LLC)
Carboxina + tiram	Vitaflo-280 (Gustafson LLC)
Carboxina + tiram + metalaxila	Stiletto (Trace Chemicals LLC) Stiletto Pak (Trace Chemicals LLC)
Cloroneb + mefenoxam	Catapult XL (Agrilience, LLC) Delta Coat XL (Agrilience, LLC)
Cloroneb + metalaxila	Catapult (Agrilience, LLC) Delta-Coat AD (Agrilience)
Mancozeb + lindano	Grain Guard Plus (Trace Chemicals LLC)
Mefenoxam + fludioxonila	ApronMAXX RFC (Syngenta) ApronMAXX RTA (Syngenta) ApronMAXX RTA + moly (Syngenta) Maxim XL (Syngenta) Warden RTA (Agrilience)
Metalaxila + imidacloprida	Concur (Agrilience LLC)
Tiram + metalaxila	Protector-1-Allegiance (Trace Chemicals LLC)

[008]A aplicação de fungicidas às plantas pode estimular o crescimento de plantas por supressão do crescimento de fungos patogênicos indesejáveis e/ou patogênicos, tais como, fuligens, mangras e míldios. Por exemplo, um fungicida pode ser aplicado para suprimir pragas de trigo, fuligens de trigo ou míldio de uva.

[009]Um modo onde o fungicida pode ser aplicado é como um tratamento para sementes. Isto pode ser eficaz, por exemplo, para suprimir o risco causado por deterioração da semente, pragas das sementeiras e mangras nas raízes de determinadas sementes. Os fungos que podem causar este dano incluem, por exemplo, espécies dos seguintes gêneros: *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium* e *Macrophomina*.

[0010]Um efeito fungicida pode também ser obtido pela provisão de uma semente que foi geneticamente construída para a produção de uma proteína que é capaz de reduzir o crescimento de fungos indesejáveis e/ou patogênicos. Tais organismos geneticamente construídos são reportados, por exemplo, em Herrera-Estrella, L. & Simpson, J., "Genetically Engineered Resistance to Bacterial and Fungal Pathogens" *World J. of Micro. & Biotech.* 11(4): 383-392 (2004) e na Patente US número 7.098.378 de Sainz, e outros. Ambos os precedentes sendo incorporados no precedente como referência.

[0011]Raramente, os fungicidas que podem ser aplicados para reduzir, suprimir ou eliminar fungos prejudiciais podem também possuir um efeito adverso no crescimento dos fungos de VAM benéficos. Por exemplo, a aplicação do fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB) foi reportada como diminuindo o comprimento da raiz infectada com VAM de aveias (*Avena sativa*), pelo que reduzindo a absorção de fósforo. (Gnekow, M. A. & Marschner, H., "Influence of the Fungicide Pentachloronitrobenzene on VA-micorrhizal and Total Root Length and Phosphorus Uptake of Oats" *Plant & Soil* 114: 91-98 (1989)). A aplicação do fungicida clorotalonila foi reportada como reduzindo a colonização da micorriza, concentração de fósforo e rendimentos de matéria seca de *Leucaena leucocephala*. (Azis, T., e outros "Inhibition of Micorrhizal Symbiosis in *Leucaena leucocephala* by chlorotalonil" *Plant & Soil* 131(1): 47-52 (1991)).

[0012]O crescimento dos fungos de micorriza arbuscular vesicular, *Glomus mosseae*, foi reportado como sendo afetado por aplicação do fungicida benomila.

(Chiocchio, V., e outros "Effect of the Fungicide Benomila on Spore Germination and Hyphal Length of the Arbuscular Micorrhizal Fungus *Glomus mosseae*" *Int'l Microbiol.* 3:173-75 (2000)). A colonização de raízes de cebola por VAM foi reportada como sendo diminuída pela aplicação do fungicida (Kough, J. L., e outros "Vesicular-arbuscular Micorrhizal Fungi após Fungicide Applications" *New Phytol.* 106: 707-715 (1987)).

#### Sumário da Invenção

[0013]Uma modalidade da invenção provê uma composição de revestimento de semente que melhora o crescimento do fungo de VAM, enquanto suprimindo simultaneamente o crescimento de um ou mais fungos indesejáveis ou patogênicos. Uma modalidade adicional da invenção provê uma semente portando uma composição de revestimento que melhora o crescimento do fungo de VAM e suprime o crescimento de um ou mais fungos indesejáveis ou patogênicos. Ainda outra modalidade da invenção provê uma semente portando uma composição de revestimento que diminui o crescimento de fungos indesejáveis ou patogênicos sem suprimir o crescimento e/ou atividade dos fungos de VAM. Uma modalidade adicional da invenção inclui a provisão de um revestimento sobre uma semente que foi geneticamente modificada para produzir uma proteína que suprime o crescimento de fungos indesejáveis e/ou patogênicos; estes revestimentos incluem uma composição que melhora o crescimento dos fungos de VAM e pode incluir uma composição que elimina o crescimento de fungos indesejáveis e/ou patogênicos, que podem ou não ser os mesmos fungos indesejáveis e/ou patogênicos que são eliminados por proteínas produzidas pela semente.

[0014]Uma modalidade adicional da invenção inclui a provisão de um revestimento em uma semente que foi geneticamente modificada para produzir uma planta que produz uma proteína que melhora o crescimento dos fungos de VAM; estes revestimentos incluem um fungicida e podem incluir uma composição que melhora o crescimento dos fungos de VAM e que é a mesma ou diferente da composição me-

lhoradora de fungos de VAM produzida pela semente geneticamente modificada e/ou planta resultante.

[0015]Processos para provisão de sementes revestidas e processos para revestimento de sementes são também providos no presente documento. As composições usadas nas modalidades da invenção incluem um fungicida e pelo menos um formononetinato de metal alcalino e formononetina.

#### Breve Descrição das Várias Vistas dos Desenhos

[0016]A figura 1 ilustra a eficácia do Myconate em várias taxas de dose na estimulação da colonização das raízes do milho e algodão por fungos de VAM após 8 e 10 semanas de crescimento, respectivamente.

[0017]A figura 2 ilustra resultados experimentais do efeito das combinações de Miconato e fungicidas na germinação e desenvolvimento de fungos de VAM nas sementes de milho tratadas.

[0018]A figura 3 ilustra a biossíntese de formononetina e seus derivados. O diagrama é da International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2004.

[0019]A figura 4 ilustra uma curva de resposta de dose para estímulo de Miconato de colonização do milho por VAM, em estudos laboratoriais de 2007.

#### Descrição Detalhada da Invenção

[0020]Conforme empregado no presente documento, as formas singulares “um, uma” e “o, a” usadas no relatório descritivo e reivindicações incluem ambos o singular e plural, a menos que o conteúdo dite claramente o contrário. Embora modalidades específicas e exemplos da invenção sejam descritos no presente documento, um versado na técnica reconhecerá que inúmeras modificações podem ser feitas sem fugir do espírito e escopo da presente invenção, conforme definido nas reivindicações apensas.

[0021]Composições para revestimento de semente da invenção compreendem, preferivelmente, um fungicida e pelo menos um formononetinato de metal alcalino e formononetina. Outros aditivos também podem estar presentes, conforme dis-

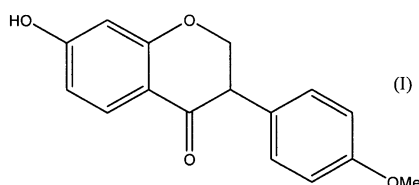
cutido a seguir.

## I. Composições que Melhoram o Crescimento dos Fungos de VAM

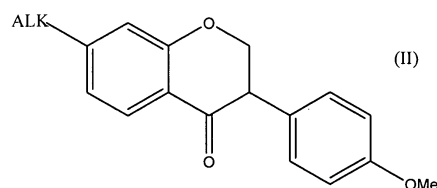
### A. Formononetina e Formononetinatos de Metal Alcalino

[0022]Formononetina e formononetinatos de metal alcalino são contemplados como composições melhoradoras do crescimento de fungo de VAM e são descritos no presente documento.

[0023]A formononetina é um isoflavonóide com a fórmula:



[0024]Um formononetinato de metal alcalino é um isoflavonóide com a fórmula:

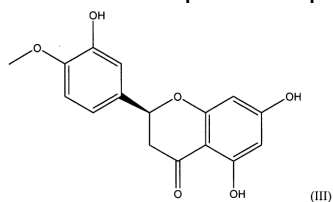


[0025]ALK pode ser lítio, sódio, potássio, rubídio ou césio. Sódio e potássio são preferidos devido às considerações de custo.

[0026]Formononetinato de metal alcalino na solução aquosa (incluindo, por exemplo, em umidade no solo ou em suspensão) altera para forma ácida, a formononetina.

### B. Hesperetina

[0027]A hesperetina é outra composição melhoradora útil do crescimento de fungo de VAM. A hesperetina possui a estrutura:



[0028]As propriedades da hesperetina são reportadas, por exemplo, na Pa-

tente US número 6.831.098 e em Dong, C.J., e outros "Impact of Hesperitin on Infection Hyphal Growth and Enzyme Activity of AM Fungus" *Acta Pedologica Sinica* 43(3): 473-77 (2006); Dong, C.J., e outros "Effect of Flavonoids on AM Fungi and Mycorrhizal Plant" *Mycosystema* 23(2): 294-300 (2004); and Dong, C.J. & Zhao, B., "Interaction between AM Fungi and Rhizobium and Effects of Flavonoids on It" *Yingyong Shengtai Xuebao* 15(9): 1585-1588 (2004).

### C. Isoflavonas e Isoflavonóides

[0029]Isoflavonas (isoflavonóides) podem também ser úteis como composições melhoradas do crescimento de fungo de VAM. As isoflavonas são compostos que possuem estrutura 3-fenilcromen-4-ona. Algumas isoflavonas incluem, por exemplo, porém não estão limitadas à genisteína, daidzeína e gliciteína.

