República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014005400-2 B1

(22) Data do Depósito: 10/09/2012

(45) Data de Concessão: 01/10/2019

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR O CRESCIMENTO E/OU RENDIMENTO DE SOJA

(51) Int.Cl.: A01N 31/06; A01N 43/16; A01N 63/02; C05F 11/08; A01P 21/00.

(52) CPC: A01N 31/06; A01N 43/16; A01N 63/02; C05F 11/08.

(30) Prioridade Unionista: 08/09/2011 US 61/532234; 08/12/2011 US 61/568435.

(73) Titular(es): NOVOZYMES BIOAG A/S.

(72) Inventor(es): R. STEWART SMITH; AHSAN HABIB; JOHN KOSANKE.

(86) Pedido PCT: PCT US2012054443 de 10/09/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/036922 de 14/03/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/03/2014

(57) Resumo: MÉTODO PARA AUMENTAR O CRESCIMENTO E/OU RENDIMENTO DE SOJA São divulgados métodos de realçar o crescimento da planta, que compreende tratar a semente pelo menos um mês antes do plantio com quantidade eficaz de uma molécula de sinal de planta, em que na colheita a planta exibe pelo menos um de crescimento da planta aumentado medido em termos de bushels/acre, número de raiz aumentado, comprimento de raiz aumentado, massa de raiz aumentada, volume de raiz aumentado e área de folha aumentada, comparada com as plantas colhidas a partir da semente não tratada, ou comparada com as plantas colhidas a partir da semente tratada com a molécula de sinal exatamente antes ou dentro de uma semana ou menos do plantio.

"MÉTODO PARA AUMENTAR O CRESCIMENTO E/OU RENDIMENTO DE SOJA"

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0001] A simbiose entre as bactérias do solo gram-negativas, *Rizobiasceae* e *Bradyrhizobiaceae* e legumes tais como soja, é bem documentada. A base bioquímica para estas relações inclui uma mudança de sinalização molecular, em que os compostos de sinal de planta para bactéria incluem flavonas, isoflavonas e flavanonas e os compostos de sinal de bactéria para planta, que incluem os produtos finais da expressão dos genes *nod* Bradirrizobiais e Rizobiais, conhecidos como lipo-quitooligossacarídeos (LCOs). A simbiose entre estas bactérias e os legumes possibilita que o legume fixe nitrogênio atmosférico e por meio deste cresça em solo que tem baixos níveis de nitrogênio assimiláveis, eliminando assim uma necessidade quanto a fertilizantes nitrogenados. Visto que os fertilizantes nitrogenados podem aumentar significantemente o custo das safras e estão associados com vários efeitos poluentes, a indústria agrícola continua seus esforços para explorar esta relação biológica e desenvolver novos agentes e os métodos para melhorar o rendimento da planta sem aumentar o uso de fertilizantes com base em nitrogênio.

[0002] A Patente U.S. 6.979.664 divulga um método para realçar a germinação de semente ou emergência de muda de uma safra de planta, que compreende as etapas de fornecer uma composição que compreenda uma quantidade eficaz de pelo menos um lipo-quitooligossacarídeo e um carregador agricolamente adequado e aplicar a composição na vicinidade imediata de uma semente ou muda em uma quantidade eficaz para realçar a germinação de semente de emergência de muda em comparação com uma semente ou muda não tratadas.

[0003] Outro desenvolvimento deste conceito é divulgado na WO 2005/062899, direcionada às combinações de pelo menos um indutor de

planta, a saber um LCO, em combinação com um fungicida, inseticida, ou combinação dos mesmos, para realçar uma característica da planta tal como posição da planta, crescimento, vigor e/ou rendimento. As composições e os métodos são divulgados serem aplicáveis tanto aos legumes quanto aos não legumes e podem ser usados para tratar uma semente (exatamente antes de plantar), muda, raiz ou planta.

[0004] Similarmente, a WO 2008/085958 divulga composições para realçar crescimento da planta e rendimento de safra tanto nos legumes quanto nos não legumes e que contêm LCOs em combinação com outro agente ativo tal como uma quitina ou quitosano, um composto flavonóide, ou um herbicida e que podem ser aplicadas às sementes e/ou plantas concomitante ou sequencialmente. Como no caso da Publicação '899, a Publicação '958 divulga tratamento de sementes exatamente antes de plantar.

[0005] Várias outras publicações descrevem o benefício de LCOs nos processos de tratamento de semente, tais como, Kidaj *et al.*, "Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions," Microbiol Res 25426 (2011) e Maj *et al.*, "Pretreatment of Clover Seeds with Nod Factors Improves Growth and Nodulation of Trifolium pratense," J. Chem Ecol (2009) 35: 479-487.

[0006] Mais recentemente, Halford, "Smoke Signals," em Chem. Eng. News (12 de abril de 2010), nas páginas 37-38, relata que carriquinas ou butenolidas que estão contidas na fumaça atuam como estimulantes de crescimento e germinação de semente estimulada depois de um incêndio florestal e pode estimular sementes tais como milho, tomates, alface e cebolas que foram armazenados. Estas moléculas são o assunto da Patente U.S. 7.576.213.

SUMÁRIO RESUMIDO DA INVENÇÃO

[0007] A presente invenção fornece métodos de aumentar o crescimento da planta e a produção de safra em que o efeito benéfico de uma

molécula de sinal de planta (agente de realçar o crescimento da planta) pode ser obtido sem a necessidade de aplicar a molécula de sinal de planta (agente de realçar o crescimento da planta) à semente contemporaneamente com a plantação. A presente invenção está fundamentada, em parte, na descoberta de que o tratamento de sementes com uma molécula de sinal de planta tal como um LCO, seguida pela armazenagem prolongada antes do plantio, resulta em crescimento realçado da planta, incluindo maior crescimento da planta e/ou área de superfície da folha e/ou número, comprimento e massa da raiz, comparado com as plantas colhidas de ambas sementes não tratadas. A presente invenção também fornece métodos de aumentar o crescimento da planta e a produção de safra em que as melhoras adicionais podem ser obtidas em safras e plantas produzidas a partir das sementes tratadas exatamente antes ou dentro de uma semana ou menos do plantio.

[0008] Um primeiro aspecto da presente invenção é direcionado a um método para aumentar o crescimento da planta, que compreende tratar semente pelo menos um mês (trinta dias) antes do plantio com quantidade eficaz de uma molécula de sinal de planta. Em formas de realização, a semente pode ser tratada de acordo com o presente método em 2 meses antes do plantio, pelo menos 3 meses antes do plantio, pelo menos 4 meses antes do plantio, pelo menos 5 meses antes do plantio, pelo menos 6 meses antes do plantio, pelo menos 9 meses antes do plantio, pelo menos 1 ano antes do plantio, pelo menos 2 anos antes do plantio e em algumas formas de realização, pelo menos 3 anos antes do plantio.

[0009] O tratamento é usado para produzir uma planta (safra) que exibe pelo menos um de rendimento aumentado medido em termos de bushels/acre, número de raiz aumentado, comprimento de raiz aumentado, massa de raiz aumentada, volume de raiz aumentado e área de folha aumentada, comparada com as plantas colhidas a partir da semente não tratada. Em formas de realização particulares, o tratamento pode ser usado

para produzir uma planta (safra) que exiba pelo menos um de rendimento aumentado medido em termos de bushels/acre, número de raiz aumentado, comprimento de raiz aumentado, massa de raiz aumentada, volume de raiz aumentado e área de folha aumentada comparada a uma planta (safra) colhidas a partir da semente tratada com a molécula de sinal exatamente antes ou dentro de uma semana ou menos do plantio.

[00010] Em certas formas de realização da presente invenção, a molécula de sinal de planta é um lipo-quitooligossacarídeo (LCO). Em algumas formas de realização, o LCO é recombinante. Em outras formas de realização, o LCO é sintético. Em outras formas de realização, o LCO é obtido a partir de um micro-organismo, por exemplo, uma espécie de Rizóbio selecionado de *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, por exemplo, *Bradyrhizobium japonicum, Sinorhizobium sp.* e *Azorhizobium sp*, ou a partir de um fungo micorrizal arbuscular.

[00011] Em outras formas de realização, a molécula de sinal de planta é um composto quitinoso tal como um quitooligômero (CO). Em algumas formas de realização, o CO é recombinante. Em outras formas de realização, o CO é sintético. Em outras formas de realização, o CO é obtido a partir de um micro-organismo como por LCO's.

[00012] Em outras formas de realização, a molécula de sinal de planta é um flavonóide. Em outras formas de realização, a molécula de sinal de planta é ácido jasmônico, ácido linoléico, ácido linolêncio ou um derivado dos mesmos. Em outras formas de realização, a molécula de sinal de planta é uma carriquina.

[00013] As combinações de duas ou mais moléculas de sinal da planta diferentes (ou tipos dos mesmos) podem ser usados para tratar as sementes.

[00014] Em outras formas de realização, o tratamento compreende ainda contatar as sementes com pelo menos um outro agente agronomicamente benéfico, por exemplo, diazótrofo (inoculante Rizobial),

fungos micorrizais, um agente que solubiliza fosfato, herbicida, inseticida ou um fungicida. Em algumas formas de realização, o tratamento acarreta necessariamente pulverizar uma composição que compreende a molécula de sinal de planta sobre a semente e em algumas outras formas de realização, o tratamento acarreta necessariamente gotejar a composição sobre as sementes.

[00015] O método da presente invenção é aplicável da mesma forma aos legumes e não legumes. Em algumas formas de realização, a semente de leguminosa é semente de soja. Em algumas outras formas de realização, a semente que é tratada é semente não leguminosa tal como uma semente de cultivo em larga escala, por exemplo, milho, ou uma semente de safra vegetal.

[00016] A semente pode ser tratada de acordo com o presente método em qualquer tempo de um mês (trinta dias) até 1 ano, 2 anos e em algumas formas de realização, mesmo 3 anos antes do plantio, dependendo das propriedades particulares da semente (viabilidade depois da armazenagem) ou padrões industriais. Por exemplo, as sementes de soja são no geral plantadas na estação seguinte, considerando que a semente de milho pode ser armazenada por períodos muito mais longos de tempo incluindo para mais de 3 anos antes do plantio.

