



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

(21) **PI0611453-9 A2**

(22) Data de Depósito: 05/05/2006
(43) Data da Publicação: 08/09/2010
(RPI 2070)



* B R P I 0 6 1 1 4 5 3 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
G01N 33/50

(54) Título: **MÉTODO DE ENSAIO DA TOLERÂNCIA HERBICIDA EM UMA PLANTA**

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2005 US 60/677,985

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): S. Douglas Prosch, Steven T. Voss

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006017490 de 05/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/121902 de 16/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO DE ENSAIO DA TOLERÂNCIA HERBICIDA EM UMA PLANTA. A presente invenção refere-se a um método de avaliação de tolerância herbicida em uma planta. O método de determinação de tolerância herbicida em plantas compreende a aplicação do herbicida a ser testado em conjunção com pelo menos um herbicida suplementar, a determinação da extensão de dano resultante, e correlação da extensão do dano com relação à tolerância herbicida da planta.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "INTERAÇÃO DE GLIFOSATO COM HERBICIDAS DE INIBIDOR DE FOTO-SISTEMA II COMO UMA FERRAMENTA DE SELEÇÃO PARA EVENTOS DE ROUNDUP READY".

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se, de maneira genérica, à avaliação da tolerância herbicida em plantas. Mais particularmente, a invenção refere-se à avaliação da tolerância a glifosato em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como milho, arroz, trigo, algodão, soja, canola, amendoim, feijão, lentilha, alfafa e açafrão.

Antecedentes

Milho é uma cultura importante e é a fonte de alimentação primária para seres humanos e animais domesticados em muitas áreas do mundo. Os processos de biotecnologia têm sido aplicados ao milho para aperfeiçoamento das características agronômicas e da qualidade do produto. Uma tal característica agronômica é a tolerância herbicida, em particular, a tolerância ao herbicida glifosato. Essa característica em milho pode ser conferida pela expressão de um transgene nas plantas de milho.

Sabê-se que expressão de genes exógenos em plantas é influenciada por sua posição cromossomial, talvez devido à estrutura de cromatina (por exemplo, heterocromatina) ou à proximidade a elementos de regulação transcricional (por exemplo, intensificadores) próximos ao sítio de integração. Weising et al., *Ann. Rev. Genet* (1988) 22, 421-477. Por essa razão, é freqüentemente necessário selecionar um grande número de eventos, a fim de identificar um evento caracterizado por expressão ótima de um gene de interesse introduzido. Por exemplo, foi observado, em plantas e em outros organismos, que pode haver uma ampla variação em níveis de expressão de um gene introduzido entre eventos. Também pode haver diferenças em padrões de expressão espaciais ou temporais, por exemplo, diferenças na expressão relativa de um transgene em vários tecidos de plantas, que podem não corresponder aos padrões esperados a partir de elementos reguladores transcricionais presentes no construto de gene introduzido.

Por essa razão, é comum produzir centenas a milhares de eventos diferentes e selecionar aqueles eventos com relação a um evento único que desejou níveis e padrões de expressão transgênica para finalidades comerciais. Um evento que desejou níveis e padrões de expressão transgênica é útil para introgressão do transgene em outros contextos antecedentes genéticos por "**outcrossing**" sexual usando-se métodos de cultivo convencionais. A progenia de tais cruzamentos mantêm as características de expressão de transgene do transformante original. Essa estratégia é usada para assegurar expressão de gene confiável em inúmeras variedades que estejam bem-adaptadas às condições de crescimento local.