### II. Fungicidas

[0030]Vários fungicidas podem ser usados nas modalidades da invenção. Eles incluem, por exemplo, aqueles classificados e listados pelo Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), FRAC CODE LIST 1: *Fungicides sorted by FRAC Code*, December 2006. Um resumo desta lista incluindo o Código do Grupo FRAC, Denominação do Grupo e Grupo Químico FRAC ou Classe é apresentado abaixo em conjunto com adições com base no conhecimento pessoal e experiência dos inventores.

1. Metil benzimidazol carbamatos (MBC): por exemplo, benzimidazóis, tiofanatos
2. Dicarboximidas
3. Inibidores de desmetilação (DMI) (SBI: Classe I): por exemplo, imidazóis, piperazinas, piridinas, pirimidinas, triazóis
4. Fenilamidas (PA): por exemplo, acilalaninas, oxazolidinonas, butirolactonas
5. Aminas (SBI: Classe II): por exemplo, morfollinas, piperidinas, espirocetallaminas

6. Tiolatos e ditiolanos de fósforo
7. Carboxamidas: por exemplo, benzamidas, carboxamidas de furano, carboxamidas de oxatina, carboxamidas de tiazol, carboxamidas de pirazol, carboxamidas de piridina
8. Hidróxi-(2-amino-) pirimidinas
9. Anilino-pirimidinas (AP)
10. Carbamatos de N-fenila
11. Inibidores externos de quinona (Qol): por exemplo, metoxiacrilatos, metóxi-carbamatos, acetatos de oximino, acetamidas de oximino, oxazolidina-dionas, diidro-dioxazinas, imidazolinonas, benzil-carbamatos
12. Fenilpirróis
13. Quinolinas
14. Hidrocarbonetos aromáticos (AH) e heteroaromáticos I: por exemplo, 1,2,4-tiadiazóis
15. Ácidos cinâmicos
- 16.1. Inibidores da biossíntese da melanina-reductase (MBI-R): por exemplo, isobenzofuranona, pirroloquinolinona, triazolobenzo-tiazol
- 16.2. Inibidores da biossíntese da melanina-desidratase (MBI-D): por exemplo, ciclopropano-carboxamida, carboxamida, propionamida
17. Hidroxianilidos (SBI: Classe III)
18. Hidroxianilidos (SBI: Classe IV): por exemplo, tiocarbamatos, alilaminas
19. Polioxinas: por exemplo, nucleosídeo de peptidil pirimidina
20. Feniluréias
21. Inibidores internos da quinona (Qil): por exemplo, cianoimidazol, sulfamoil-triazóis
22. Benzamidas: por exemplo, toluamidas
23. a 26. Antibióticos: por exemplo, ácido enopiranurônico, hexopiranosila, estreptomina, validamicina

27. Cianoacetamida-oximas
  28. Carbamatos
  29. Dinitrofenil crotonatos; Pirimidinona-hidrazonas e 2,6-dinitro-anilinas
  30. Compostos organo estanho: por exemplo, compostos tri fenil estanho
  31. Ácidos carboxílicos
  32. Heteroaromáticos II: por exemplo, isoxazóis, isotiazolonas
  33. Fosfonatos: por exemplo, etil fosfonatos, ácido fosforoso e sais
  34. Ácidos ftalâmicos
  35. Benzotriazinas
  36. Benzeno-sulfonamidas
  37. Piridazinonas
  38. Tiofeno-carboxamidas
  39. Pirimidinamidas
  40. Fungicidas CAA (Amidas do ácido carboxílico): por exemplo, amidas do ácido cinâmico, valinamida carbamatos, amidas do ácido mandélico
  41. Tetraciclina
  42. Tiocarbamato
  43. Benzamidas: por exemplo, acilpicolides
- Código P. Indutores de defesa em planta hospedeira: por exemplo, BTH benzo-tiadiazol, benzisotiazol, tiadiazol-carboxamidas, proteínas harpinas
- Código U. Materiais não classificados: por exemplo, tiazol carboxamida, fenil-acetamida, quinazolinona, benzofenona
- Código M. Materiais de contato de múltiplos sítios: por exemplo, sais de cobre, enxofre, ditiocarbamatos e correlatos, ftalimidas, cloronitrilas (ftalonitrilas), sulfamidas, guanidinas, triazinas, quinonas (antraquinonas)
- Código N. Materiais não classificados: por exemplo, óleos minerais, óleos orgânicos, bicarbonato de potássio, materiais biológicos
- [0031]Os versados na técnica reconhecerão que o uso de outros fungicidas

também é possível em várias modalidades da invenção e a falha na listagem de um fungicida específico ou classe fungicida no presente documento não implica em limitação das reivindicações. Os fungicidas que de outra forma, não são usados com composições que melhoram o crescimento do fungo de VAM, porque eles suprimem o crescimento do fungo de VAM podem também ser usados nas modalidades da invenção; em tal caso, o benefício da invenção é que o efeito prejudicial de tais fungicidas no fungo de VAM pode ser reduzido. Estes fungos podem incluir, por exemplo, pentacloronitrobenzeno, clorotalonila e benomila.

[0032]Algumas modalidades da invenção incluem um ou mais fungicidas selecionados do grupo incluindo benomila, 2-(tiocianatometil)-1,3-benzotiazol, carbendazim, fuberidazol, tiabendazol, tiofanato, tiofanato-metila, clozolinato, iprodiona, procimidona, vinclozolina, imazalil, oxpoconazol, pefurazoato, procloraz, triflumizol, triforina, pirifenox, fenarimol, nuarimol, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, epoxiconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanila, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, benalaxila, furalaxila, metalaxila, metalaxila-M (mefenoxam), oxadixila, ofurace, aldimorf, dodemorf, fenpropimorf, tridemorf, fenpropidina, piperalina, espiroxamina, edifenfos, iprobenfos, (IBP), pirazofos, isoprotiolo, benodanila, flutolanila, mepronila, fenfuram, carboxina, oxicarboxina, tifulzamida, furametpir, pentiopirad, boscalid, bupirimato, dimetirimol, etirimol, ciprodinila, mepanipirim, pirimetanila, dietofencarb, azoxistrobina, estrobilurinas, enestrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, cresoxim-metila, trifloxistrobina, dimoxistrobina, metominostrobin, orisastrobina, famoxadona, fluoxastrobina, fenamidona, piribencarb, fenpiclonila, fludioxonila, quinoxifeno, bifenila, cloroneb, dicloran, quintozeno, (PCNB), tecnazeno, (TCNB), tolclofos-metila, etridiazol, etazol, ftalido, piroquilon, triciclazol, carpropamida, diclocimet, fenoxanila, fenexamida, piributicarb, naftifina, terbinafina, polioxina, pencicurona, ciazofamida, amisulbrom, zoxamida, blastidina-S, casuga-

micina, estreptomicina, validamicina, cimoxanila, iodocarb, propamocarb, protiocarb, binapacril, dinocap, ferimzona, fluazinam, acetato de fentina, cloreto de fentina, hidróxido de fentina, ácido oxolínico, himexazol, octilinona, fosetil-Al, ácido fosforoso e sais, tecloftalam, triazoxido, flusulfamida, diclomezina, siltiofam, diflumetorim, dime-tomorf, flumorf, bentiavalicarb, iprovalicarb, valifenal, mandipropamida, oxitetraciclina, metassulfocarb, fluopicolida, acibenzolar-S-metila, probenazol, tiadinila, isotiani-la, etaboxama, ciflufenamida, proquinazida, metrafenona, cobre (diferentes sais), enxofre, ferbam, mancozeb, maneb, metiram, propineb, tirama, zineb, ziram, capta-no, captafol, folpet, clorotalonila, diclofluanida, tolilfluanida, dodina, guazatina, imino-ctadina, anilazina, ditianon, óleos minerais, óleos orgânicos, bicarbonato de potás-sio, tridemorf anilino-pirimidinas, antibióticos, cicloeximida, griseofulvina, dinitrocona-zol, etridazol, perfurazoato, 5-Cloro-7-(4-metil-piperidin-1-il)-6-(2, 4, 6-trifluór-fenil)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidina, 2-Butóxi-6-iodo-3-propil-cromen-4-ona, Dimetilamida do ácido 3-(3-bromo-5-flúor-2-metil-indol-1-sulfonil)-[1,2,4]triazol-1-sulfônico, nabam, metam, policarbamato, dazomet, 3-[5-(4-Cloro-fenil)-2,3-dimetil-isoxazolidin-3-il]-piridina, calda bordalesa, acetato de cobre, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre, sulfato de cobre básico, derivados de nitrofenila, dinobuton, fenilpirróis de nitroftali-sopropila, enxofre, compostos organometálicos de enxofre, ftalido, toloclofos-metila, N-(2-{4-[3-(4-Cloro-fenil)-prop-2-inilóxi]-3-metóxi-fenil}-etil)-2-metanossulfonil-amino-3-metil-butiramida, N-(2-{4-[3-(4-Cloro-fenil)-prop-2-inilóxi]-3-metóxi-fenil}-etil)-2-etanossulfonil-amino-3-metil-butiramida; (2-Ciano-fenil)-amida do ácido 3,4-dicloro-isotiazol-5-carboxílico, flubentiavalicarb, Éster metílico do ácido 3-(4-cloro-fenil)-3-(2-isopropoxicarbonil-amino-3-metil-butiril-amino)-propiónico, Éster metílico do ácido {2-cloro-5-[1-(6-metil-piridin-2-ilmetoxiimino)-etil]-benzil}-carbâmico, Éster metílico do ácido {2-Cloro-5-[1-(3-metil-benziloxiimino)-etil]-benzil}-carbâmico, hexaclorobenzeno amidas da fórmula que se segue na qual X é CHF<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>; e R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> são indepen-dentemente halogênio, metila ou halometila; enestroburina, derivados de ácido sul-fênico, cinemamidas e análogos, tais como, fungicidas de flumetover amida, tais co-

mo, ciclofenamida ou (Z)-N-[a-(ciclopropilmetoxiimino)-2,3-diflúor-6-(difluorometoxi)benzil]-2-fenilacetamida; tiabendazol, trifumizol.