[00017] A presente invenção também diz respeito a sementes tratadas com uma molécula de sinal de planta/agente de realçar o crescimento da planta, tal como um LCO ou CO, que foram armazenados por pelo menos trinta dias até 1 ano, 2 anos e em algumas formas de realização, mesmo 3 anos antes do plantio.

[00018] Ainda em um outro aspecto a presente invenção é direcionada a uma semente plantada que foi tratada com uma molécula de sinal de planta/agente de realçar o crescimento da planta, tal como um LCO ou CO, que foram armazenados por pelo menos trinta dias até 1 ano, 2 anos e em algumas formas de realização, mesmo 3 anos antes do plantio.

[00019] Um aspecto relacionado da presente invenção é direcionado a

um pacote que compreende as sementes tratadas de acordo com a presente invenção para o propósito da plantação subsequente ao tratamento.

[00020] Como demonstrado nos exemplos de trabalho, que incluem experimentos comparativos conduzidos tanto sob condições de estufa quanto de campo, os benefícios das moléculas de sinal/agente de realçar o crescimento das plantas podem ser obtidos mesmo através das moléculas de sinal são aplicadas a uma semente significantemente antes do tempo de plantação e depois o período de armazenagem prolongado.

[00021] Como demonstrado ainda nos exemplos de trabalho, que incluem experimentos comparativos conduzidos tanto sob condições de estufa quanto de campo, formas de realização da presente invenção que acarretou necessariamente o tratamento de semente de soja com um LCO de *Bradyrhizobium japonicum* exibindo o crescimento da planta aumentado, área de superfície da folha e comprimento de raiz aumentado e o volume da raiz comparada tanto à semente não tratada quanto à semente tratada com o LCO exatamente antes ou dentro de uma semana de plantação.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[00022] As Figuras 1 e 2 mostram que as estruturas de compostos de lipo-quitooligossacarídeo (LCO) úteis na prática da presente invenção.

[00023] A Figura 3 é um gráfico de barra que mostra a área de superfície de folhas médias trifoliadas primárias em plantas de soja no 19º dia de idade germinadas a partir de semente tratadas de acordo com uma forma de realização da presente invenção (por exemplo, 55 dias de pré-plantação) quando comparadas com os controles (isto é, semente não tratada e semente tratada com a molécula de sinal 7 dias antes do plantio).

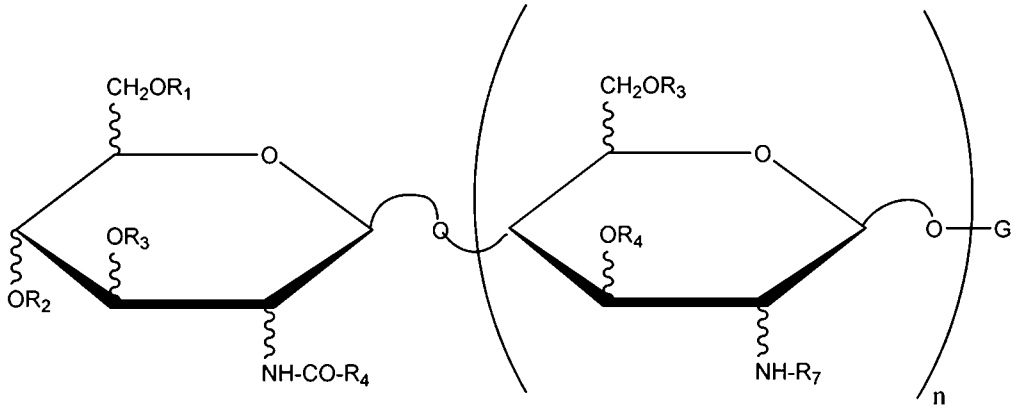
DESCRIÇÃO DETALHADA

[00024] Para os propósitos da presente invenção, o termo "molécula de sinal de planta", que pode ser usado intercambiavelmente com "agente de realçar o crescimento da planta" amplamente refere-se a qualquer agente,

tanto de ocorrência natural em plantas ou micróbios, quanto sintética (e que pode ser de ocorrência não natural) que diretamente ou indiretamente ativa um caminho bioquímico da planta, que resulta no crescimento aumentado da planta, mensurável pelo menos em termos de pelo menos um de rendimento aumentado medido em termos de bushels/acre, número de raiz aumentado, comprimento de raiz aumentado, massa de raiz aumentada, volume de raiz aumentado e área de folha aumentada. Os exemplos representativos das moléculas de sinal de planta que podem ser úteis na prática da presente invenção incluem os compostos de lipo-quitooligossacarídeo (LCO's), quitooligossacarídeos (COs), compostos quitinosos, flavonoides, ácido jasmonóico, ácido linoléico e ácido linolêncio e seus derivados e carriquinas.

[00025] A molécula de sinal de planta pode ser componente isolado e/ou purificado. O termo "isolado" significa que a molécula de sinal é removida do seu estado natural e separada de outras moléculas naturalmente associadas com a mesma. O termo "purificado" significa que a concentração da molécula de sinal é aumentada (por um processo de purificação) relativa a outros componentes, por exemplo, componentes não desejados ou inferiores.

[00026] Os LCO's, também conhecidos na técnica como sinais de Nod ou fatores de Nod simbióticos, consistem de uma cadeia principal de oligossacarídeo de resíduos de N-acetil-D-glicosamina ("GIcNAc") ligados em β-1,4 com uma cadeia de acila ligada em N condensada na extremidade não redutora. Os LCO's diferem no número de resíduos de GIcNAc na cadeia principal, no comprimento e grau de saturação da cadeia de acila graxa e na substituição de resíduos de açúcar redutores e não redutores. Um exemplo de um LCO é apresentado abaixo como fórmula I



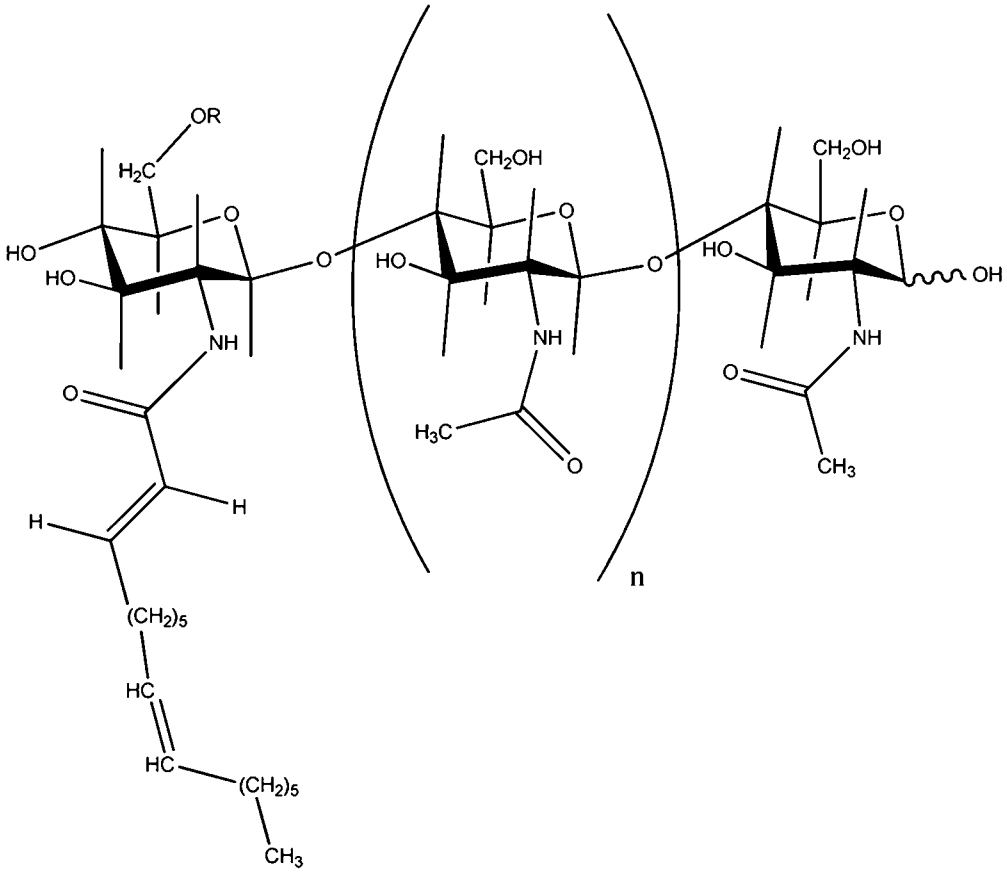
em que:

[00027] G é uma hexosamina que pode ser substituída, por exemplo, por um grupo acetila no nitrogênio, um grupo sulfato, um grupo acetila e/ou um grupo de éter em um oxigênio,

[00028] R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 e R_7, que podem ser idênticos ou diferentes, representam H, CH_3 CO--, $C_x H_y$ CO-- onde x é um número inteiro entre 0 e 17 e y é um número inteiro entre 1 e 35, ou qualquer outro grupo acila tal como por exemplo um carbonila,

[00029] R_4 representa uma cadeia alifática mono, di ou triinsaturada e tetrainsaturada contendo pelo menos 12 átomos de carbono e n é um número inteiro entre 1 e 4.

[00030] Os LCOs podem ser obtidos (por exemplo, isolados e/ou purificados) a partir de bactérias tais como Rizóbias, por exemplo, *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Sinorhizobium sp.* e *Azorhizobium sp.* A estrutura de LCO é a característica para cada uma das espécies bacterianas e cada cepa pode produzir LCO's múltiplos com estruturas diferentes. Por exemplo, os LCOs específicos da *S. meliloti* também foram descritos na Patente U.S. 5.549.718 como tendo a fórmula II:



em que R representa H ou CH_3CO-- e n é igual a 2 ou 3.

[00031] Os LCos ainda mais específicos incluem NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Quando acetilados (o R = CH_3CO--), eles tornam-se AcNodRM-1 e AcNodRM-3, respectivamente (Patente U.S. 5.545.718).

[00032] Os LCOs da *Bradyrhizobium japonicum* são descritos nas Patentes U.S. 5.175.149 e 5.321.011. Amplamente, eles são foto-hormônios de pentassacarídeo que compreendem metilfucose. Vários destes LCOs derivados de *B. japonicum* são descritos: BjNod-V ($C_{18:1}$); BjNod-V (A_C, $C_{18:1}$), BjNod-V ($C_{16:1}$); e BjNod-V (A_C, $C_{16:0}$), com "V" indicando a presença de cinco N-acetilglicosaminas; "Ac" uma acetilação; o número que segue o "C" indicando o número de carbonos na cadeia lateral de ácido graxo; e o número que segue o ": " o número de ligações duplas.