Composições herbicidas compreendendo o herbicida N-fosfometil-glicina, ou seus derivados ("glifosato"), são úteis para suprimir o crescimento de, ou matar, plantas indesejadas, tais como gramíneas, ervas e as similares. O glifosato inibe a via de ácido shiquímico, que conduz à biossíntese de compostos aromáticos, incluindo aminoácidos e vitaminas. De maneira significativa, o glifosato inibe a conversão de ácido fosfoenolpirúvico e ácido 3-fosfoshiquímico em ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshiquímico, por inibição da enzima ácido 5-enolpiruvil-3- fosfoshiquímico sintase (EPSP sintase ou EPSPS). Isso conduz à depleção de aminoácidos chave, que são necessários para a síntese de proteína e o crescimento da planta. Tipicamente, o glifosato é aplicado a e é absorvido pela folhagem da planta alvo. O glifosato se transloca para cima no xilema e para baixo no floema, em geral, causando dano ao crescimento novo. A folhagem de planta tratada com glifosato primeiramente amarela (primeiro as folhas novas) e, então, se torna marrom e morre dentro de 10 - 14 dias, depois da aplicação do herbicida.

A resistência ao glifosato pode ser obtida em uma planta por introdução de um transgene que codifica EPSPS, especialmente quando o transgene codifica uma enzima de EPSPS insensível a glifosato. Portanto, uma vez que o herbicida glifosato funciona para matar a célula por interrupção da biossíntese de aminoácidos, particularmente no cloroplasto da célula, a expressão da seqüência de EPSPS, fundida a uma seqüência de peptídeo de trânsito em cloroplasto, permite resistência aumentada ao herbicida, por

concentração de qual enzima de resistência a glifosato a célula expresse no cloroplasto, isto é, na organela alvo da célula. Exemplos de enzimas de resistência a herbicida incluem genes de EPSPS e de glifosato óxido-redutase (GOX) (ver Comai, 1985, patente norte-americana de número 4.535.060, especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade).

A clorose em folhas recém-expandidas de plantas de Roundup Ready pode ocorrer seguindo-se a aplicação de glifosato. Refere-se a isso como "yellow flash", porque ele é expresso tipicamente de uma maneira transitória. Esse fenômeno é especialmente pronunciado em folhas de soja, onde a clorose pode ocorrer no mais novo trifoliado que se expande e, algumas vezes, no trifoliado subsequente, porém, então, normalmente desaparece conforme a planta continua a crescer. Esses sintomas são vistos muitíssimo freqüentemente no campo sob condições de crescimento elevado. Para soja, essa situação pode ser facilmente duplicada na estufa e a expressão consistente em "yellow flash" é obtida seguindo-se a aplicação de glifosato.

O "yellow flash" ocorre muito menos freqüentemente e, historicamente, tem sido mais difícil reproduzir em milho Roundup Ready. Inúmeros estudos em estufa, com vários híbridos de milho Roundup Ready, falharam em mostrar essa sintomatologia em uma base consistente, ou, quando ela ocorre, em um nível de expressão elevado.

A seleção corrente de eventos em milho Roundup Ready exige a testagem no campo, a fim de discernir diferenças relativas de tolerância a glifosato. Isso é devido ao fato de que a tolerância vegetativa precoce destes eventos a glifosato é muito elevada e o dano à cultura não é visto de maneira freqüente até ou estágio V8 de crescimento ou mais tarde. Embora a maioria da tolerância da planta a herbicidas esteja, em geral, diretamente relacionada ao tamanho da planta (isto é, plantas grandes são mais difíceis de matar do que aquelas pequenas), sabe-se que a tolerância de milho a muitos herbicidas diminui com o tamanho da planta crescente. Isso pode estar ligado a uma mudança rápida de propriedades de cutícula de folha de milho a partir do estágio V5 a V8 (ver Hennig-Gizewski e Wirth, Pflanzenschutz

Nachrichten Bayer (2000) 53, 105-125) (observando-se que o milho foi a única espécie de planta estudada que teve essas mudanças rápidas de características de cutícula, e a resposta foi consistente com vários híbridos e com plantas cultivadas no campo ou em estufas). O estágio "V" descreve o número de folhas o mais baixo possível com colares visíveis; por exemplo, em V4, há quatro folhas com colares visíveis. A iniciação de broto de espiga e de formação de franjas em milho são, usualmente, completados em torno do estágio V5. Essas estruturas reprodutivas são freqüentemente sensíveis a herbicidas.