[0033]Modalidades preferidas da invenção incluem um ou mais dos fungicidas da tabela 2.

TABELA 2

Ingrediente ativo	Número CAS	Código EPA - PC
Substância química		
Azoxistrobina	131860-33-8	128810
Benomila	17804-35-2	099101
Captano	133-06-2	081301
Carbendazima	10605-21-7	128872
Carboxamida/Anilida	188425-85-6	128008
Carboxina	5234-68-4	090201
Cloroneb	2675-77-6	027301
Clorotalonila	1897-45-6	081901
Cobre (e sais)	7440-50-8 (e vários)	022501 (e vários)
Dicloran	99-30-9	031301
Difenoconazol	119446-68-3	128847
Etazol/Etridiazol	2593-15-9	084701
Fenpropimorf	67306-03-0167564-91-4	121402
Fludioxonila	131341-86-i	071503
Fluoxastrobina	361377-29-9	128869
Fluquinconazol	136426-54-5	-----
Flutriafol	76674-21-0	128940
Fosetil A1	39148-24-8	123301
Proteínas harpinas	-----	006477/006506
1-lexaconazol	79983-71-4	128925
Himexazol	10004-44-1	129107
Imazalila	35554-44-0	111901
Ipconazol	125225-28-7	125618
Iprodiona	36734-19-7	109801
Casugamicina	19408-46-916980-18-3	230001
Mancozeb	8018-01-7	014504
Maneb	12427-38-2	014505
Mefenoxam	70630-17-0	113502
Metalaxila	57837-19-1	113501
Miclobutanila	88671-89-0	128857
Oxadixila	77732-09-3	126701
PCNB	82-68-8	056502
Ácido fosforoso	13598-36-2	076002
Propiconazol	60207-90-1	122101
Protiocarb	19622-19-6	-----
Protioconazol	178928-70-6	113961
Piraclostrobina	175013-18-0	099100
Siltiofam	175217-20-6	-----
Sulfato de estreptomicina	3810-74-0	006310
Estrobilurinas - outras	vários	vários
Enxofre	7704-34-9	077501
TBZ (tiabendazol)	148-79-8	060101
TCMTT3	21564-17-0	035603

Tebuconazol	107534-96-3	128997
Dissulfeto de tetrametiltiurama (Tiram)	137-26-8	079801
Tiofanato de metila e etila	23564-05-8	102001
Triadimeno!	55219-65-3	127201
Triazóis – other	vários	vários
Tri floxistrobina	141517-21-7	129112
Triticonazol	131983-72-7	125620
Validamicina	37248-47-8	-----
Zineb	12122-67-7	014506
Ziram	137-30-4	034805
Biológico:		
Espécies <i>Bacillus</i>	-----	-----
Espécies <i>Pseudomonas</i>	-----	-----
Espécies <i>Streptomyces</i>	-----	-----
Espécies <i>Trichoderma</i>	-----	-----

### III. Aditivos Adicionais

[0034]As composições de revestimento de semente da invenção podem incluir ingredientes biologicamente ativos diferentes de formononetina, formononetinato de metal alcalino, ou fungicidas. Outros ingredientes ativos podem incluir, porém não estão limitados aos ativadores de genes de planta, ativadores de resistência sistêmica da planta, repelentes de animais, fertilizantes, herbicidas (quando a semente for resistente a tal herbicida), inseticidas (incluindo, porém não limitado as inseticidas das classes que se seguem: produtos biológicos/de fermentação (tais como, avermectina; *Agrobacterium radiobacter*; cepas *Bacillus* (incluindo, por exemplo, *Bacillus thuringiensis*); *Burkholderia cepacia*; cepas *Pseudomonas*; cepas *Trichoderma*; cepas *Streptomyces* ou espinosad), carbamatos (tais como, aldicarb), cloronicotinilas (tais como, imidacloprida), diacilidrazinas (tal como tebufenozida), neonicotinóides (tal como, clotianidina), nitroguanidinas (tal como nidinotefurano), organofosfatos (tal como diazinon), derivados de oxadiazina (tal como indoxacarb), fenil pirazonas (tal como fiprinol), outras pirazonas (tal como tebufenpirad), piretrinas (tal como piretrum), pirróis (tal como clorfenapir), piretróides sintéticos (tal como, cialotrina lambda), tianicotinilas (tal como, tiametoxam) e triazóis (tal como, triazamato), umectantes, inoculantes microbianos, micronutrientes, nematicidas, agentes osmóticos, reguladores do crescimento de plantas, promotores do crescimento de plantas e

géis de absorção de água.

[0035]Além dos ingredientes biologicamente ativos, as composições de revestimento de semente podem incluir muitos materiais e aditivos que tanto fazem parte das formulações do ingrediente ativo ou contribuem para as qualidades de manuseio do revestimento da semente ou sua funcionalidade e durabilidade na semente. Um exemplo de um aditivo de revestimento é um polímero de revestimento que liga os ingredientes ativos à semente. Os polímeros de revestimento de semente podem incluir, por exemplo, porém não estão limitados às proteínas, polissacarídeos, poliésteres, poliuretanos, polímeros preparados de monômeros insaturados e suas combinações. Um polímero de revestimento de semente preferido é o polímero de revestimento de semente solúvel, aquoso, conhecido como Seedkare® Polykote disponível na Becker Underwood Inc.

[0036]Outros aditivos que contribuem para as qualidades de manuseio do revestimento de semente ou sua funcionalidade e durabilidade na semente incluem, porém não estão limitados aos agentes tensoativos, agentes sequestrantes, plastificantes, corantes, abrillantadores, emulsionantes, agentes de escoamento, agentes coalescentes, agentes desespumantes, espessantes, ceras, bactericidas, cargas, polímeros, agentes umectantes e agentes anticongelamento. A natureza e ação de tais aditivos é bem conhecida dos versados na técnica de formulação. Os aditivos não devem interferir com a ação da formononetina, formononetinato de metal alcalino, ou fungicida ou qualquer outro componente biologicamente ativo conforme listado acima.

[0037]Informações adicionais nas técnicas de tratamento de sementes, metodologia e aditivos podem ser encontradas, por exemplo, nas publicações que se seguem todas as quais sendo incorporadas no presente documento como referência: Publicação do Pedido de Patente US número 20020115565, de Asrar, e outros; M. Newman, University of Tennessee at Knoxville, "Pesticide Applicator Training: Category 4, Seed Treatment"; Paulsrud, e outros, Univ. of Illinois, "Oregon Pesticide

Applicator Training Manual: Seed Treatment" 2001; Lipps, e outros, Ohio State University Extension, Bulletin 639-98, "Seed Treatment for Agronomic Crops"; "Iowa Commercial Pesticide Applicator Manual: Seed Treatment" Iowa State Univ. Extension (Feb. 1999); "Pesticide Application Training: Seed Treatment" Kansas State Univ. Ag. Experiment Station & Cooperative Extension Service (Sept. 1998); "CSS 460/560 Seed Production: Seed Treatment" Oregon State Univ. Crop & Soil Science (undated); Mathre, e outros "Small Grain Cereal Seed Treatment," Plant Health Instructor (2006); "Seed Treatment: A Tool for Sustainable Agriculture" Seed Treatment and Environment Committee of the Int'l Seed Trade Federation (1999).

#### IV. Sementes

[0038]Virtualmente, qualquer semente é útil nas modalidades da invenção. As sementes preferidas são de plantas que recebem algum benefício de terem crescido na presença de fungos de VAM e especificamente, as sementes preferidas também possuem algum valor agrícola. As sementes podem ser selecionadas, por exemplo, de colheitas cruas, incluindo milho, soja, algodão, girassol, amendoim e outros; o grupo de cereais incluindo trigo, aveia, cevada, arroz, sorgo e outros; forragem e colheitas de forragem, tais como, alfafa, as gramas de forragem e outras; colheitas de campo como batatas (significando, neste caso e em outros, batata doce, os "tubérculos" semente usados para plantar uma colheita, bem como semente verdadeira conforme usada na reprodução e propagação), tabaco, feijões de campo e feijões comestíveis tais como, feijão malhado, feijão branco, feijão-de-lima e outros), ervilhas, grão-de-bico, lentilhas e outros, as colheitas de vegetais, tais como, tomate, cucúrbitas, pepinos, cebolas, cenouras, aipos, alface e outras sementes de vegetais não brassicáceas, mais gramas de turfa, sementes de flores e sementes de outras espécies ornamentais. As sementes preferidas para uso na invenção incluem milho, soja, algodão, girassol, alfafa e trigo mais outros grãos pequenos em conjunto com legumes, batatas, conforme definido e descrito acima, sementes de vegetais não brassicáceas, sementes de grama de turfa e forragem e sementes de flores.

[0039]Será entendido que “semente” conforme empregada através de toda esta revelação e reivindicações pode ser interpretada como sendo uma semente de uma planta nativa, planta híbrida, uma planta transgênica ou geneticamente modificada ou uma combinação destas. Os versados na técnica reconhecerão que a maioria das sementes de soja, algodão e milho correntemente em uso na agricultura é transgênica para um ou mais traços desejáveis. Portanto é esperado que as sementes revestidas de acordo com a invenção portem vários traços além daqueles discutidos como tendo sido conferidos no presente documento. Adicionalmente, será entendido que, quando uma semente é discutida no presente documento como tendo sido geneticamente modificada para portar um traço adicional (tal como, por exemplo, a capacidade de produzir um fungicida e/ou isoflavona), aquela modificação não exclui modificação genética anterior ou subsequente da semente para outros traços.

[0040]Em uma modalidade da invenção, a semente foi construída para incluir pelo menos um gene heterólogo codificando uma proteína que é fungicidamente ativa; isto é, que suprime o crescimento de um fungo indesejado ou patogênico. A proteína pode ser liberada pela semente e/ou planta resultante em qualquer tempo no desenvolvimento da planta.

[0041]Quando a semente a ser revestida codifica uma proteína que é fungicidamente ativa, o revestimento pode incluir ambos um fungicida e uma composição que encoraja o crescimento do fungo de VAM. O revestimento pode incluir uma composição que encoraja o crescimento do fungo de VAM. Quando o revestimento não inclui um fungicida, a função fungicida é realizada como um resultado da proteína codificada por um gene heterólogo.