[00033] Os LCO's usados em formas de realização da invenção podem ser recuperados a partir das cepas bacterianas que produzem LOC's, tais como cepas of *Azorhizobium, Bradyrhizobium* (incluindo *B. japonicum*), *Mesorhizobium, Rhizobium* (incluindo *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium*

(incluindo *S. meliloti*) e cepas bacterianas no geral engendrado para produzir LCO's.

[00034] Os LCO's são os determinantes primários da especificidade do hospedeiro na simbiose de legume (Diaz, *et al.*, Mol. Plant-Microbe Interactions *13*: 268-276 (2000)). Assim, dentro da família de legume, gêneros e espécies específicos de rizóbias desenvolvem uma relação simbiótica que fica nitrogênio com um hospedeiro de legume específico. Estas combinações de planta-hospedeiro/bactérias são descritas em Hungria, *et al.*, Soil Biol. Biochem. *29*: 819-830 (1997). Os exemplos destas parcerias simbióticas de bactérias/legume incluem *S. meliloti*/alfafa e melioloto; *R. leguminosarum biovar viciae*/ervilhas e lentilhas; *R. leguminosarum biovar phaseoli*/feijões; *Bradyrhizobium japonicum*/sojas; e *R. leguminosarum biovar trifolii*/trevo vermelho. Hungria Também lista os indutores do gene Nod de flavonóide eficazes das espécies rizobiáis e as estruturas de LCOs específicas que são produzidas pelas espécies de rizobiáis diferentes. Entretanto, A especificidade de LOC é apenas requerida para estabelecer a nodulação em legumes. Na prática da presente invenção, o uso de um dado LCO não é limitado ao tratamento de semente de seu parceiro de legume simbiótico, de modo a obter o crescimento da planta aumentado medido em termos de bushels/acre, número de raiz aumentado, comprimento de raiz aumentado, massa de raiz aumentada, volume de raiz aumentado e área de folha aumentada, comparada com as plantas colhidas a partir da semente não tratada, ou comparada com as plantas colhidas a partir da semente tratada com a molécula de sinal exatamente antes ou dentro de uma semana ou menos do plantio. Assim, por via de exemplo, um LCO obtido da *B. japonicum* pode ser usado para tratar semente de leguminosa outra que não soja e semente não leguminosa tal como milho. Como um outro exemplo, o LCO de ervilha obtenível a partir de *R. leguminosarum* ilustrado na Fig. 2 (designado LCO-V (C18: 1), SP104) pode ser usado para tratar semente de leguminosa outra que

não ervilha e não legumes também.

[00035] Também abrangido pela presente invenção é o uso de LCOs obtido (por exemplo, isolado e/ou purificado) a partir dos fungos micorrizais arbusculares, tais como fungos do grupo *Glomerocycota*, por exemplo, *Glomus intraradicus*. As estruturas de LCOs representativas obtidas a partir destes fungos são descritos na WO 2010/049751 e WO 2010/049751 (os LCOs aqui descritos também aludidos como "Fatores de Myc").

[00036] Abrangido ainda pela presente invenção é o uso de compostos de LCO sintéticos, tais como aqueles descritos na WO 2005/063784 e LCO's recombinantes produzidos através da engenharia genética. A estrutura de LCO básica, que ocorre naturalmente pode conter modificações ou substituições encontradas 'nos LCOs que ocorrem naturalmente LCO's, tais como aqueles descritos na Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. *54*: 257-288 (2000) e D'Haeze, *et al.*, Glycobiology *12*: 79R-105R (2002). As moléculas precursoras de oligossacarídeo (COs, que como descritos abaixo, são também úteis como moléculas de sinal de planta na presente invenção) para a construção de LCOs também podem ser sintetizadas no geral pelo organismo engendrado, por exemplo, como em Samain, *et al.*, Carb. Res. *302*: 35-42 (1997).

[00037] Os LCO's podem ser utilizados em várias formas de pureza e podem ser usados sozinhos ou na forma de uma cultura de bactérias ou fungos que produzem o LCO. Por exemplo, OPTIMIZE® (comercialmente disponível da Novozymes BioAg Limited) contém uma cultura de *B. japonicum* que produz um LCO (LCO-V(C18: 1, MeFuc), MOR116) que está ilustrado na Fig. 1. Os métodos para fornecer os LCO's substancialmente puros incluem simplesmente remover as células microbianas de uma mistura dos LCOs e do micróbio, ou continuar a isolar e purificar as moléculas de LCO através da separação de fase do solvente de LCO seguido pela cromatografia de HPLC como descrito, por exemplo, na Patente U.S. 5.549.718. A purificação pode

ser aumentada pela HPLC repetida e as células de LCO purificadas podem ser secadas por congelamento para a armazenagem de longa duração.

[00038] As quitinas e quitosanas, que são componentes principais das paredes celulares de fungos e dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, também são compostos de resíduos de GIcNAc. Os compostos quitinosos incluem quitina, (IUPAC: N-[5-[[3-acetilamino-4,5-diidróxi-6-(hidróxi-metil)oxan-2il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-diidróxi-2-(hidróxi-metil)oxan-3-yI]metoximetil]-4-hidróxi-6-(hidroximetil)oxan-3-ys]-etanamida) e quitosano, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-diidróxi-2(hidroximetil)oxan-3-il]óxi-4-hidróxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]óxi-2(hidroximetil)oxane-3,4-diol). Estes compostos podem ser obtidos comercialmente, por exemplo, da Sigma-Aldrich, ou preparados a partir dos insetos, cascas de crustáceos, ou paredes de célula fúngica. Os métodos para a preparação de quitina e quitosano são conhecidos na técnica e foram descritos, por exemplo, na Patente U.S. 4.536.207 (preparação a partir das cascas de crustáceos), Pochanavanich, *et al.*, Lett. Appl. Microbiol. *35*: 17-21 (2002) (preparação a partir das paredes de célula fúngica) e Patente U.S. 5.965.545 (preparação a partir das cascas de caranguejo e hidrólise de quitosina comercial). As quitinas e quitosanos desacetilados podem ser obtidos que varia de menos do que 35 % a mais do que 90 % de desacetilação e abrange um amplo espectro de pesos moleculares, por exemplo, oligômeros de quitosano de peso molecular baixo de menos do que 15 kD e oligômeros de quitina de 0,5 a 2 kD; "grau prático" quitosano com um peso molecular de cerca de 150 kD; e quitosano de peso molecular alto de até 700 kD. As composições de quitina e quitosano formuladas para o tratamento de semente também estão comercialmente disponíveis. Os produtos comerciais incluem, por exemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) e BEYOND® (Agrihouse, Inc.).

[00039] Ainda outros compostos quitinosos que são adequados para o

uso na presente invenção incluem COs (por exemplo, isolado e/ou purificado). Os COs são conhecidos na técnica como estruturas de N-acetilglicosamina ligadas em β-1-4 identificadas como oligômeros de quitina, também como N-acetilquitooligossacarídeos. Os CO's têm decorações de cadeia lateral únicas e diferentes que as tornam diferentes das moléculas de quitina [$(C_8H_{13}NO_5)n$, CAS No. 1398-61-4] e moléculas de quitosano [$(C_5H_{11}NO_4)n$, CAS No. 9012-76-4]. A literatura de representação que descreve a estrutura e a produção dos COs é como segue: Van der Holst, *et al.*, Current Opinion in Structural Biology, *11: 608-616* (2001); Robina, *et al.*, Tetrahedron *58: 521-530* (2002); Hanel, *et al.*, Planta *232: 787-806* (2010); Rouge, *et al.* Capítulo 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" em Advances in Experimental Medicine e Biology, Springer Science; Wan, *et al.*, Plant Cell *21*: 1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (21/9/2000); e Demont-Caulet, *et al.*, Plant Physiol. *120(1)*: 83-92 (1999). Os dois COs adequados para o uso na presente invenção podem ser facilmente derivados dos LCOs mostrados nas Figuras 1 e 2 (menos as cadeias de ácido graxo), que são os precursores de CO para os LCOs mostrados nas Figuras 1 e 2. Os métodos para a preparação de COs recombinantes são conhecidos na técnica. *Ver*, por exemplo, Samain, *et al.* (*supra.*); Cottaz, *et al.*, Meth. Eng. *7(4)*: 311-7 (2005) e Samain, *et al.*, J. Biotechnol. *72*: 33-47 (1999).

[00040] Os flavonoides são compostos fenólicos tendo a estrutura geral de dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos. Os flavonoides são produzidos pelas plantas e têm muitas funções, por exemplo, como moléculas de sinalização benéficas e como proteção contra insetos, animais, fungos e bactérias. As classes de flavonoides incluem calconas, antocianidinas, coumarinas, flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas e isoflavonas. *Ver*, Jain, *et al.*, J. Plant Biochem. & Biotechnol. *11*: 1-10 (2002); Shaw, *et al.*, Environmental Microbiol. *11*: 1867-80 (2006).

[00041] Os flavonoides representativos que podem ser úteis na prática

da presente invenção incluem genisteína, daidzeína, formononetina, naringenina, hesperetina, luteolina e apigenina. Os compostos flavonoides são comercialmente disponíveis, por exemplo, da Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA. Os compostos flavonoides podem ser isolados das plantas ou sementes, por exemplo, como descrito na Patente U.S. 5.702.752; 5.990.291; e 6.146.668. Os compostos flavonoides também podem ser produzidos no geral pelo organismo engendrado, tal como levedura, como descrito na Ralston, *et al.*, Plant Physiology *137*: 1375-88 (2005).