10 A seleção de novos eventos em milho Roundup Ready, com base em tolerância a glifosato tem sido difícil, devido ao fato de que exames em estufa/câmara de crescimento não têm sido eficazes em discernir vários níveis de tolerância. Tipicamente, novos eventos em milho Roundup Ready exigem testagem no campo, onde a tolerância diferencial é observada somente no estágio de crescimento de folha 8 ou mais tarde. Por exemplo, sabe-se que o híbrido de milho Roundup Ready NK 603, no estágio de 4 folhas e de 6 folhas é altamente tolerante a taxas elevadas de glifosato, a taxas elevadas de glifosato com sulfato de amônio, a taxas elevadas de glifosato aplicado a milho sob estresse com frio, e aplicações seqüenciais de elevadas taxas de glifosato a milho, com nenhuma sintomatologia de dano, tal como clorose ou necrose. Como tal, previamente, tem sido difícil usar expressão de dano precoce como uma ferramenta de seleção para resistência a glifosato em milho.

Sumário da Invenção

25 Dentre os vários aspectos da presente invenção, está um exame que possa permitir a discriminação de tolerância a herbicida em diferentes eventos em plantas transgênicas em um estágio precoce, e, de preferência, em testagem em estufa/câmara de crescimento, com substanciais economias de custos e de tempo. O processo da presente invenção é particularmente vantajoso em conexão com discriminação de tolerância a glifosato. Esse exame pode atuar como uma ferramenta de seleção para discriminar dentre
30 vários eventos de Roundup Ready sobre sintomatologia de dano consis-

te.

De maneira breve, portanto, a presente invenção é dirigida a um processo para avaliação da tolerância herbicida em uma planta. O processo compreende a aplicação de um herbicida em relação ao qual a tolerância esteja sendo testada em conjunção com pelo menos um herbicida suplementar a uma planta, determinando a extensão do dano resultante, e correlação da extensão de dano à tolerância da planta ao herbicida testado.

Em uma concretização, o herbicida testado é glifosato e pelo menos um herbicida suplementar é inibidor de fotossistema II (PSII).

Em outra concretização, a planta sendo testada é uma monocotiledônea. Em ainda outra concretização, a planta sendo testada é uma dicotiledônea.

Outros objetivos e características serão em parte evidentes e em parte destacadas nas partes que se seguem.

15 Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é um gráfico de barras mostrando a inibição de crescimento percentual 10 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido DK 580 com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com aplicação de 840 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 1.

A figura 2 é um gráfico de barras mostrando inibição de crescimento percentual 10 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido DK 580 com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com aplicação de 1.680 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 1.

A figura 3 é um gráfico de barras mostrando inibição de crescimento percentual 10 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido DK 580 com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com apli-

cação de 3.360 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 1.

A figura 4 é um gráfico de barras mostrando inibição de crescimento percentual 11 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido RX686 Roundup Ready com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com aplicação de 1.680 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 2.

A figura 5 é um gráfico de barras mostrando inibição de crescimento percentual 11 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido RX686 Roundup Ready com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com aplicação de 2.520 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 2.

A figura 6 é um gráfico de barras mostrando inibição de crescimento percentual 11 dias depois do tratamento de 2 híbridos de evento em milho (híbrido RX686 Roundup Ready com o evento GA 21 e o híbrido DKC-53-33 com o evento NK 603) como uma função do tipo (Lorox ou Sencor) e concentração (56, 112 ou 224 g/ha) de inibidor de fotossistema II em conjunção com aplicação de 3.360 g/ha de glifosato. A metodologia é descrita no Exemplo 2.

Abreviações e Definições

As seguintes definições e métodos são fornecidos para melhor definir a presente invenção e para guiar aqueles versados na técnica na prática da presente invenção. A menos se observado de maneira diferente, os termos devem ser entendidos de acordo com o emprego convencional pelos versados na técnica.