[0042]Quando o revestimento não inclui um fungicida, a atividade do fungicida resultante pode reduzir o crescimento do mesmo fungo como o fungicida no revestimento ou um fungo diferente como o fungicida no revestimento. Exemplos de sementes transgênicas incluindo genes heterólogos que codificam proteínas possuindo atividade fungicida que podem ser revestidas de acordo com a invenção in-

cluem, porém não estão limitadas aquelas reveladas na Patente US número 7.098.378; Publicação do Pedido de Patente US número 20030172396; Balasubramanian, P., "Biotechnology in Plant Disease Control," Tamil Nadu Ag. Univ. (2005); Krishnamurthy, K., e outros, "Wheat Puroindolines Enhance Fungal Disease Resistance in Transgenic Rice" MPMI 14(10): 1255-1260 (2001); e AgrEvo Pty Ltd Press Release, "PR-93: Development of Fungal Disease Resistant Canola Cultivars" (1998), todos os quais são incorporados ao presente documento como referência.

[0043]Em uma modalidade adicional da invenção, a semente pode incluir pelo menos um gene heterólogo codificando uma proteína que aumenta ou permite a produção de uma composição que encoraja o crescimento do fungo de VAM. Por exemplo, um crescimento de planta transgênica de uma semente transgênica pode produzir uma quantidade melhorada de formononetina e/ou hesperetina em comparação a uma planta não transgênica das mesmas espécies. Em outra modalidade, a produção de formononetina e/ou hesperetina ocorre constitutivamente. A formononetina e/ou hesperetina pode ser produzida em qualquer estágio do ciclo de vida da planta e não está limitada a um ciclo de vida simples.

[0044]Quando a semente a ser revestida codifica uma proteína que aumenta ou permite a produção de uma composição que encoraja o crescimento do fungo de VAM, o revestimento pode incluir ambos um fungicida e uma composição que encoraja o crescimento do fungos de VAM ou o revestimento pode incluir um fungicida sem uma composição compatível que encoraja o crescimento do fungo de VAM. Quando o revestimento não inclui uma composição que encoraja o crescimento do fungo de VAM, a função é realizada pela proteína codificada pelo gene heterólogo. Se o revestimento incluir uma composição que melhora o crescimento do fungo de VAM, esta pode ser a mesma ou diferente que a(s) composição(ões) produzida(s) pela semente transgênica e/ou planta. Princípios que podem ajudar no entendimento desta modalidade da invenção são apresentados em Nair, M. G., e outros, "Isolation and Identification of Vesicular-Arbuscular Micorrhiza-Stimulatory Compounds from

Trevo (*Trifolium repens*) Roots" *App. & Env. Microbiol.* 57(2): 434-439 (1991); Deavours, B. E. & Dixon, R. A., "Metabolic Engineering of Isoflavonoid Biosynthesis in Alfalfa" *Plant Physiology* 138: 2245-2259 (2005), ambos sendo incorporados ao presente document como referência.

[0045]As composições que melhoram o crescimento do fungo VAM incluem, por exemplo, formononetina, formononetinato alcalino e hesperetina. As sementes que produzem um ou mais destes compostos podem ser contempladas pelos versados na técnica em o benefício desta revelação. A formononetina é uma isoflavona. Conforme reportado na Patente US número 6.146.668, as isoflavonas são amplamente distribuídas no reino vegetal, porém são encontradas predominantemente nos legumes, com as fontes mais ricas sendo os trevos e soja. A biossíntese da formononetina e outros isoflavonóides foi reportada conforme mostrado na figura 3.

[0046]A produção de formononetina e outros isoflavonóides nas culturas de célula em suspensão foi reportada. Arias-Castro, C, e outros, "The effect of cultural conditions on the accumulation of formononetin by suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*" *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 34(1): 0167-6857 (1993). A produção de formononetina e outras isoflavonas no calo foi também reportada. Mitsugu, K., e outros, "Formation of Chalcones and Isoflavones by Callus Culture of *Glycyrrhiza uralensis* with Different Production Patterns" *Chem. & Pharm. Bulletin*, The Pharmaceutical Society of Japan 33(9): 3811-16 (1985); Fedoreyev, S.A., e outros "Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*" *Fitoterapia* 71(4): 365-72 (2000); vide também Jedinak, A., e outros "Approaches to Flavonoid Production in Plant Tissue Cultures" *Biologia, Bratislava* 59(6): 697-710 (2004).

[0047]A produção dos compostos relacionados à formononetina já foi obtida. Por exemplo, a genisteína foi produzida nas folhas de alfafa. Deavours, B.E. & Dixon, R. A., "Metabolic Engineering of Isoflavonoid Biosynthesis in Alfalfa" *Plant Phys.* 138: 2245-59 (2005). Embora não previamente contemplado, os princípios usados em Deavours em qualquer lugar podem ser estendidos e modificados para prover

sementes produzindo formononetina e hesperetina que podem ser revestidas conforme estabelecido no presente documento.

#### V. Quantidades de Ingrediente

[0048]Os versados na técnica reconhecerão que a quantidade de fungicida e a quantidade de formononetina e/ou formononetinato alcalino que é usada para revestir uma população de sementes variará com base no tamanho da semente e a taxa ativa eficaz do fungicida, formononetina e/ou formononetinato alcalino para aquela semente.

[0049]Uma quantidade típica de formononetina e/ou formononetinato alcalino para uso em um revestimento da invenção é uma quantidade que provê uma taxa de tratamento eficaz superior a cerca de 6 g do ingrediente ativo por acre. Por exemplo, para o milho, a quantidade de formononetina eficaz para revestir várias sementes para plantio em um acre é de cerca de 15-25 g. A quantidade de formononetinato alcalino eficaz para revestir várias sementes para plantio em um acre de milho é de cerca de 24 g.

[0050]O cálculo que se segue pode ser aplicado para determinar a quantidade de formononetina e/ou formononetinato alcalino (“Ativo”) a ser aplicado por semente: milho: taxa de plantio típica de 30.000 sementes por acre, taxa ativa necessária por acre = 24 g; assim a taxa de aplicação necessária é de 0,8 mg por semente. Soja: taxa de plantio típica de 150.000 sementes por acre, taxa ativa necessária por acre = 24 g; assim a taxa de aplicação necessária é de 0,16 mg por semente. Trigo e outras colheitas de cereais de grãos pequenos como aveia e cevada: taxa de plantio típica de 1.000.000 sementes por acre, taxa ativa necessária por acre = 32 g, assim a taxa de aplicação necessária será de 0,032 mg por semente. Vegetais: taxas de plantio expressas como sementes por acre variam muito, a taxa ativa necessária por acre = 40 g; assim a taxa de aplicação é ajustada para aplicar 40 g de ativo igualmente nas sementes necessárias para plantio em um acre. A taxa de aplicação do produto durante o tratamento da semente pode ser calculada como se segue:

[0051]Determina por experimentação ou de dados publicados o número médio de sementes presentes em uma quantidade de 45,36 kg de sementes (um padrão útil para milho é de 175.000 sementes por 45,36 kg). Com base na taxa necessária de Ativo por semente (0,8 mg/semente) calcule a quantidade de Ativo necessária por 45,36 kg de semente ( $0,8 \times (175.000/1.000)$ ) – 140 g. Então com base na quantidade de Ativo presente na formulação de revestimento (por exemplo, 35% peso/peso) calcule a quantidade de produto necessária a ser adicionada a 45,36 kg de sementes ( $140/0,35 = 400$  g). Usando a gravidade específica da formulação (neste exemplo 1,1 g por litro) podemos expressar a quantidade necessária do produto como um volume (neste caso, 363,6 mL). Calibrar o equipamento de revestimento de semente para distribuir esta quantidade desejada do produto a 45,36 kg de sementes. Para soja e trigo, o cálculo equivalente resulta em uma taxa de uso de 363,6 mL por 45,36 kg de sementes, respectivamente.

[0052]Os fungicidas para tratamento das sementes estão disponíveis comercialmente com uma taxa de aplicação de revestimento de semente recomendada. Em um exemplo, no fungicida Maxim XL (Syngenta), a taxa recomendada para tratamento da semente do milho no campo é expressa como 4,94 mL por 45,36 kg de semente ou 2,22 mL por 80.000 sementes ou 0,009 mg por semente. Um exemplo de uma formulação para formononetina é mostrada na Tabela 3 em conjunto com a quantidade de cada ingrediente que tipicamente seria aplicada ao milho por semente, por 45,36 kg de sementes, por 80.000 sementes e uma base por acre (30.000 sementes). Também é mostrada a quantidade de fungicida aplicada em cada momento.

Tabela 3

Produto: Myconate FS350 (350 g de Ativo por kg de produto)

Aplicação ao milho em 24 g/acre ou 0,8 mg/semente

Ingredientes	Comentário	Peso (%)	mL por 45,36 kg de se-	mL por 36,29 kg de se-	mg por semente	g por acre

			mentes	mentes		
Formononetina	ativo	35,00	127,17	58,26	<u>0,80</u>	<u>24,00</u>
Yuccah	Agente tensoativo	0,50	1,77	0,88	0,01	0,34
Polykote	polímero	12,50	45,54	20,70	0,29	8,57
Bicarbonato de sódio	Ajuste do pH	0,39	1,48	0,59	0,01	0,27
Acticida	biocida	0,06	0,29	0,00	0,00	0,04
Corante	Indicador de uso	14,00	50,87	23,36	0,32	9,60
Água	diluyente	37,55	136,63	62,40	0,86	25,75
			<u>363,75</u>	<u>166,20</u>	2,29	68,57
Gravidade Sp.: 1,1 g por mL						
Maxim XL (fungicida: seguir instruções de uso)			4,94	2,22	0,009	0,27

#### VI. Aplicação da Semente

[0053]Uma vez que as taxas desejadas de aplicação do Ativo e fungicida são conhecidas, ambas como quantidades por 45,36 kg, os materiais podem então ser aplicados. As aplicações do Ativo e fungicida e quaisquer outros tratamentos podem ser realizadas sucessiva, simultaneamente ou usando uma mistura da formulação do Ativo e da formulação do fungicida. Sob aplicações sucessivas, o fungicida é preferivelmente aplicado primeiro (para permitir liberação rápida do Ativo da camada de revestimento externa no solo) e então após o revestimento de semente fungicida ser seco, as sementes são revestidas novamente com o produto Ativo. Em aplicação simultânea os tratamentos com Ativo e fungicida são aplicados ao mesmo tempo usando o mesmo equipamento, porém cada produto é liberado através de bombas separadas e tubulações de liberação e não se misturam até encontrarem as sementes.