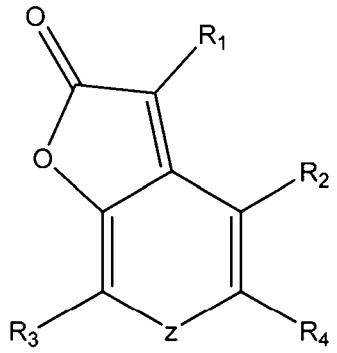
[00042] Em outras formas de realização, as sementes são tratadas com ácido jasmonóico (JA, ácido [1R-[1α,2β(Z)]]-3-oxo-2-(pentenil)ciclo-pentanoacético) e seus derivados, ácido linoléico (ácido(Z,Z)-9,12-Octadecadiênico) e seus derivados e ácido linolênico (ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienóico) e seus derivados. O ácido jasmonóico e seu éster metílico, jasmonato de metila (MeJA), coletivamente conhecidos como jasmonatos, são compostos com base em octadecanóides que ocorrem naturalmente em plantas. O ácido jasmonóico é produzido pelas raízes de mudas de trigo e pelos os micro-organismos fúngicos tais como *Botryodiplodia theobromae* e *Gibbrella fujikuroi*, levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e cepas patogênicas e não patogênicas de *Escherichia coli*. O ácido linoléico e ácido linolêncio são produzidos no Curso da biossíntese do ácido jasmonóico. Os jasmonatos, ácido linoléico e ácido linoléico (e seus derivados) são relatados ser indutores da expressão do gene *nod* ou produção de LCO pelas rizobactérias. *Ver*, por exemplo, Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*, 17 de maio de 2001; e Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*," USDA 3, 17 de maio de 2001.

[00043] Os derivados úteis do ácido linoléico, ácido linolêncio e ácido jasmonóico que podem ser úteis na prática da presente invenção incluem

ésteres, amidas, glicosídeos e sais. Os ésteres representativos são compostos em que o grupo carboxila do ácido linoléico, ácido linolêncio, ou ácido jasmonóico foi substituído com um grupo --COR, onde R é um grupo --OR^1, em que R^1 é: um grupo alquila, tal como um grupo alquila C_1-C_8 não ramificado ou ramificado, por exemplo, um grupo metila, etila ou propila; um grupo alquenila, tal como um grupo alquenila C_2-C_8 não ramificado ou ramificado; um grupo alquinila, tal como um grupo alquinila C_2-C_8 não ramificado ou ramificado; um grupo arila tendo, por exemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; ou um grupo heteroarila tendo, por exemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, em que os heteroátomos no grupo heteroarila podem ser, por exemplo, N, O, P, ou S. As amidas representativas são compostos em que o grupo carboxila do ácido linoléico, ácido linolêncio, ou ácido jasmonóico foi substituído com um grupo --COR, onde R é um grupo NR^2R^3, em que R^2 e R^3 são independentemente: hidrogênio; um grupo alquila, tal como um grupo alquila C_1-C_8 não ramificado ou ramificado, por exemplo, um grupo metila, etila ou propila; um grupo alquenila, tal como um grupo alquenila C_2-C_8 não ramificado ou ramificado; um grupo alquinila, tal como um grupo alquinila C_2-C_8 não ramificado ou ramificado; um grupo arila tendo, por exemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; ou um grupo heteroarila tendo, por exemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, em que os heteroátomos no grupo heteroarila podem ser, por exemplo, N, O, P, ou S. Os ésteres podem ser preparados pelos métodos conhecidos, tais como adição nucleofílica catalisada por ácido, em que o ácido carboxílico é reagido com um álcool na presença de uma quantidade catalítica de um ácido mineral. As amidas também podem ser preparadas pelos métodos conhecidos, tais como pela reação do ácido carboxílico com a amina apropriada na presença de um agente de ligação tal como dicicloexil-carbodiimida (DCC), sob condições neutras. Os sais do ácido linoléico, ácido linolêncio e ácido jasmonóico adequados incluem, por exemplo, sais de adição de base. As bases que podem ser usadas como reagentes para preparar

sais de base metabolicamente aceitáveis destes compostos incluem aqueles derivados de cátions tais como cátions de metal alcalino (por exemplo, potássio e sódio) e cátions de metal alcalino terroso (por exemplo, cálcio e magnésio). Estes sais podem ser facilmente preparados misturando-se juntas uma solução do ácido linoléico, ácido linolêncio, ou ácido jasmonóico com uma solução da base. O sal pode ser precipitado a partir da solução e ser coletado pela filtração ou pode ser recuperado por outro meio tal como pela evaporação do solvente.

[00044] Em outras formas de realização, as sementes são tratadas com uma 4H-pirona vinílica, por exemplo, 2H-furo[2,3-c]piran-2-onas incluindo derivados e análogos da mesma, os exemplos dos quais são representados pela estrutura que segue:



[00045] em que; Z é O, S ou NR_5; R_1, R_2, R_3 e R_4 são cada um independentemente H, alquila, alquenila, alquinila, fenila, benzila, hidróxi, hidroxialquila, alcóxi, fenilóxi, benzilóxi, CN, COR_6, COOR =, halógeno, NR_6R_7, ou NO_2; e R_5, R_6 e R_7 são cada um independentemente H, alquila ou alquenila, ou um sal biologicamente aceitável dos mesmos. Os exemplos de sais biologicamente aceitáveis destes compostos podem incluir sais de adição de ácido formados com ácidos biologicamente aceitáveis, exemplos dos quais incluem cloridreto, bromidreto, sulfato ou bissulfato, fosfato ou hidrogeno fosfato, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartarato, gliconato; metanossulfonato, benzenossulfonato e ácido p-toluenossulfônico. Os sais metálicos biologicamente aceitáveis adicionais podem incluir sais de metal alcalino, com bases, exemplos dos quais incluem

os sais de sódio e potássio. Os exemplos de compostos abrangidos pela estrutura e que podem ser adequados para o uso na presente invenção incluem o que segue: 3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde $R_1 = CH_3$, R_2, R_3, R_4 = H), 2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, R_2, R_3, R4 = H), 7-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, R_2, R_4 = H, $R_3 = CH_3$), 5-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, R_2, R_3 = H, $R_4 = CH_3$), 3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, $R_3 = CH_3$, R_2, R_4 = H), 3,5-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, $R_4 = CH_3$, R_2, R_3 = H), 3,5,7-trimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, R_3, $R_4 = CH_3$, R_2 = H), 5-metoximetil-3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde $R_1 = CH_3$, R_2, R_3 = H, $R_4 = CH_2OCH_3$), 4-bromo-3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (onde R_1, $R_3 = CH_3$, R_2 = Br, R_4 = H), 3-metilfuro[2,3-c]piridin-2(3H)-ona (onde Z = NH, $R_1 = CH_3$, R_2, R_3, R_4 = H), 3,6-dimetil-furo[2,3-c]piridin-2(6H)-ona (onde Z = N--CH_3, R_1 = CH_3, R_2, R_3, R_4 = H). *Ver*, Patente U.S. 7.576.213. Estas moléculas também são conhecidas como carriquinas. *Ver*, Halford, *supra.*

[00046] As sementes podem ser tratadas com a molécula de sinal de planta em vários modos, mas preferivelmente por intermédio de pulverização ou gotejamento. O tratamento por pulverização e gotejamento pode ser conduzido pela formulação da quantidade eficaz da molécula de sinal de planta em um carregador agricolamente aceitável, tipicamente aquoso por natureza e pulverizando ou gotejando a composição sobre a semente por intermédio de um sistema de tratamento contínuo (que é calibrado para aplicar o tratamento em uma taxa predefinida em proporção ao fluxo contínuo da semente), tal como um do tipo de tambor de tratador. Estes métodos vantajosamente utilizam volumes relativamente pequenos de carregador assim como permitir para a secagem relativamente rápida da semente tratada. Neste uso, volumes grandes da semente podem ser eficazmente tratados. Os sistemas de batelada, em que um tamanho de lote predeterminado de semente e de composições de molécula de sinal são liberados dentro de um misturador,

também podem ser utilizados. Os sistemas e aparelhos para realizar estes processos são comercialmente disponíveis de numerosos fornecedores, por exemplo, Bayer CropScience (Gustafson).

[00047] Em outra forma de realização, o tratamento acarreta necessariamente revestir as sementes. Tal processo envolve revestir a parede interna de um recipiente redondo com a composição, adicionar as sementes, depois girar o recipiente para fazer com que as sementes contatem a parede e a composição, um processo conhecido na técnica como "revestir o recipiente". As sementes podem ser revestidas pelas combinações de métodos de revestir. A impregnação tipicamente acarreta necessariamente o uso de uma solução aquosa que contém o agente que realça o crescimento da planta. Por exemplo, as sementes podem ser impregnadas por cerca de 1 minuto a cerca de 24 horas (por exemplo, por pelo menos 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas). Alguns tipos de sementes (por exemplo, as sementes de soja) tendem a ser indutoras sensíveis a umidade. Assim, a impregnação de tais sementes por um período de tempo prolongado pode não ser desejado, caso este em que a impregnação é tipicamente realizada por cerca de 1 minute a cerca de 20 minutes.

[00048] Sem intenção de estar ligado por qualquer teoria particular de operação, os Requerentes acreditam que mesmo no grau em que o tratamento possa não fazer com que a molécula de sinal de planta permaneça em contato com as sementes da superfície depois do tratamento e durante qualquer parte da armazenagem, a molécula de sinal pode obter os efeitos pretendidos por um fenômeno conhecido como memória de semente ou percepção de semente. *Ver*, Macchiavelli e Brelles-Marino, J. Exp. Bot. *55(408)*: 2635-40 (2004). Os requerentes também acreditam que a seguir do tratamento a molécula de sinal, por exemplo, o LCO, difunde para a radícula em desenvolvimento jovem e ativa os genes simbióticos e de desenvolvimento que resulta em uma mudança na arquitetura da raiz da planta. Não obstante, as

composições que contêm a molécula de sinal de planta podem conter ainda um agente de adesão ou revestimento para ajudar na aderência da molécula de sinal à semente. Para o propósito estético, as composições podem conter ainda um polímero de revestimento e/ou um corante.

[00049] A quantidade eficaz da molécula de sinal de planta usada para tratar as sementes, expressada em unidades de concentração, no geral as faixas de cerca de 10^{-5} a cerca de 10^{-14} M e em algumas formas de realização, de cerca de 10^{-5} a cerca de 10^{-11} M e em algumas outras formas de realização de cerca de 10^{-7} a cerca de 10^{-8} M. Expressada em unidades em peso, a quantidade eficaz no geral as faixas de cerca de 1 a cerca de 400 μg/peso de cem sementes (cwt) e em algumas formas de realização de cerca de 2 a cerca de 70 μg/cwt e em algumas outras formas de realização, de cerca de 2,5 a cerca de 3,0 μg/cwt de sementes. A quantidade eficaz da molécula de sinal de planta, entretanto, pode ser obtida por um ensaio de resposta de dosagem adequado, preferivelmente, em uma estufa de plantas e/ou estudo de campo.