"Glifosato" se refere a N-fosfonometilglicina e seus sais. Glifosato é o ingrediente ativo do herbicida Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO). Tratamentos com "herbicida glifosato" se referem a tratamentos com os herbicidas Roundup®, Roundup Ultra® ou Roundup UltraMAX® ou qual-

quer outra formulação contendo glifosato. Para as finalidades da presente invenção, o termo "glifosato" inclui qualquer forma herbicidamente ativa N-fosfometilglicina (incluindo qualquer sal do mesmo) e outras formas que resultem na produção do ânion glifosato em plantas. Os tratamentos com "glifosato" se referem a tratamentos com a formulação de herbicida Roundup® ou Roundup Ultra®, a menos se afirmado de maneira diferente. Formulações adicionais com atividade herbicida, que contenham N-fosfometilglicina ou qualquer de seus sais, são aqui incluídas como um herbicida glifosato.

10 Tolerância a herbicida se refere à capacidade de uma fração de plantas transformadas, isto é, plantas com pelo menos um evento selecionável, em sobreviverem a uma concentração do herbicida que mate essencialmente todas as plantas não transformadas da mesma espécie sob as mesmas condições.

15 Conforme usado aqui, um evento de Roundup Ready confere um grau substancial de resistência a glifosato (isto é, tolerância a glifosato) em uma planta, se ela permite que uma fração selecionável de plantas transformadas sobrevivam a uma concentração de glifosato que mate essencialmente todas as plantas não transformadas sob as mesmas condições.

20 Um "evento" é a inserção de um transgene particular em um local específico em um cromossoma. Os três fatores que diferenciam eventos são: (i) a identidade do transgene inserido; (ii) o *locus* de inserção e (iii) o número de cópias inseridas naquele *locus*. Um evento em milho transgênico é produzido por transformação de uma célula de planta de milho com DNA heterólogo, isto é, um construto de ácido nucléico que inclua um transgene de interesse, perpetuação do evento de célula para célula quando o cromossoma se replicar e as células se dividirem, regeneração de uma população de plantas resultando da inserção do transgene no genoma da planta, e seleção de uma planta particular caracterizada por inserção em um local particular do genoma. Um evento no contexto de um evento em milho transgênico se refere a DNA a partir do transformante original e da sua progenia compreendendo o DNA inserido e a seqüência genômica flanqueante, imediata-

25

30

mente adjacente ao DNA inserido, que esperar-se-ia fossem transferidos a uma progenia que recebe DNA inserido, incluindo o transgene de interesse como o resultado de um cruzamento sexual de uma linhagem parental, que incluía o DNA inserido (por exemplo, o transformante original e a progenia resultante de autofecundação) e uma linhagem parental que não contenha o DNA inserido. Mesmo depois de retro-cruzamento repetido com um parente recorrente, o DNA inserido e o DNA flanqueante a partir do parente transformado está presente na progenia do cruzamento no mesmo local cromossomal.

10 Descrição Detalhada da Invenção

Os inventores observaram que a aplicação de glifosato em conjunção com um inibidor de fotossistema II (PSII) resulta em um grau de dano que se correlaciona com tolerância a glifosato em plantas de milho. Embora tais exames com glifosato/inibidor de PSII possam, em geral, ser usados para determinar a tolerância a glifosato de uma variedade de espécies importantes em agricultura, eles oferecem vantagem particular na determinação da tolerância a glifosato de eventos em milho, nos quais ali tente a haver maior dificuldade na avaliação em plantas jovens.