[0054]Em uma aplicação de mistura de produto, os produtos Ativo e fungicida são misturados em conjunto, com ou sem diluição conforme necessário e liberados em conjunto para a semente usando uma bomba e uma tubulação de liberação.

Nos métodos de combinação, alguns componentes do revestimento são aplicados sucessivamente, enquanto outros são aplicados simultaneamente ou em co-formulação. Antes da mistura do Ativo com qualquer produto fungicida é necessário determinar, através de experimentação, se o produto possui efeitos negativos nos outros com relação às propriedades físicas, químicas ou biológicas.

#### Exemplos

[0055]Os exemplos que se seguem se destinam a guiar os versados na técnica na prática desta invenção. Eles não devem ser tidos como limitando o escopo da invenção que é definido pelas reivindicações.

#### Exemplo 1: Estudos Laboratoriais (2006)

[0056]O Exemplo 1 descreve estudos experimentais realizados na primavera e verão de 2006 para avaliar os efeitos de diferentes revestimentos fungicidas comerciais de sementes no desenvolvimento de VAM em sementeiras de milho germinadas na presença e ausência de formononetinato alcalino. Todos os revestimentos de semente de milho foram realizados pela Sub-Sahara International, Inc. (agora adquirida pela Becker Underwood Inc.) empregando procedimentos de revestimento padrão. O tratador empregado era uma máquina para revestimento de semente giratória RP-14 fabricada pela Sedpell no Canadá. Foram feitas aplicações sucessivas de fungicidas que foram aplicados primeiro de acordo com as instruções do rótulo; então quando as sementes estavam secas elas foram revestidas em excesso com formononetinato alcalino (potássio).

[0057]Os fungicidas listados foram aplicados nas quantidades fornecidas na Tabela 4. Os fungicidas foram aplicados como formulações em suspensão líquida, de alta viscosidade de acordo com as instruções de uso nos respectivos rótulos.

Tabela 4

Fungicida	Taxa de aplicação empregada: (g, isto é por 45,36 kg de semente de milho)	Faixa de taxas de uso e comentários

Maxim ML	1,134 g de fludioxonila mais 0,4536 g de mefenoxam	Qualquer taxa de uso recomendada para este material na colheita de interesse
Apron XL LS	0,904 g mefenoxam	Qualquer taxa de uso recomendada para este material na colheita de interesse
Allegiance LS	3,816 g de metalaxila	Qualquer taxa de uso recomendada para este material na colheita de interesse
Dynasty	0,450 g de azoxistrobina	Qualquer taxa de uso recomendada para este material na colheita de interesse

[0058]O revestimento com polímero usado para o revestimento com formononetinato alcalino era Seedkare® Polykote. Seedkare® Polykote é uma emulsão polimérica líquida para revestimento de semente (denominação química: copolímero de álcool polivinílico acrílico). Este polímero pode ser misturado na planta de tratamento com corantes Seedkare® e pigmento de brilho Seedkare® para fornecer ao operador maior flexibilidade nas variadas taxas de componentes com economia de custos. Isto fornece excelente capacidade de ligação e controle do pó quando substâncias de tratamento de semente em pó mais antigas são empregadas.

[0059]O formononetinato alcalino foi dissolvido em água e Polykote adicionado de acordo com as taxas que se seguem em peso: água - 70 partes; formononetinato alcalino - 45 partes; Polykote - 20 partes.

[0060]A germinação da semente e os testes de desenvolvimento de VAM foram realizados em uma estufa no Formosa Agricultural and Environmental Research Center, LaWard, TX.

[0061]Os testes de porcentagem de germinação foram realizados com 40 sementes em papel umectado a 28 °C após dois dias.

[0062]A porcentagem de desenvolvimento de VAM foi determinada, dentro de 3 semanas de tratamento, em 5 plantas de milho com 6 semanas de vida (das sementeiras) por tratamento, plantadas em solo de pote estéril contendo 95 esporos de um coquetel de fungos de VAM de quatro espécies em concentração de P baixa. Originalmente, 10 plantas por tratamento foram instaladas em 30 ml de células Spe-

edling® e após 10 dias, 5 foram transplantadas para recipientes de 1 litro. Os resultados são conforme mostrados na Tabela 5:

Tabela 5: Germinação das sementes e desenvolvimento de V das sementes de milho revestidas com polímero Seedkare® Polykote, formononetinato alcalino e diferentes fungicidas de revestimento de semente comerciais aplicados em taxas recomendadas. Formononetinato alcalino foi fabricado pela SK Energy and Chemical, South Korea e distribuído no começo de 2006.

Fungicida	mg formononetinato alcalino/semente	% de germinação	% de VAM
Nenhum	Nenhum	92	54
Nenhum	0,5	93	61
	1,0	93	66
Maxim XL	0,5	98	70
	1,0	98	79
Apron XL	0,5	88	69
	1,0	83	72
Allegiance	0,5	90	72
	1,0	98	78
Dynasty	0,5	79	65
	1,0	75	68

[0063]Germinação da semente A germinação da semente esteve acima de 90% para todos os tratamentos exceto para aqueles tratados com Apron e Dynasty. Dynasty reprimiu consistentemente a germinação da semente neste teste. Parece que Maxim em ambas as taxas de formononetinato alcalino e Allegiance a 1,0 mg formononetinato alcalino/semente aperfeiçoou a germinação da semente de 93 a 98%. A germinação total da semente não foi afetada pela taxa baixa (87%) em comparação à taxa alta (89%) de formononetinato alcalino/semente.

[0064]Desenvolvimento de VAM – Os efeitos dos fungicidas no desenvolvimento de VAM foram intessantes. Quando comparado aos controles (sem fungicidas), todos os fungicidas tiveram um efeito levemente aperfeiçoado no desenvolvimento de VAM. Também houve um efeito consistente da taxa de formononetinato

alcalino no desenvolvimento de VAM. Formononetinato alcalino a 1,0 mg/semente ponderou em 73% e formononetinato alcalino a 0,5 mg ponderou a 67% de VAM; sem tratamento de formononetina alcalina o nível de VAM de base foi de apenas 54%. O fato de que os fungicidas propriamente tiveram algum efeito positivo em VAM, embora nem tanto quanto o tratamento com formononetina alcalino é explicável pelo que a remoção dos organismos patogênicos pode ter removido quaisquer efeitos competitivos que estes foram tendo nos organismos de VAM.

[0065]Os resultados indicam que os fungicidas comerciais mais usados de modo geral em taxas recomendadas nas sementes não suprimiram o desenvolvimento de VAM no milho. Também, a alta taxa de formononetinato alcalino (1 mg/semente) produziu mais desenvolvimento de VAM que a taxa mais baixa (0,5 mg/semente).

#### Exemplo 2: Estudos Laboratoriais (2007)

[0066]No estudo reportado no Exemplo 1, foi estabelecido que alguns fungicidas comerciais usados comumente em taxas recomendadas sobre as sementes não inibiram os efeitos estimuladores do Myconate no desenvolvimento de VAM das plantas de milho desenvolvidas de sementes tratadas com fungicidas. Também, a taxa maior de formononetinato alcalino produziu mais desenvolvimento de VAM que a taxa mais baixa.

[0067]Estudos adicionais foram realizados em 2007 para determinar primeiro, se as taxas superiores a 1 mg/semente de formononetinato de potássio na presença de fungicidas de revestimento de semente, produzem mesmo taxas maiores de colonização de VAM que as vistas nos estudos de 2006; e em segundo lugar para determinar se a formononetina ácida insolúvel aquosa apresenta a mesma atuação que o sal de potássio.

[0068]Métodos: Este estudo foi conduzido entre fevereiro-abril de 2007 em uma estufa no

[0069]Formosa Agricultural and Environmental Research Center using hybrid

corn plants (*Zea mays* L.) var. Beck's Hybrids 5959 (HB) e Dow/Mycogen 2D675 (PG). A semente de milho híbrido foi adquirida de fontes comerciais e foi pré-tratada com um dos dois tratamentos de semente fungicida/inseticida. A variedade HB foi comercialmente tratada com Beck's "SureGro" contendo fludioxonila e fungicidas mefenoxam; em conjunto com inseticida Agrilience Actellic 5E (isto é, pirimifos-metil), de acordo com instruções do rótulo. A variedade PG foi tratada comercialmente com Syngenta "Cruiser Extreme" (isto é, fungicidas fludioxonila, mefenoxam e azoxistrobina mais inseticida tiametoxam) de acordo com instruções do rótulo.

[0070]Subsequentemente, a semente de milho foi tratada em excesso com duas formulações de Myconate. Uma formulação continha formononetinato de potássio a 98% (kf) em conjunto com polímero Polykote e a outra, formononetina ácida a 100% (afP) em conjunto com polímero Polykote, agente umectante, corante e preservante. Os tratamentos com kf, 1 a 6, na tabela 6, continham quantidades variadas de formononetinato de potássio e foram aplicados usando aparelho de bancada de laboratório. Os tratamentos com afP, 18 e 19, foram aplicados usando equipamento comercial. A semente de HB tratada recebeu o tratamento kf de formononetinato de potássio em razões de 0,2 a 5,6 mg/semente. A semente PG tratada recebeu o tratamento afP de formononetina em taxa simples de 0,8 mg/semente. A concentração de formononetina por semente foi calculada por medição gravimétrica do revestimento aplicado à semente.