[00050] O tratamento também pode envolver contatar as sementes, prior, simultaneamente com ou sequencialmente para contatar com a molécula de sinal de planta, com um agente agrícola/agronomicamente benéfico. Como aqui usado e na técnica, o termo "agrícola ou agronomicamente benéfico" refere-se a agentes que quando aplicados às sementes resulta em realce (que pode ser estatisticamente significante) de características de planta tais como posição da planta, crescimento, vigor ou rendimento em comparação com as sementes não tratadas. Os exemplos representativos de tais agentes que podem ser úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitados a, diazótrofos, fungos micorrizais, herbicidas, fungicidas, inseticidas e agente que solubiliza fosfatos.

[00051] Os herbicidas incluem bentazona, acifluorfen, clorimuron, lactofen, clomazona, fluazifop, glifosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafe, flumiclorac, imazaquin e cletodim. Os produtos

comerciais que contêm cada um destes compostos são facilmente disponíveis. A concentração de herbicida na composição no geral corresponderá a taxa de uso rotulada para um herbicida particular.

[00052] Um "fungicida" como aqui usado e na técnica, é um agente que mata ou inibe o crescimento fúngico. Como aqui usado, um fungicida "exibe atividade contra" uma espécie particular de fungos se o tratamento com o fungicida resulta em matar ou inibir o crescimento de uma população de fungo (por exemplo, no solo) relativo a uma população não tratada. Os fungicidas eficazes de acordo com a invenção adequadamente exibirão atividade contra uma faixa ampla de patógenos, incluindo mas não limitados a *Phytophthora, Rhizoctonia, Fusarium, Pythium, Phomopsis* ou *Selerotinia* e *Phakopsora* e combinações dos mesmos.

[00053] Os fungicidas comerciais podem ser adequados para o uso na presente invenção. Os fungicidas comercialmente disponíveis adequados incluem PROTÉGÉ, RIVAL ou ALLEGIANCE FL ou LS (Gustafson, Plano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA ou RFC, MAXIM 4FS ou XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontário) e PROTRATAR (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina). Os ingredientes ativos nestes e outros fungicidas comerciais incluem, mas não são limitados a, fludioxonila, mefenoxam, azoxistrobin e metalaxil. Os fungicidas comerciais são mais adequadamente usados de acordo com as instruções do fabricante nas concentrações recomendadas.

[00054] Como aqui usado, um inseticida "exibe atividade contra" uma espécie particular de inseto se o tratamento com o inseticida resulta em morte ou inibição de uma população de inseto relativo a uma população não tratada. Os inseticidas eficazes de acordo com a invenção adequadamente exibirão atividade contra uma faixa ampla de insetos incluindo, mas não limitada a, *Phytophthora, Rhizoctonia, Fusarium, Pythium, Phomopsis* ou *Selerotinia* e

Phakopsora e combinações dos mesmos.

[00055] Os inseticidas comerciais podem ser adequados para o uso na presente invenção. Os inseticidas comercialmente disponíveis adequados incluem CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO e PONCHO (Gustafson, Plano, TX). Os ingredientes ativos nestes e outros inseticidas comerciais incluem tiametoxam, clotianidin e imidacloprid. Os inseticidas comerciais são mais adequadamente usados de acordo com as instruções do fabricante nas concentrações recomendadas.

[00056] Como aqui usado, os agentes que solubilizam o fosfato incluem, mas não são limitados a, os micro-organismos que solubilizam o fosfato. Como aqui usado, "micro-organismo que solubiliza o fosfato" é um micro-organismo que é capaz de aumentar a quantidade de fósforo disponível parar uma planta. Os micro-organismos que solubilizam o fosfato incluem cepas fúngicas e bacterianas. Em forma de realização, o micro-organismo que solubiliza o fosfato é um esporo que forma micro-organismo.

[00057] Os exemplos não limitantes dos micro-organismos que solubilizam o fosfato incluem espécies de um gênero selecionado do grupo que consiste de *Acinetobacter, Arthrobacter, Arthrobotrys, Aspergillus, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia, Candida Chryseomonas, Enterobacter, Eupenicillium, Exiguobacterium, Klebsiella, Kluyvera, Microbacterium, Mucor, Paecilomyces, Paenibacillus, Penicillium, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas, Streptomyces, Streptosporangium, Swaminathania, Thiobacillus, Torulospora, Vibrio, Xanthobacter e Xanthomonas*.

[00058] Os exemplos não limitantes dos micro-organismos que solubilizam o fosfato são selecionado do grupo que consiste de *Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter sp, Arthrobacter sp., Arthrobotrys oligospora, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Azospirillum halopraeferans, Bacillus amiloliquefaciens, Bacillus atrophaeus, Bacillus circulans,Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Burkholderia cepacia, Burkholderia*

vietnamiensis, Candida krissii, Chryseomonas luteola, Enterobacter aerogenes, Enterobacter asburiae, Enterobacter sp., Enterobacter tailorae, Eupenicillium parvum, Exiguobacterium sp., Klebsiella sp., Kluyvera cryocrescens, Microbacterium sp., Mucor ramosissimus, Paecilomyces hepialid, Paecilomyces marquandii, Paenibacillus macerans, Paenibacillus mucilaginosus, Pantoea aglomerans, Penicillium expansum, Pseudomonas corrugato, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas lutea, Pseudomonas poae, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas trivialis, Serratia marcescens, Stenotrophomonas maltophilia, Streptomyces sp., Streptosporangium sp., Swaminathania salitolerans, Thiobacillus ferrooxidans, Torulospora globosa, Vibrio proteolyticus, Xanthobacter agilis e Xanthomonas campestris

[00059] Preferivelmente, o micro-organismo que solubiliza o fosfato é uma cepa dos fungos *Penicillium.* Cepas dos fungos *Penicillium* que podem ser úteis na prática da presente invenção incluem *P. bilaiae* (antigamente conhecidos como *P. bilaii*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variabile*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus* e *P. expansum.*

[00060] Mais preferivelmente, o micro-organismo que solubiliza o fosfato da espécie *Penicillium* é *P. bilaiae, P. gaestrivorus*, e/ou uma combinação dos mesmos. Pais preferivelmente, as cepas de *P. bilaiae* são selecionadas do grupo que consiste de ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin, *et al.*, 2004. Biol Fertil Soils 40: 36-43) e a cepa de *P. gaestrivorus* é NRRL 50170 (*ver*, Wakelin, *supra.*).

[00061] De acordo com a invenção, é previsto que mais do que um

micro-organismo que solubiliza o fosfato pode ser usado, tal como, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, incluindo qualquer combinação da *Acinetobacter, Arthrobacter, Arthrobotrys, Aspergillus, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia, Candida Chryseomonas, Enterobacter, Eupenicillium, Exiguobacterium, Klebsiella, Kluyvera, Microbacterium, Mucor, Paecilomyces, Paenibacillus, Penicillium, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas, Streptomyces, Streptosporangium, Swaminathania, Thiobacillus, Torulospora, Vibrio, Xanthobacter* e *Xanthomonas*, incluindo uma espécie selecionada do grupo que segue: *Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter sp, Arthrobacter sp., Arthrobotrys oligospora, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Azospirillum halopraeferans, Bacillus amiloliquefaciens, Bacillus atrophaeus, Bacillus circulans,Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Burkholderia cepacia, Burkholderia vietnamiensis, Candida krissii, Chryseomonas luteola, Enterobacter aerogenes, Enterobacter asburiae, Enterobacter sp., Enterobacter tailorae, Eupenicillium parvum, Exiguobacterium sp., Klebsiella sp., Kluyvera cryocrescens, Microbacterium sp., Mucor ramosissimus, Paecilomyces hepialid, Paecilomyces marquandii, Paenibacillus macerans, Paenibacillus mucilaginosus, Pantoea aglomerans, Penicillium expansum, Pseudomonas corrugato, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas lutea, Pseudomonas poae, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas trivialis, Serratia marcescens, Stenotrophomonas maltophilia, Streptomyces sp., Streptosporangium sp., Swaminathania salitolerans, Thiobacillus ferrooxidans, Torulospora globosa, Vibrio proteolyticus, Xanthobacter agilis e Xanthomonas campestris.*

[00062] Os diazótrofos são bactérias e *archaea* que fixam gás nitrogênio atmosférico em uma forma mais utilizável tal como amônia. Os exemplos de diazótrofos incluem bactérias dos gêneros *Rhizobium spp.* (por exemplo, *R. cellulosilyticum, R. daejeonense, R. etli, R. galegae, R. gallicum,*

R. giardinii, R. hainanense, R. huautlense, R. indigoferae, R. leguminosarum, R. loessense, R. lupini, R. lusitanum, R. meliloti, R. mongolense, R. miluonense, R. sullae, R. tropici, R. undicola, e/ou *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium spp.* (por exemplo, *B. bete, B. canariense, B. elkanii, B. iriomotense, B. japonicum, B. jicamae, B. liaoningense, B. pachyrhizi,* e/ou *B. yuanmingense*), *Azorhizobium spp.* (por exemplo, *A. caulinodans* e/ou *A. doebereinerae), Sinorhizobium spp. (por exemplo, S. abri, S. adhaerens, S. americanum, S. aboris, S. fredii, S. indiaense, S. kostiense, S. kummerowiae, S. medicae, S. meliloti, S. mexicanus, S. morelense, S. saheli, S. terangae,* e/ou *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium spp., (M. albiziae, M. amorphae, M. chacoense, M. ciceri, M. huakuii, M. loti, M. mediterraneum, M. pluifarium, M. septentrionale, M. temperatum,* e/ou *M. tianshanense*) e combinações dos mesmos. Em uma forma de realização particular, o diazótrofo é selecionado do grupo que consiste de *B. japonicum, R leguminosarum, R meliloti, S. meliloti* e combinações dos mesmos. Em outra forma de realização, o diazótrofo é *B. japonicum.* Em outra forma de realização, o diazótrofo é *R leguminosarum.* Em outra forma de realização, o diazótrofo é *R meliloti.* Em outra forma de realização, o diazótrofo é *S. meliloti.*

[00063] Os fungos micorrizais formam associações simbióticas com as raízes de uma planta vascular e fornece, por exemplo, capacidade absortiva para água e nutrientes minerais devido a área de superfície comparativamente grande de micélio. Os fungos micorrizais incluem fungos endomicorrizais (também chamados micorrizais arbusculares vesiculares, VAMs, micorrizais arbusculares, ou AMs), um fungo ectomicorrizal, ou uma combinação dos mesmos. Em uma forma de realização, os fungos micorrizais são endomicorrizais do filo *Glomeromicota* e gêneros *Glomus* e *Gigaspora.* Ainda em outra forma de realização, os endomicorrizais são uma cepa de *Glomus aggregatum, Glomus brasilianum, Glomus clarum, Glomus deserticola, Glomus etunicatum, Glomus fasciculatum, Glomus intraradices,*

Glomus monosporum, ou *Glomus mosseae, Gigaspora margarita*, ou uma combinação dos mesmos.