A presente invenção fornece um método de avaliação da tolerância herbicida em uma planta por cultivo da planta até uma idade de desenvolvimento predeterminado ou durante um intervalo de tempo predeterminado, aplicação de um herbicida para o qual a tolerância estiver sendo testada com relação à planta, aplicação de pelo menos um herbicida suplementar para o qual a tolerância não estiver sendo testada com relação à planta, determinação da extensão do dano à planta, e correlação da extensão de dano à tolerância da planta com relação ao herbicida testado. Em várias concretizações da invenção, nenhum dano significativo é observado com a aplicação do herbicida testado ou do herbicida suplementar isoladamente; entretanto, a aplicação desses herbicidas em conjunto demonstra uma interação incitando dano na planta. Em outras concretizações, a aplicação do herbicida testado ou do herbicida suplementar resulta em alguma quantidade mensurável de dano, quando aplicado independentemente, e,

além disso, a aplicação desses herbicidas em conjunto aumenta o dano mensurável da planta. A resposta de dano diferencial é correlacionada à tolerância da planta ao herbicida testado.

Em adição à testagem de tolerância da planta ao glifosato, o presente método também permite a determinação da tolerância da planta a outros herbicidas. Já que um herbicida, em relação ao qual a tolerância estiver sendo testada, é selecionado, um versado na técnica pode selecionar um herbicida suplementar com base em seu modo de ação. O herbicida suplementar é selecionado de maneira tal de modo a intensificar o efeito do herbicida testado, de maneira que uma planta tratada com esses herbicidas exiba dano pronunciado, que possa estar correlacionado à tolerância da planta ao herbicida testado. Inúmeras combinações diferentes de um herbicida testado e de um herbicida complementar para uso no método da presente invenção são mostradas na Tabela 1.

15 Tabela 1

Herbicida Testado	Herbicida Suplementar
Glifosato	Inibidor de PSII
Glifosato	Inibidor de ALS
Glifosato	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Glifosato	Inibidor de 4-HPPD
Glifosato	Inibidor de PPO
Inibidor de PSII	Glifosato
Inibidor de PSII	Auxina sintética
Inibidor de PSII	Inibidor de PPO
Inibidor de PSII	Inibidor de fotossistema I
Inibidor de PSII	Inibidor de ALS
Inibidor de PSII	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Inibidor de ALS	Inibidor de síntese de glutamina
Inibidor de ALS	Glifosato
Inibidor de ALS	Auxina sintética
Inibidor de ALS	Inibidor de PSII
Inibidor de ALS	Acetamida
Auxina sintética	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Auxina sintética	Inibidor de diterpeno
Auxina sintética	Inibidor de ALS
Auxina sintética	Inibidor de ALS
Inibidor de ACCase	Tiocarbamato
Inibidor de ACCase	Etofumesato
Inibidor de ACCase	Dalapon
Inibidor de microtúbulos	Acetamida
Inibidor de microtúbulos	Tiocarbamato

Inibidor de microtúbulos	Inibidor de ACCase
Acetamida	Dinitroanilina
Acetamida	Inibidor de microtúbulos
Acetamida	Inibidor de síntese de lipídios
Acetamida	Tiocarbamato
Acetamida	Inibidor de ALS
Inibidor de síntese de lipídios	Inibidor de ACCase
Inibidor de síntese de lipídios	Acetamida
Inibidor de síntese de lipídios	Dinitroanilina
Inibidor de PPO	Inibidor de PSII
Inibidor de PPO	Glifosato
Inibidor de PPO	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Inibidor de fotossistema I	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Inibidor de fotossistema I	Inibidor de PSII
Inibidor de fotossistema I	Inibidor de 4-HPPD
Inibidor de síntese de glutamina	Inibidor de PSII
Inibidor de síntese de glutamina	Inibidor de 4-HPPD
Inibidor de síntese de glutamina	Inibidor de ALS
Inibidor de síntese de glutamina	Glifosato
Inibidor de biossíntese de carotenóides	Auxina sintética
Inibidor de biossíntese de carotenóides	Inibidor de PPS
Inibidor de biossíntese de carotenóides	Inibidor de fotossistema I
Inibidor de biossíntese de carotenóides	Inibidor de diterpeno
Inibidor de biossíntese de carotenóides	Inibidor de 4-HPPD
Inibidor de diterpeno	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Inibidor de diterpeno	Síntese de auxina
Inibidor de diterpeno	Inibidor de 4-HPPD
Inibidor de 4-HPPD	Inibidor de biossíntese de carotenóides
Inibidor de 4-HPPD	Inibidor de síntese de glutamina
Inibidor de 4-HPPD	Inibidor de fotossistema I
Inibidor de 4-HPPD	Inibidor de diterpeno
Inibidor de 4-HPPD	Glifosato
Tiocarbamato	Inibidor de ACCase
Tiocarbamato	Inibidor de microtúbulos
Tiocarbamato	Acetamida
Dinitroanilina	Acetamida
Dinitroanilina	Inibidor de síntese de lipídios
Inibidor de ACCase	Inibidor de síntese de lipídios
Inibidor de ACCase	Inibidor de microtúbulos
Etofumesato	Inibidor de ACCase
Dalapon	Inibidor de ACCase