[0071]Os controles para os tratamentos com kf envolveram duas amostras de semente, 7 e 8, ambas não tratadas com kf e uma destas não foi também tratada com esporos de VAM. O controle para o tratamento com afP foi tratado com afP, porém não foi tratado com VAM. Os vários tratamentos incluindo a adição de esporos de VAM ao meio de crescimento antes da semeadura para estudos de desenvolvimento de VAM são descritos esquematicamente na Tabela 6.

Tabela 6

Tratamento número	Variedade	Tratamento com fungicida/inseticida	Polímero secundário	Myconate (mg/sem ente)	VAM	Número de réplicas
1	BH	+	+	0,2 kf	+	5
2	BH	+	+	0,4 kf	+	5
3	BH	+	+	0,8 kf	+	5
4	BH	+	+	1,6 kf	+	5
5	BH	+	+	4,0 kf	+	5
6	BH	+	+	5,6 kf	+	5
7	BH	+	-	+	-	10
8	BH	+	-	-	-	5
9	PG	+	+	0,8 afP	+	5
10	PG	+	+	0,8 afP	-	5

[0072]Germinação da semente: O método que se segue foi usado para determinar a germinação da semente. Cem sementes de cada tratamento foram semeadas individualmente em células de 30 mL de bandejas Speedling contendo mistura para pote Miraco-III autoclavada. Após serem aguadas, as bandejas foram incubadas a temperatura ambiente (cerca de 25 °C) sob iluminação por 7 dias. Após 7 dias, a taxa de germinação e outras observações pertinentes foram registradas. As sementes foram consideradas como germinadas quando elas se desenvolveram em sementeiras de tamanho normal. As sementes que não exibiram emergência ou que haviam emergido, porém não interrompida, deformaram e de outra forma eram anormais (tais como, possuindo brotos duplos ou triplos) foram consideradas como não germinadas. A taxa de germinação foi calculada como a porcentagem de semente mostrando emergência daquelas estruturas essenciais que são indicativas da capacidade de se produzir uma planta normal sob condições favoráveis.

[0073]As taxas de germinação variaram de 89% a 99% para todos os tratamentos experimentais (Tabela 7). As sementes usadas neste teste foram seleciona-

das aleatoriamente; portanto as taxas representam a capacidade de germinação real da semente em cada tratamento experimental. Concentrações de Myconate de 4,0 e 5,6 mg/semente (5 a 7 vezes a taxa comercial) mostraram as taxas de germinação mais baixas e produziram uma incidência maior de sementeiras anormais. As sementes tratadas a 5,6 mg/semente cresceram ligeiramente menos com lâminas de folha menores e eram menos uniformes em tamanho que as sementes tratadas em concentrações mais baixas. Esta diferença desapareceu após as sementeiras serem transplantada para recipientes de 1 litro contendo meio com base em areia e incubadas em uma estufa por algumas semanas para o estudo de desenvolvimento de VAM.

[0074]As taxas de germinação para a semente tratada com a taxa de aplicação comercial de Myconate (0,8 mg/semente, 3 amostras) variaram de 96% a 99%, o que excedeu a germinação mínima de 90% necessária para o milho de semente híbrida. Para comparação, as taxas de germinação para semente não tratada mostraram uma faixa semelhante, 95% a 97%. Na taxa comercial de 2X (1,6 mg/semente), as taxas de germinação também excederam padrão mínimo. Assim, nós concluímos que o tratamento com Myconate até 1,6 mg/semente não possui efeito adverso na capacidade de germinação da semente.

Tabela 7

Tratamento número	Myconate (mg/semente)	Descrição das sementeiras por 100 sementes		
		Número normal	Número anormal*	% de germinação
1	0,2 kf	92	1	92
2	0,4 kf	96	2	96
3	0,8 kf	96	2	96
4	1,6 kf	94	0	94
5	4,0 kf	91	4	91
6	5,6 kf	89	4	89
7	-	95	0	95
8	-	97	2	97

9	0,8 afP	99	1	99
10	0,8 afP	99	1	99

(\*) Sementeiras que pareceram interrompidas, deformadas ou produziram brotos múltiplos foram classificadas como anormais. As sementes das mesmas foram contadas como não germinadas.

[0075]A taxa de colonização de fungos de VAM nas raízes do milho foi determinada usando os métodos geralmente usados para quantificar micorriza arbuscular vesicular (Kormanik PP and AC McGraw (1984) Quantification of vesicular-arbuscular micorrhizae in plant roots. In N. C. Schenck (ed.) Methods and Principles of Micorrhizal Research. American Phytopathological Society, St. Paul, MN; Phillips JM and DS Hayman (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular- arbuscular micorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-160; Read DJ, HK Koncheki and J Hodgson (1976) Vesicular-arbuscular micorrhiza in natural vegetation systems. New Phytol. 77:641-653). Células da bandeja de sementeira (volume de 30 mL) foram parcialmente enchidas (2/3) com mistura de pote Miraco-III autoclavada e inoculadas com 95 esporos de coquetel de VAM (Lote número 12-14-04). O coquetel de VAM continha esporos de *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum*, *Entrophospora columbicma* e *Glomus intraradices*. O coquetel foi preparado por mistura de preparações de esporo peneiradas a seco (179 micra) de *G. entunicatum*, *G. clarum* e *E. columbiana* com peças de raiz seca contendo os esporos intrarradiciais de *G. intraradices*. Cada espécie de fungo foi individualmente produzida e processada usando uma técnica de cultura em pote. As células foram então enchidas com mistura Miraco-III. Após semeadura (uma semente por célula, 9-20 sementes por tratamento), as bandejas foram incubadas sob luz contínua a temperatura ambiente. Dez dias após a semeadura, cinco semeaduras de cada tratamento experimental e 10 de dois controles não tratados (Tratamentos 7 e 8) foram selecionadas aleatoriamente e transplantadas para recipientes de 1 litro contendo um meio à base de areia. Os recipientes foram incubados em uma estufa e

uma solução nutriente com baixo teor de fósforo (P) (1,175 ppm) foi aplicada a todos os tratamentos 1-2 vezes por semana, conforme necessário para manter a umidade apropriada do solo.

[0076]Quatro semanas após o transplante, cinco sementeiras de controle não tratado (Tratamentos 7) foram examinadas quanto ao desenvolvimento de VAM e foi verificado que exibiam ligeiramente mais de 20% de colonização de VAM. No dia seguinte, as amostras de raiz de todas as sementeiras remanescentes (5 sementeiras por tratamento) foram coletadas e armazenadas em um refrigerador (4-6°C) por 5 dias até serem processadas. As amostras de raiz foram lavadas, limpas e coloridas para avaliação de VAM de acordo com os procedimentos descritos por Phillips JM and DS Hayman (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular micorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-160. Amostras de raiz foram processadas na taxa de 30-35 amostras por dia. As avaliações microscópicas das raízes coloridas para colonização da VAM foram realizadas usando técnicas de deslizamento de raiz descritas por Kormanik PP and AC McGraw (1984) Quantification of vesicular-arbuscular micorrhizae in plant roots. In N. C. Schenck (ed.) *Methods and Principles of Micorrhizal Research*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

[0077]A tabela 8 reporta os resultados para colonização de VAM nestes experimentos. Ambos o formononetinato de potássio (kf) e formononetina ácida (afP) aumentaram a colonização de VAM em 81 e 105% respectivamente na taxa de uso comercial (0,8 mg/semente). A colonização de VAM sob os três tratamentos de semente com Myconate kf até 0,8 mg/semente foi aumentado em mais de 69 a 81% acima do controle não tratado; contudo, nenhum efeito de dose linear foi visto entre estes três tratamentos (figura 4). Em 1,6 mg/semente, Myconate kf aumentou a colonização de VAM em aproximadamente 30%, o que mostra um declínio na resposta de dose. Em ou acima de 4,0 mg/semente, Myconate kf diminuiu a colonização de VAM nestes experimentos. Do nosso conhecimento, este é o primeiro relatório publi-

cado de formononetina inibindo colonização por VAM; contudo, a resposta de dose observada no presente documento é típica para muitos materiais aplicados aos solos e plantas.

[0078]Não foi verificado desenvolvimento do VAM nas plantas de controle não inoculadas (Tratamentos 8 e 10) indicando que não houve contaminação durante os experimentos. A planta de controle não tratada (Tratamentos 7), que serviram como controle de inoculação de VAM positivo, sem Myconate, exibiram colonização de VAM de 24,2%. A formononetina trabalhou pelo menos bem ou menor que o formononetinato de potássio, na mesma taxa.

Tabela 8

Tratamento número	VAM	Myconate (mg/semente)	% de Colonização da Raiz por VAM em 5 Réplicas					Média (%)
			A	B	C	D	E	
1	+	0,2 kf	40	47	41	39	38	41,0
2	+	0,4 kf	44	48	45	40	41	43,6
3	+	0,8 kf	45	42	47	45	40	43,8
4	+	1,6 kf	30	39	28	35	28	32,0
5	+	4,0 kf	27	21	31	24	22	25,0
6	+	5,6 kf	19	12	25	18	17	18,2
7	+	-	27	28	20	22	24	24,2
8	-	-	0	0	0	0	0	0
9	+	0,8 afP	38	59	53	40	58	49,6
10	-	0,8afP	0	0	0	0	0	0

[0079]Conclusões: Este estudo mostrou que Myconate não é prejudicial para germinação nem para o desenvolvimento de VAM a menos que aplicado em taxas 5 a 7 vezes maiores que a taxa comercial recomendada. Estes estudos também reconfirmaram que Myconate mantém suas propriedades estimuladoras de VAM mesmo quando aplicado à semente que possui um revestimento de um ou mais de uma faixa de fungicidas para tratamento de semente.