[00064] Os exemplos de fungos micorrizais incluem ectomicorrizais do filo *Basidiomicota, Ascomicota* e *Zygomicota*. Outros exemplos incluem uma cepa de *Laccaria bicolor, Laccaria laccata, Pisoliassim tinctorius, Rhizopogon amilopogon, Rhizopogon fulvigleba, Rhizopogon luteolus, Rhizopogon villosuli,* cepa *Scleroderma*, *Scleroderma citrinum*, ou uma combinação dos mesmos.

[00065] Os fungos micorrizais incluem *ecroid mycorrhizae, arbutoide mycorrhizae,* ou *monotropoid mycorrhizae*. Arbuscular e ectomicorrizais formam micorriza ericóide com muitas plantas pertencendo à ordem *Ericales*, embora alguns *Ericales* formem micorrizais arbutoídes e monotropóides. Em uma forma de realização, o micorriza pode ser um micorriza ericóide, preferivelmente do filo *Ascomicota*, tal como *Hymenoscyphous ericae* ou *Oidiodendron sp*. Em outra forma de realização, o micorriza também pode ser um micorriza arbutoíde, preferivelmente do filo *Basidiomicota*. Ainda em outra forma de realização, o micorriza pode ser um micorriza monotripóide, preferivelmente do filo *Basidiomicota*. Ainda em outra forma de realização, o micorriza pode ser um micorriza orquídea, preferivelmente do gênero *Rhizoctonia*.

[00066] Os métodos da presente invenção são aplicáveis à semente de leguminosa, os exemplos representativos dos quais incluem soja, alfafa, amendoim, ervilha, lentilha, feijão e trevo. Os métodos da presente invenção também são aplicáveis à semente não leguminosa, por exemplo, *Poaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae. Asteraceae, Chenopodiaceae e Solonaceae*. Os exemplos representativos de semente não leguminosa incluem vegetais de safra tais como milho, cereais tais como arroz, cevada e trigo, algodão e canola e safras de vegetal tais como batatas, tomates, pepinos, beterrabas, alface e cantalupo.

[00067] A seguir do tratamento e para o propósito de armazenagem, a semente é depois empacotada, por exemplo, em sacos de 50 lb (22,7 kg) ou 100 lb (45,4 kg), ou sacos ou recipientes a granel, de acordo com as técnicas padrão. A semente é armazenada por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 meses e ainda mais longo, por exemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 meses, ou ainda mais longo, sob condições de armazenagem apropriadas que são conhecidas na técnica. Como aqui usado, o termo "mês" deve significar 30 dias. Como aqui usado, um ano deve significar 365 dias. Considerando que a semente de soja possa ter que ser plantada na estação seguinte, a semente de milho pode ser armazenada por períodos muito mais longos de tempo incluindo por mais de 3 anos.

[00068] A molécula de sinal de planta ser aplicada em qualquer maneira adequada, tal como, na forma de uma composição de tratamento de semente que compreende pelo menos uma molécula de sinal de planta e um carregador agricolamente aceitável.

[00069] Qualquer carregador agricolamente aceitável adequado pode ser usado, por exemplo, um carregador sólido, carregador semi-sólido, um carregador líquido com base aquosa, um carregador líquido com base não aquosa, uma suspensão, uma emulsão ou um concentrado emulsificável. Os carregadores agricolamente aceitáveis podem incluir, por exemplo, adjuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensoativos, agentes de pegajosidade, aglutinantes, agentes estabilizantes, e/ou polímeros.

[00070] A composição de tratamento da semente pode incluir ainda um ou mais agentes agrícolas/agronomicamente benéficos (isto é, além da molécula de sinal), tal como, um ou mais diazótrofos, fungos micorrizais, herbicidas, fungicidas, inseticidas, e/ou agente que solubiliza fosfatos.

[00071] A presente invenção será agora descrita por via dos exemplos não limitantes que seguem. Eles são apresentados unicamente para o

propósito de ilustração e não são intencionados a limitar a invenção de nenhum modo.

Sumário dos Exemplos de Trabalho

[00072] Os exemplos 1 e 2 descrevem experimentos de campo comparativos usando semente de soja que demonstram que a invenção reivindicada obtém o crescimento da planta aumentado. A semente foi tratada de acordo com a presente invenção a 5 meses antes do plantio com o produto comercial Optimize® que é uma combinação de inoculante de *Bradyrhizobium japonicum* LCO-V (C18: 1, MeFuc) (ilustrado na Fig. 1) e com o LCO puro sozinho e a 4,5 meses antes do plantio com os graus não comerciais (isto é menos puros) de Optimize® e o LCO sozinho e para o propósito de comparação com aquela mesma molécula de sinal de planta no tempo de plantação. A semente não tratada foi usada como outro controle. Os resultados, que são expressos em termos de diferença em rendimento em grão, medidos em unidades de bushels/acre, mostram que os métodos da invenção reivindicada obtiveram um aumento no rendimento de soja, em relação aos métodos não inventivos (isto é, semente tratada em tempo de plantação e semente não tratada).

[00073] Os exemplos 3 e 4 descrevem os experimentos comparativos conduzidos na estufa e que demonstram que a invenção reivindicada obtém aumentos em outras características de crescimento da planta. O exemplo 3 descreve um experimento que acarretou necessariamente o tratamento de semente de soja com LCO-V puro (C18: 1, MeFuc) um mês e um ano antes do plantio. As plantas de soja (incluindo raízes) foram colhidas dez dias depois do plantio. Os resultados, que são descritos em termos de diferenças no comprimento e volume da raiz, mostram que os métodos da presente invenção obtiveram aumentos dramáticos nestas propriedades. Por último, o Exemplo 4 descreve experimentos conduzidos com semente de soja tratada com Optimize® 55 dias antes do plantio e para o propósito de comparação, a

semente de soja tratada 7 dias antes do plantio e semente não tratada. Os resultados, expressados em unidades da área de superfície média das primeiras folhas trifoliadas, mostraram que a invenção reivindicada realça o crescimento da planta também neste aspecto.

EXEMPLO 1

[00074] Um teste de campo foi conduzido para avaliar formas de realização da presente invenção em rendimento em grão quando aplicado em semente de soja. O sítio de teste de campo foi localizado próximo a Whitewater, WI e caracterizado por solo limo-argiloso siltoso Milford. Teste de solo, conduzido seis meses antes do plantio, mostrou um solo de pH de 6,,8, um teor de matéria orgânica de 5,3 % e teores de fósforo e potássio de 39 ppm e 139 ppm, respectivamente.

[00075] As moléculas de sinal de planta usadas no teste foi Optimize®, um grau não comercial de Optimize® (NI-50S-1), LCO-V puro (C18: 1, MeFuc) (NI-50GREN-1) e um grau não comercial de LCO-V (C18: 1, MeFuc) (NI-50S-2CF). A semente de soja usada no estudo foi Stine S2118. A moléculas de sinal de planta foram pulverizadas sobre as sementes com/sem diluição em uma taxa de 4,8 fl oz (142 cm^3)/cwt.

[00076] O estudo foi conduzido em um planejamento de bloco completo randomizado, com um tamanho de canteiro de 10 pés por 50 pés (3 metros por 15 metros) (0,011 acres), com espaçamento de fileira 7,5 polegadas (19 cm). Quatro réplicas foram conduzidas. A semente foi tratada com a moléculas de sinal de planta 4,5 ou 5 meses antes do plantio e exatamente antes de plantar e foram plantadas em uma profundidade de 1 polegada (2,5 cm) e a uma taxa de muda de 225.000 sementes por acre usando uma semeadora de grão John Deere 750 NT. Os pesticidas Extreme® e AMPS® foram ambos aplicados 11 dias antes do plantio (pré-emergência) em taxas de 3,0 pt e 2,5 lb (1,1 kg), respectivamente. Assure II®, Roundup WeatherMax® e AMPS® foram todos aplicados 46 dias pós plantio (pós

emergente), em taxas de 6,0 oz (177 ml), 21 oz (621 ml) e 2,5 lb (1,1 kg), respectivamente. As plantas foram colhidas 4 meses e 20 dias depois do plantio.

[00077] A semente de controle foi tratada com quantidade (wt) de água, que corresponde a quantidade (wt) da composição experimental da molécula de sinal (molécula de sinal + carregador). A semente de controle foi armazenada sob as mesmas condições como a semente experimental antes do plantio e plantada ao mesmo tempo como a semente experimental no mesmo solo.