Em várias das concretizações acima, o herbicida testado é glifosato. Conforme mencionado previamente, glifosato pode ser, por exemplo, N-fosfometilglicina, um seu sal ou aduto, ou um composto que seja convertido em glifosato em tecidos de planta ou que, de outra maneira, forneça

5 ion glifosato. Nesse respeito, deve ser observado que o termo "glifosato",

quando usado aqui, deve ser entendido para englobar tais derivados, a menos que o contexto exija de maneira diferente.

Sais de glifosato que podem ser usados de acordo com essa invenção incluem, mas, não estão restritos a, por exemplo, sais de metais 5 álcali (por exemplo, sais de sódio e de potássio), sais de amônio, sais de alquil-amônio (por exemplo, C₁₋₁₆-alquil-amônio), sais de alcanolamônio (por exemplo, C₁₋₁₆-alcanolamônio), sais de diamônio (por exemplo, dimetil-amônio), sais de alquilamina (por exemplo, sais de dimetilamina e isopropilamina), sais de alcanolamina (por exemplo, sais de etanolamina), sais de 10 alquil-sulfônio (por exemplo, C₁₋₁₆-alquil-sulfônio, por exemplo, sais de trimetil-sulfônio), sais de sulfoxônio, e suas misturas e combinações. Para algumas concretizações, sais de glifosato preferidos incluem, por exemplo, o sal de potássio, o sal isopropilamina, o sal de amônio, o sal de diamônio, o sal de sódio, o sal de monoetanolamina e o sal de trimetil-sulfônio.

15 Glifosato comercialmente disponível adequado inclui glifosato (Touchdown, Touchdown CF, Touchdown Pro), glifosato de isopropilamina (Accord, Accord XRT, AquaMaster, Backdraft SL, Campaign, Credit Duo, Credit Duo Extra, Credit Master, Credit Systemic, Credit Systemic Extra, Du- 20 rango, Expert, Extra Credit 5, Extreme, Field Master, Forza, Glyfos, Glyfoa Aquatic, Glyfos X-tra, Glyfos Pro, GlyKamba Broad Spectrum, Glyphomax, Glyphomax Plus, Glyphomax XRT, Glypro, Glypro Plus, Honcho, Honcho Plus, Imitator Plus, Journey, Landmaster BW, Landmaster II, OneStep, Polado L, Ranger PRO, Rattler, Rattler Plus, RazorBurn, Recoil, Riverdale Aqua Neat, Riverdale Foresters, Riverdale Razor, Riverdale Razor Pro, Rodeo, 25 RoundUp Original, RoundUp Original II, RoundUp Pro, RoundUp UltraMAX, RoundUp UltraMAX RT, RT Master), glifosato de monoamônio (Credit Duo, Credit Duo Extra, QuikPRO, RoundUp Pro Dry, RoundUp Ultra Dry) e glifosato de potássio (RoundUp Original MAX, RoundUp UltraMAX II, RoundUp WeatherMAX, RT Master II, Touchdown CT, Touchdown HiTech).