#### Exemplo 2: Estudos de Campo

[0080]Durante 2005 e 2006 foram realizados estudos de campo para de-

monstrar, primeiro, que as combinações de formononetinato de metal alcalino e/ou formononetina com fungicidas não reduzem germinação no campo para níveis abaixo daqueles observados para fungicidas sozinhos e, em segundo lugar, que o efeito da estimulação de VAM conhecido que resulta de tratamentos de formononetinato alcalino e/ou formononetina realmente fornece aumentos de rendimento sendo, portanto, de valor para o fazendeiro, e em terceiro lugar que este efeito não é inibido, reduzido ou negado pela presença de fungicidas nas sementes tratadas com formononetina e/ou formononetinato alcalino.

[0081]Estes experimentos foram realizados em Indiana e neste exemplo, sementes de milho e soja foram tratadas por tratador de semente comercial operado por uma empresa de sementes bem-conceituada. Os tratamentos das sementes foram conforme mostrados na Tabela 10. O fungicida usado na semente de milho foi o Maxim XL e aquelas sementes de milho recebendo fungicidas também receberam um tratamento inseticida protetor aplicado simultaneamente, neste caso Poncho 600 (isto é, clotianidina) aplicada a uma taxa de 0,25 mg de ingrediente ativo por semente (também denominado “Poncho 250”). O fungicida usado nas sementes de soja era uma mistura de quatro materiais mostrados; as sementes de soja não foram tratadas com inseticida.

Tabela 10

Tipo de Tratamento	Experiência com milho - 2005	Experiência com soja - 2005	Experiência com milho - 2006
Controle não tratado	SIM	SIM	SIM
Fungicida sem Ativo	Maxim XL mais inseticida Poncho 250	Maxim XL + PCNB + Apron XL + Tiram	Maxim LX mais inseticida Poncho 250
Fungicida com Ativo	Maxim XL mais inseticida Poncho 250	Maxim XL + PCNB + Apron XL + Tiram	Maxim LX mais inseticida Poncho 250

[0082]Todos os fungicidas e inseticidas disponíveis comercialmente foram aplicados de acordo com as recomendações do rótulo e com as instruções para uso fornecidas.

[0083]Neste caso, o Ativo usado foi o formononetinato alcalino (potássio) e este foi

aplicado subsequentemente ao tratamento com fungicidas e inseticidas após diluição em água suficiente para obter uma pasta que fluiria através do tratador.

[0084]As sementes compreendendo os inúmeros tratamentos foram semeadas em lotes de terra replicados pequenos em vários locais para cada experimento usando um plantador padrão e plantando um número de fileiras para cada tratamento em cada local específico. Práticas agrícolas padrão foram usadas através de toda a estação de crescimento. Detalhes adicionais do experimento e procedimentos são fornecidos na Tabela 11.

Tabela 11

Parâmetro	Experiência com milho - 2005	Experiência com soja - 2005	Experiência com milho - 2006
Número de locais	3	5	3
Número total de réplicas	5	7	5
Data de plantio	6/6 a 3/5 de 2005	16 a 18/4 de 2005	20 a 27/4 de 2006
Tamanho do lote de terra	Fileiras de 5,08 ou 10,16 x 76,2 cm	15,24 x 38,1 cm	5,08 cm x 76,2 cm
Regime de cultivo	Convencional e cultivo baixo	Nenhum cultivo	Convencional e cultivo baixo
População de sementes semeadas	29 kg a 33,7 kg/acre dependendo do sítio	156 kg/acre	30 kg a 32,5 kg/acre dependendo do sítio
Chuvas de abril a agosto	52,58 cm	52,58 cm	53,60 cm
Data da colheita	7 a 13/10 de 2005	3 a 5/10 de 2005	26 a 28/09 de 2006

[0085]Seguindo-se a emergência e estabelecimento anterior das colheitas, o número de plantas que emergiram foi contado e registrado para prover uma estimativa de germinação e estabelecimento. Então na colheita, o rendimento de cada lote de terra foi determinado por pesagem do produto colhido em um recipiente para pesagem de colheita padrão. Os rendimentos foram ajustados para rendimento de um teor de umidade equivalente e calculados como alqueires por acre. Os resultados de estabelecimento ereto e rendimento são apresentados na Tabela 12, onde o resultado para os lotes de terra com sementes tratadas são expressos como um aumento

na porcentagem em relação aquele dos lotes de terra contendo sementes não tratadas.

Tabela 12

	Experiência com milho - 2005	Experiência com soja - 2005	Experiência com milho - 2006
Resultados da população de plantas			
Padrão não tratado	100%	100%	100%
Fungicida (+ inseticida) – SEM ATIVO	104,4%	100,2%	107,3%
Fungicida (+ inseticida) – MAIS ATIVO	99,7%	109,7%	108,5%
Resultados do rendimento			
Padrão não tratado	100%	100%	100%
Fungicida (+ inseticida) – SEM ATIVO	102,6%	102,9%	103,6%
Fungicida (+ inseticida) – MAIS ATIVO	105,1%	106,2%	107,3%

[0086]Com base nos resultados da população de plantas, a presença de um fungicida nas sementes reduz a morte da semente e sementeiras a partir de agentes patogênicos de fungos e conseqüentemente aumenta a contagem de plantas eretas em relação aquela observada com a semente tratada sem fungicida. Em dois dos três casos, a adição de formononetinato alcalino melhorou adicionalmente o estabelecimento ereto. Aumentos consistentes no estabelecimento ereto não foram observados com formononetina e formononetinato alcalino e isto não é uma reivindicação registrada para o material, contudo o que é observado é que na média, o Ativo não inibe o aperfeiçoamento do estabelecimento ereto obtido pela semente revestida com fungicidas. Neste exemplo, nos três experimentos, o aumento no estabelecimento ereto, na presença de fungicidas sozinhos é de 4,0% e na presença de fungicidas mais formononetinato alcalino é de 6,0%.

[0087]Os rendimentos são marginalmente aperfeiçoados quando a semente é tratada com fungicidas, neste exemplo, os rendimentos foram aperfeiçoados em

uma média de 3,0% e os aperfeiçoamentos foram consistentes através das colheitas e anos. Quando o formononetinato alcalino foi adicionado aos tratamentos fungicidas, o rendimento aumentou em relação aos lotes de terra com sementes não tratadas, aumentando novamente para um nível médio de 6,0% a mais, que é um aumento duplo em relação aquele atribuído aos fungicidas sozinhos.

[0088]Esta série de experimentos demonstra que a adição de formononetina e/ou formononetinato alcalino em conjunto com fungicidas como um revestimento nas sementes não afeta negativamente o efeito de controle da doença do fungicida e nem inibe o rendimento do efeito aperfeiçoado da formononetina e/ou formononetinato alcalino. A formononetina e/ou formononetinato alcalino é conhecida por atuar através da melhora da colonização da micorriza de raízes de plantas conforme demonstrado nos Exemplos 1 e 2, combinando assim claramente os fungicidas no mesmo revestimento de semente como a formononetina e/ou formononetinato alcalino não resulta na inibição dos fungos micorriza arbusculares vesiculares benéficos.

[0089]Considerando-se que modalidades específicas desta invenção foram descritas para fins de ilustração, ficará claro aos versados na técnica que inúmeras variações dos detalhes do presente ensinamento podem ser feitas sem com isto fugir da invenção conforme definida nas reivindicações apensas. As patentes e publicações discutidas aqui devem ser tidas como indicativas do nível de habilidade na técnica, embora nenhuma admissão seja feita de que qualquer documento seja uma referência à técnica anterior. Todas as patentes e publicações precedentes no presente documento, incluindo, porém não limitadas aquelas citadas nos antecedentes da invenção são incorporadas ao presente documento como referência. À medida que o material incorporado conflite com as definições existentes, declarações ou outro material revelado estabelecido nesta descrição, a revelação conforme estabelecida no presente documento prevalecerá a qualquer matéria conflitante incorporada aqui como referência.

## REIVINDICAÇÕES

1. Semente revestida **CARACTERIZADA** por compreender:

(a) uma semente;

(b) um revestimento compreendendo pelo menos um fungicida que é um fungicida inibidor externo de quinona (Qol); e pelo menos um composto selecionado do grupo consistindo em uma isoflavona e um isoflavonóide.

2. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito composto ser selecionado do grupo consistindo em hesperetina, formononetina, formononetinato alcalino e suas misturas.

3. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito revestimento compreender ainda um inseticida selecionado do grupo consistindo em produtos biológicos/de fermentação, *Agrobacterium radiobacter*; cepas *Bacillus*; *Burkholderia cepacia*; cepas *Pseudomonas*; cepas *Trichoderma*; cepas *Streptomyces*; carbamatos, cloronicotinilas, diacilidrazinas, neonicotinóides, nitroguanidinas, organofosfatos, derivados de oxadiazina, fenil pirazonas, pirazonas, piretrinas, pirróis, piretróides sintéticos, tianicotinilas e triazóis.

4. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito fungicida e do dito composto serem aplicados como uma coformulação.

5. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito fungicida e do dito composto serem aplicados consecutiva ou simultaneamente.

6. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito composto ser uma isoflavona e da dita isoflavona ser um formononetinato alcalino selecionado do grupo consistindo em formononetinato de sódio e formononetinato de potássio.

7. Semente revestida, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do dito fungicida ser azoxistrobina.

8. Processo para produção de uma semente revestida, conforme definida na reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** por compreender:

- (a) fornecer uma semente;
- (b) revestir a dita semente com pelo menos um fungicida que é um fungicida inibidor externo de quinona (QoI); e
- (c) revestir a dita semente com pelo menos um composto selecionado do grupo consistindo em uma isoflavona e um isoflavonóide.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato do dito composto ser selecionado do grupo consistindo em hesperetina, formononetina, formononetinato alcalino e suas misturas.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** por compreender, ainda, revestir a dita semente com um inseticida selecionado do grupo consistindo em produtos biológicos/de fermentação, *Agrobacterium radiobacter*; cepas *Bacillus*; *Burkholderia cepacia*; cepas *Pseudomonas*; cepas *Trichoderma*; cepas *Streptomyces*; carbamatos, cloronicotinilas, diacilidrazinas, neonicotinóides, nitroguanidinas, organofosfatos, derivados de oxadiazina, fenil pirazonas, pirazonas, piretrinas, pirróis, piretróides sintéticos, tianicotinilas e triazóis.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato das etapas de revestimento ocorrerem consecutiva ou simultaneamente.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato do dito fungicida e do dito composto serem aplicados como uma coformulação.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato do dito composto ser um formononetinato alcalino selecionado do grupo consistindo em formononetinato de sódio e formononetinato de potássio.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato do dito fungicida ser azoxistrobina.