[00078] Os resultados do estudo são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

	GRUPO DE TRATAMENTO	RENDIMENTO EM GRÃO @ 13 %
1	Controle - não inoculado	62,5
2	Otimizado - no plantio	64,2
3	Otimizado - 5 mês	65,7
4	NI-50GREN-1 - No plantio	62,2
5	NI-50GREN-1 - 5 mês	70,5
6	NI-50S-1 - 4,5 mês	67,2
7	NI-50S-2CF - 4,5 mês	69,6

[00079] Como refletido pela comparação entre o Grupo comparativo 2 (não inventivo) e o Grupo comparativo 3, tratamento d a semente de soja com o grau comercial Otimize® em 5 meses de pré plantação resultou em um aumento no rendimento da soja de 1,5 bushels de soja. Como refletido pela comparação entre o Grupo 4 o Grupo inventivo 5, o tratamento de semente de soja em 5 meses de pré plantação com LCO-V puro (C18: 1, MeFuc) sozinho resultou em um aumento no rendimento da soja de 8,3 bushels/acre. Como refletido pela comparação entre o Grupo 2 e o Grupo inventivo 6, o tratamento das sementes de soja 4,5 meses antes do plantio com de grau não comercial de Otimize® resultou em um aumento no rendimento da soja de 3,0 bushels/acre. Por último, como mostrado pela comparação entre o Grupo 4 e o Grupo inventivo 7, o tratamento das sementes de soja com grau não comercial de LCO-V (C18: 1, MeFuc) sozinho 4,5 meses de pré plantação aumentou o

rendimento da soja em 7,4 bushels/acre. As medições do rendimento em grão foram tiradas em um nível de umidade de semente de 13 %.

EXEMPLO 2

[00080] Um teste com soja foi conduzido para avaliar as formas de realização da presente invenção no rendimento em grão quando aplicadas em semente de soja. O sítio de teste de campo foi localizado próximo a Whitewater, WI e caracterizado por solo limo-argiloso siltoso Milford. O teste de solo, conduzido seis meses antes do plantio, mostrou um solo de pH de 6,6, um teor de matéria orgânica de 4,8 % e teores de fósforo e potássio de 41 ppm e 131 ppm, respectivamente.

[00081] As moléculas de sinal de planta usadas no teste foram as mesmas como no Exemplo 1. A semente de soja usada no estudo foi Stine S2118. As moléculas de sinal de planta foram pulverizadas sobre as sementes com/sem diluição em uma taxa de 4,8 fl oz (142 cm^3)/cwt.

[00082] O estudo foi conduzido em um planejamento de bloco completo randomizado, com um tamanho de canteiro de 10 pés por 50 pés (3 metros por 15 metros) (0,011 acres), com espaçamento de fileira de 7,5 polegadas (19 cm). Quatro réplicas foram conduzidas. As sementes foram tratadas com as moléculas de sinal de planta 4,5 ou 5 meses antes do plantio e exatamente antes de plantar e foram plantadas em uma profundidade de 1 polegada (2,5 cm) e a uma taxa de muda de 225.000 sementes por acre usando uma semeadora de grão John Deere 750 NT. Os pesticidas Extreme® e AMPS® foram ambos aplicados 10 dias antes do plantio (pré-emergência) em taxas de 3,0 pt e 2,5 lb (1,1 kg), respectivamente. Assure II®, Roundup WeatherMax® e AMPS® foram todos aplicados 45 dias após o plantio (pós emergente), em taxas de 6,0 oz (177 ml), 21 oz (621 ml) e 2,5 lb (1,1 kg), respectivamente. As plantas foram colhidas 4 meses e 21 dias depois do plantio.

[00083] A semente de controle foi tratada com quantidade (wt) de

água, que corresponde à quantidade (wt) da composição experimental da molécula de sinal (molécula de sinal + carregador). A semente de controle foi armazenada sob as mesmas condições como a semente experimental antes do plantio e plantada ao mesmo tempo como a semente experimental no mesmo solo.

[00084] Os resultados do estudo são mostrados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

	GRUPO DE TRATAMENTO	RENDIMENTO EM GRÃO @ 13 %
1	Controle - não inoculado	62,4
2	Otimizado - no plantio	64,1
3	Otimizado - 5 mês	68,6
4	NI-50GREN-1 - No plantio	65,8
5	NI-50GREN-1 - 5 mês	64,0
6	NI-50S-1 - 4,5 mês	69,4
7	NI-50S-2CF - 4,5 mês	66,6

[00085] Como refletido pela comparação entre o Grupo comparativo 2 (não inventivo) e o Grupo comparativo 3, tratamento da semente de soja com o grau comercial de Otimize® em 5 meses da pré plantação resultou em um aumento no rendimento da soja de4,5 bushels de soja. Como refletido pela comparação entre o Grupo 2 e o Grupo inventivo 6, o tratamento das sementes de soja 4,5 meses antes do plantio com o grau não comercial de Otimize® resultou em um aumento no rendimento da soja de 5,3 bushels/acre. Como mostrado pela comparação entre o Grupo 4 e o Grupo inventivo 7, o tratamento das sementes de soja com o grau não comercial de LCO-V (C18: 1, MeFuc) sozinho 4,5 meses da pré plantação aumentou o rendimento da soja em 0,8 bushels/acre. A única resposta negativa como refletida pela comparação entre o Grupo 4 não inventivo e o Grupo inventivo 5, mostrou que o tratamento da semente de soja em 5 meses de pré plantação com o LCO puro sozinho resultou em uma diminuição em 1,8 bushels/acre, um resultado atribuível à variabilidade não explicada associada com os testes de campo. As medições do rendimento em grão foram tiradas em um nível de umidade de semente de 13 %.

Experimentos em Estufa

EXEMPLO 3

[00086] As sementes de soja foram tratadas com 10^{-7} M de LCO-V puro (C18: 1, MeFuc) e armazenadas a 15 °C. As sementes tratadas e as sementes não tratadas (controle) foram plantadas 1 e 12 meses depois do tratamento em vasos de estufa contendo areia:perlita (mistura 1:1). As mudas foram cultivadas por 10 dias depois do plantio da semente depois as mudas foram colhidas, as suas raízes limpas e medidas no escâner Winrhizo®. A semente de controle foi tratada com quantidade (wt) de água, que corresponde à quantidade (wt) da composição experimental da molécula de sinal (molécula de sinal + carregador). A semente de controle foi armazenada sob as mesmas condições como a semente experimental antes do plantio e plantada ao mesmo tempo como a semente experimental no mesmo solo. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3

Tratamento	1 mês depois do tratamento		1 ano depois do tratamento	
	Comprimento da Raiz (cm)	Vol. Da Raiz (cm^3)	Comprimento da Raiz (cm)	Vol. Da Raiz (cm^3)
Controle	128	0,455	115,5	0,403
LCO	135*	0,468	159,3*	0,540*
% de aumento	5,46	2,86	37,92	34

[00087] Os resultados obtidos tanto pelas formas de realização inventivas (semente tratada com LCO em 1 mês e 12 meses antes do plantio) quanto particularmente os resultados obtidos depois do pré-tratamento de 1 ano, são dramáticos, considerando que é conhecido na técnica que a semente de soja é propensa a deteriorar durante este período de tempo.

EXEMPLO 4

[00088] As sementes de soja tratadas com Otimize® foram mantidas a 15 °C em um refrigerador. As sementes foram plantadas 7 (7 dpp) e 55 (55 dpp) dias depois do tratamento em caixas de raiz contendo uma mistura de turfa:perlita. A sua área de superfície da folha (cm^2) foi tomada da primeira

trifoliada depois de 19 dias. Como ilustrado na Fig. 3 e mostrado na Tabela 4, as folhas geradas a partir da semente tratada de acordo com a presente invenção teve um aumento médio maior de 50 % na área de superfície da folha comparada com a forma de realização não inventiva (42 % versus 28 %).

TABELA 4

	Média	ST DEV	Resposta	% de Resposta
UTC média	146,25	18,7539		
7 dpp média	187,05	29,8215	40,81	28 %
55 dpp média	207,18	20,5278	60,93	42 %

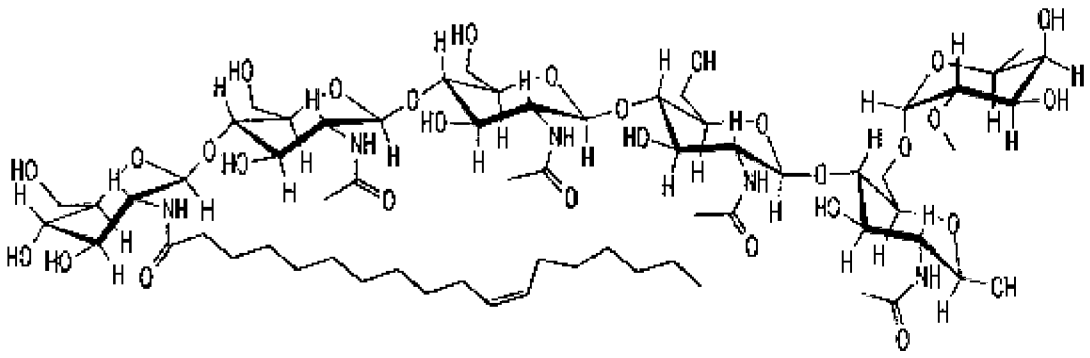
[00089] Visto que é conhecido que a contagem bacteriana (*Bradyrhizobium japonicum*) na semente diminui com o tempo, o aumento na área de superfície média mostrado em plantas geradas a partir das sementes tratadas 55 dias antes do plantio pode ser atribuível ao LCO rizobial.

[00090] Todas as publicações de patente e que não de patente citadas neste relatório descritivo são indicativos do nível de habilidade daqueles habilitados na técnica à qual esta invenção pertence. Todas estas publicações são aqui incorporadas por referência no mesmo grau como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicadas serem incorporadas por referência.