**Figura 1. Estímulo do Desenvolvimento de VAM pelo Myconate**

Demonstração da eficácia do Myconate nas várias taxas de dose no estímulo da colonização das raízes de milho e algodão por fungos de VAM após 8 e 10 semanas de crescimento, respectivamente.

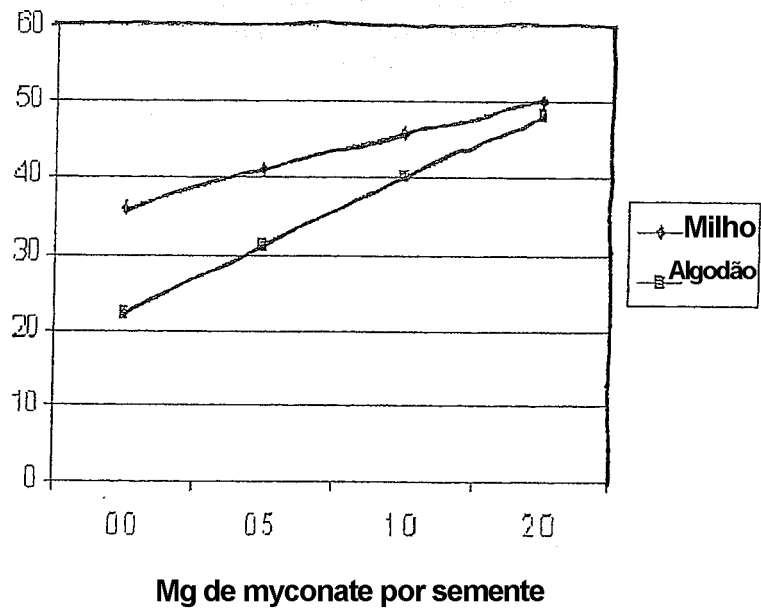


Figura 2. Resultado experimental

**Efeito das combinações de Myconate e fungicidas na germinação e desenvolvimento de VAM nas sementes de milho tratadas**

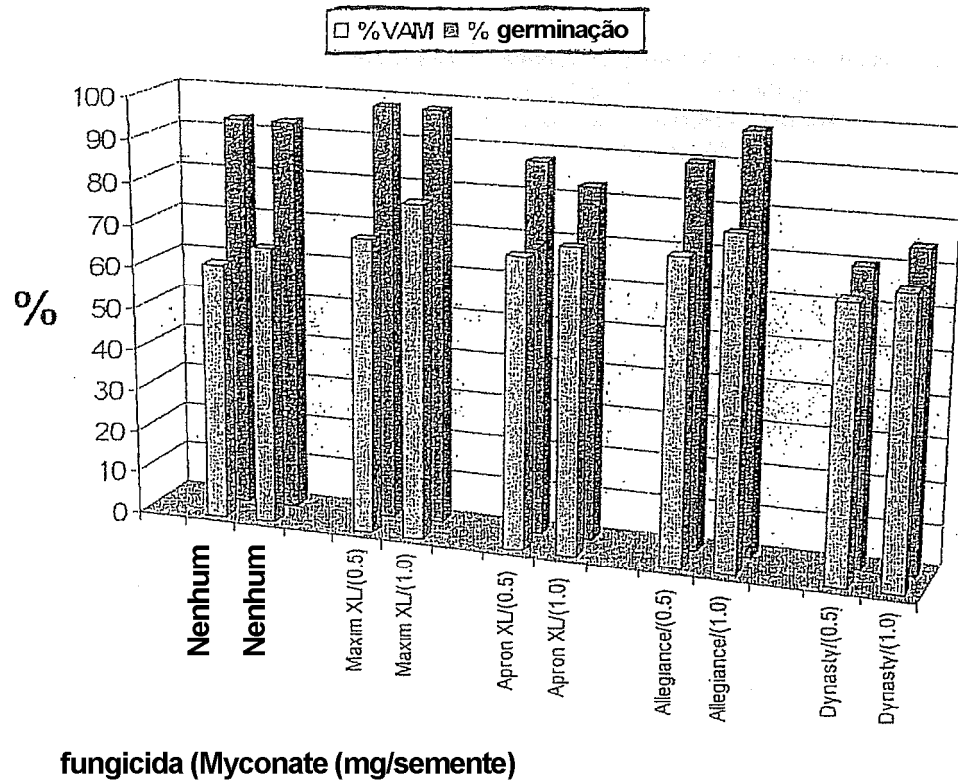
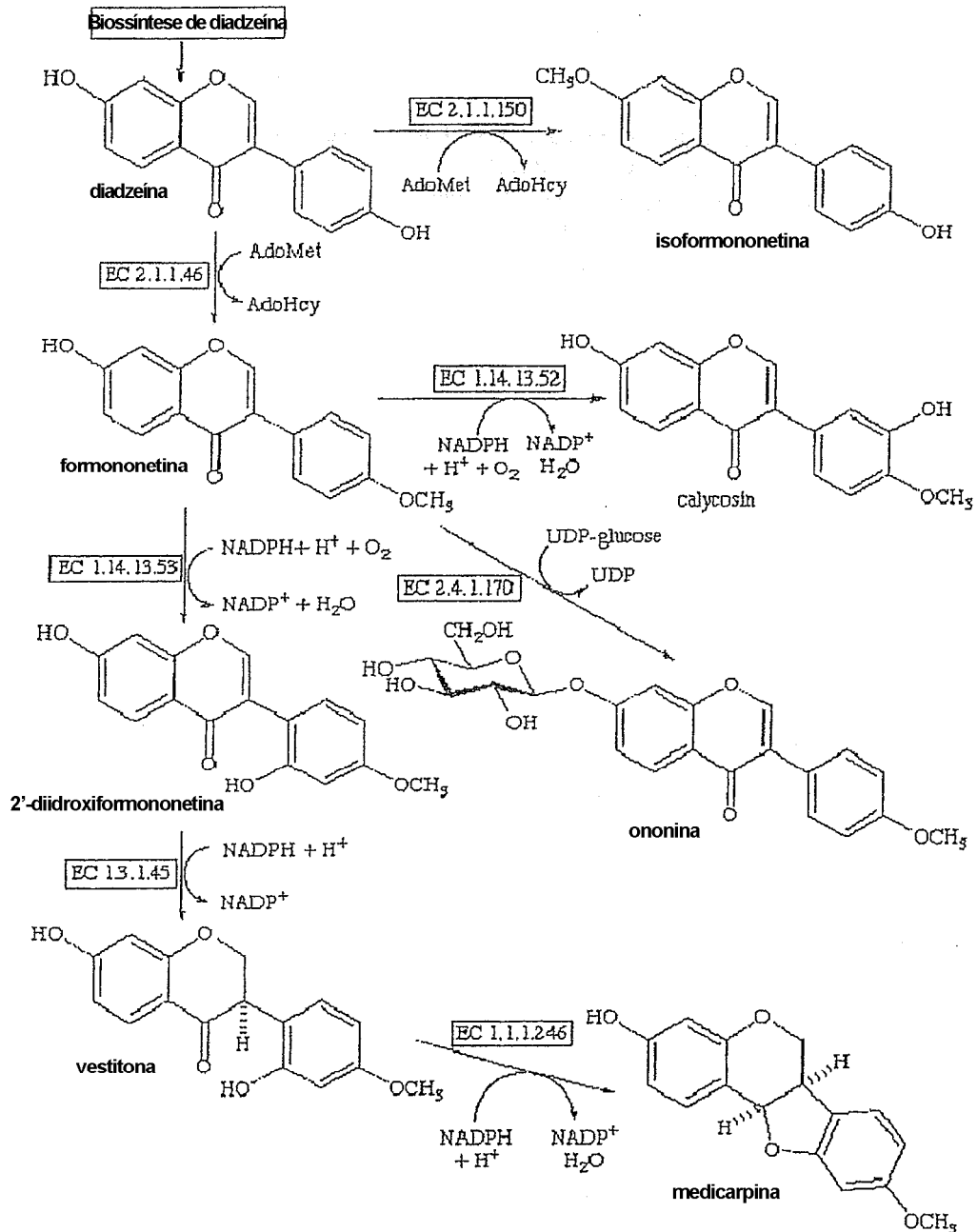


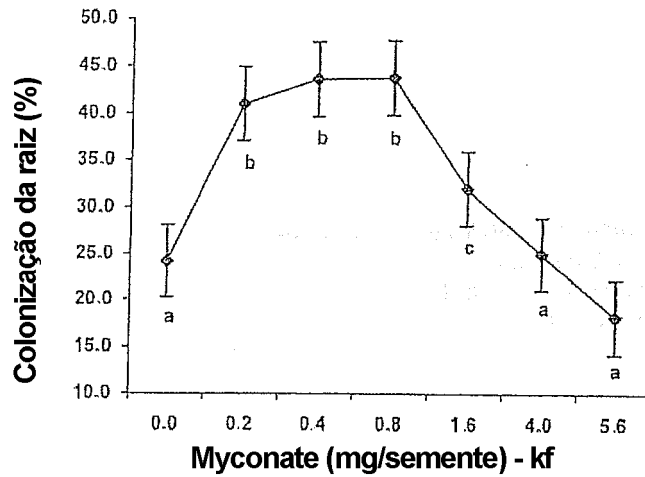
Figura 3

## Biossíntese da formononetina e derivados



© IUBMB 2004

**Figura 4. Efeito de Myconate kf na colonização por VAM no milho (Estudos laboratoriais - 2007)**



Os valores são a ponderação de 5 medições de colonização de VAM replicadas produzidas por Myconate kg aplicado em taxas declaradas. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes ( $p = 0,05$ ).