[00091] Embora a invenção aqui tenha sido descrita com referência às formas de realização particulares, deve ser entendido que estas formas de realização são meramente ilustrativas dos princípios e aplicações da presente invenção. Deve ser, portanto, entendido que numerosas modificações podem ser feitas às formas de realização ilustrativas e que outros arranjos podem ser planejados sem divergir do espírito e escopo da presente invenção como definido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar o crescimento e/ou rendimento de soja, caracterizado pelo fato de que compreende tratar semente de soja, 30 a 365 dias antes do plantio de dita semente em um meio de crescimento de planta, com um lipo-quitooligossacarídeo (LCO) representado pela estrutura



em uma quantidade eficaz para aumentar o crescimento e/ou rendimento das plantas de soja colhidas a partir das referidas sementes em comparação a plantas colhidas a partir de sementes controle tratadas com dito LCO no momento do plantio.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o LCO é obtido a partir de uma espécie de *Rhizobia*, opcionalmente, uma espécie de *Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium* ou *Sinorhizobium.*

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o LCO é obtido a partir de um fungo micorrizal arbuscular.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com uma quitina, uma quitosana, um flavonoide, ácido jasmônico ou um derivado do mesmo, ácido linoleico ou um derivado do mesmo, ácido linolênico ou um derivado do mesmo, e/ou uma carriquina.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com um ou mais fungicidas e/ou inseticidas.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com metalaxil, clotianidin, mefanoxam, fludioxonil, tiametoxam, e/ou imidacloprid.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o LCO é aplicado na forma de uma composição de tratamento de semente compreendendo o LCO e um veículo agricolamente aceitável.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com um ou mais diazótrofos.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com uma ou mais cepas de *Bradyrhizobium.*

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com uma ou mais cepas de *Rhizobium.*

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com uma ou mais cepas de *Sinorhizobium.*

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com um ou mais microrganismos que solubilizam fosfato.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, tratar a semente com uma ou mais cepas de *Penicillium.*

14. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a referida uma ou mais cepas de *Penicillium* compreende:

a cepa tendo número de acesso de depósito NRRL 50162;

a cepa tendo número de acesso de depósito NRRL 50169;

a cepa tendo número de acesso de depósito ATCC 20851;

a cepa tendo número de acesso de depósito ATCC 22348;

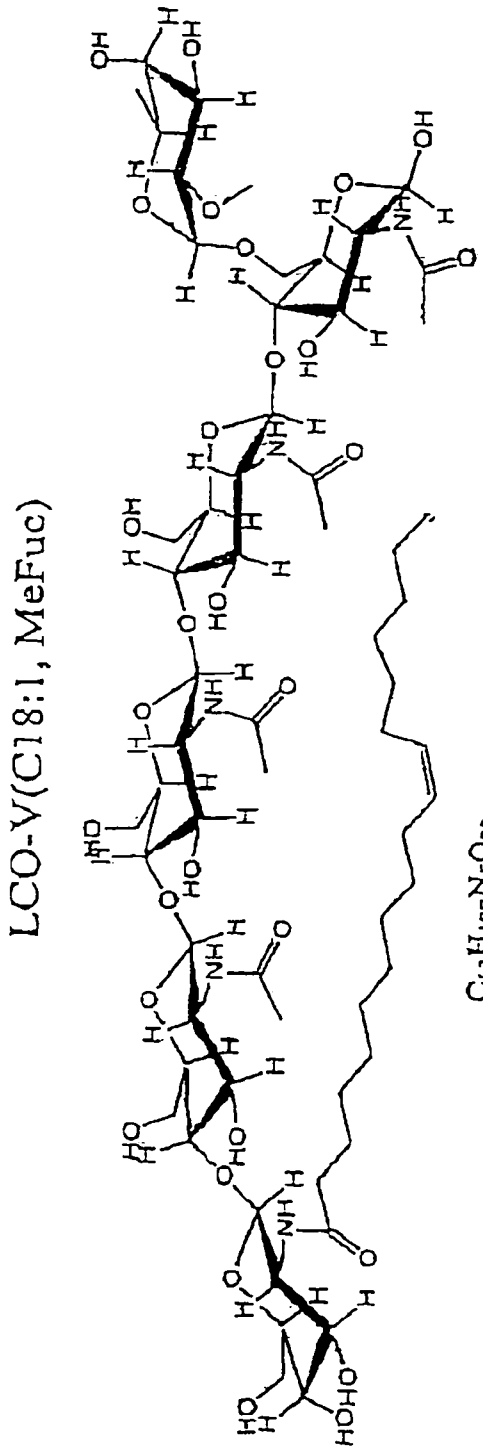
a cepa tendo número de acesso de depósito ATCC 18309.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as sementes são tratadas com LCO pelo menos 3 meses antes do plantio.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as sementes são tratadas com LCO pelo menos 6 meses antes do plantio.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as sementes são tratadas com LCO pelo menos 9 meses antes do plantio.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as sementes são tratadas com LCO pelo menos 12 meses antes do plantio.



LCO-V(C18:1, MeFuc)

$C_{63}H_{109}N_5O_{30}$
Massa Exata: 1415,72
Peso Molecular: 416,56
C, 53,42; H, 7,76; N, 4,94; O, 33,88

Fig. 1

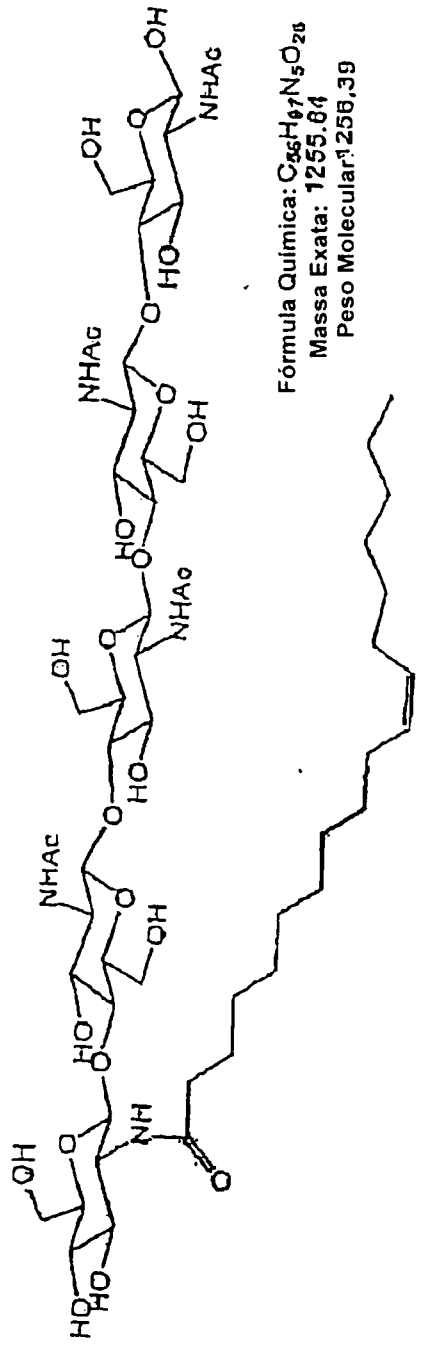

Fórmula Química: $C_{55}H_{97}N_5O_{28}$
Massa Exata: 1255,64
Peso Molecular: 1256,39

Fig. 2

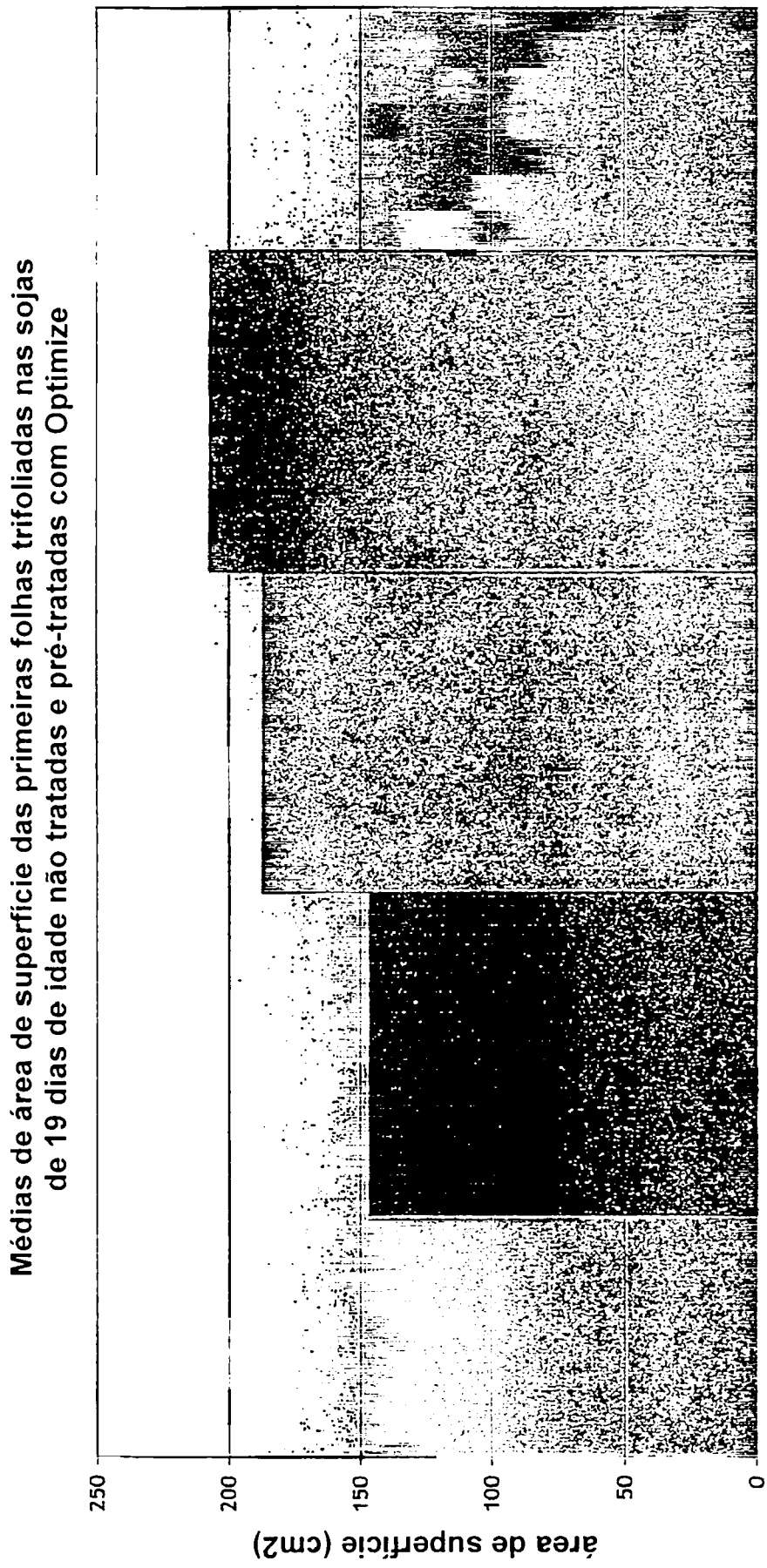

Médias de área de superfície das primeiras folhas trifoliadas nas sojas de 19 dias de idade não tratadas e pré-tratadas com Optimize
área de superfície (cm2)
250
200
150
100
50
0
UTC média
7 dpp média
55 dpp média

Fig. 3