30 As propriedades herbicidas de N-fosfometilglicina e seus derivados foram, primeiro, desenvolvidos por Franz, então, descritos e patenteados pela patente norte-americana de número 3.799.758. Inúmeros sais her-

bicidas de N-fosfometilglicina foram patenteados por Franz, na patente norte-americana de número 4.405.531. As descrições de ambas essas patentes são aqui incorporadas por referência.

Composições de glifosato úteis para a invenção podem ser formuladas com um ou mais tensoativos, para intensificar a sua eficácia para aplicação foliar. Quando a água for adicionada a uma composição formulada com tensoativos, a composição aspersível resultante cobre a folhagem de maneira mais fácil e eficaz (por exemplo, as folhas de outros órgãos fotosintetizantes) de plantas. Sais de glifosato, por exemplo, têm sido formulados com tensoativos, tais como tensoativos do tipo polioxialquileno, incluindo, dentre outros tensoativos, polioxialquileno alquilaminas. Formulações comerciais de herbicida glifosato comercializados sob o nome comercial Roundup® têm sido comercializadas pela Monsanto com uma tal polioxialquileno alquilamina, em particular, uma polioxialquileno sebo-amina

Em várias das concretizações acima, o herbicida suplementar é um inibidor de fotossistema II (PSII). Em geral, inibidores de PSII bloqueiam o transporte de elétrons e a transferência de luz através de ligação à proteína de quinona D1 do transporte de elétrons fotossintético. Herbicidas de inibidor de PSII provocam dano por meio de reações fotooxidativas e de fotorradicais livres em cloroplastos, resultando na ruptura de membrana.

Exemplos de classes úteis de inibidores de PSII incluem uréias substituídas, triazinas, uracilas, fenil-carbamatos, piridazinonas, benzotiadiazóis (bentazona), nitrilas (bromoxinila) e fenil-piridazinas (piridato).

Exemplos de triazinas incluem metribuzina (Sencor 4, Sencor 75DF1, Lexone, Axiom, Axiom AT, Axiom DF, Boundary, Canopy, Domain, Metribuzina 4, Metribuzina 75DF, Turbo), atrazina (Aatrex, Atra-5, Atrazine 4L, Atrazine 90DF, Atrazine 90WSP, Axiom AT, Basis Gold, Banvel K+ atrazine, Bicep group, Bucril+atrazina, Bullet, Cinch, Contour, Cy-Pro AT, Degree Xtra, Double Team, Expert, Extrazine II, Field Master, FulTime, Guardsman, Harness Xtra, Keystone, Laddok S-12, Lariat, Lexar, LeadOff, Liberty ATZ, Lumax, Marksman, Parallel Plus, Pro-mate atrazine, Simazat 4L, Ready Master ATZ, Stalwart Xtra, Steadfast ATZ, Shotgun, Surpass 100,

Trizmet II), cianazina (Bladex, Cy-Pro, Cy-Pro AT, Extrazine II), hexazinona (Velpar, Velpar AlfaMax MP, Oustar, Westar), prometrina (Caparol, Gesagard, Cotton pro, Suprend), ametrina (Evik), e simazina (Simazat, Simazine 90DF, Simadex, Princep, Princep Caliber, Princep Liquid, SIM-TROL 4L, SIM-TROL 90DF). Uma triazina preferível é metribuzina. Translocação por triazinas ocorre somente para cima no xilema. Inibidores de fotossíntese, usualmente, não impedem que as sementes germinem ou emerjam. Sintomas de dano de triazinas ocorrem depois que os cotilédones e as primeiras folhas verdadeiras emerjam. Sintomas de dano incluem clorose e necrose nas pontas e margens das folhas primeiro em folhas mais velhas (folhas mais baixas), seguidas por clorose intervenal e queda de folhas mais baixas. Folhas mais velhas e maiores serão afetadas primeiro, porque elas absorvem mais do herbicida a partir da solução aquosa e elas são o tecido fotossintético primário da planta. Tecido de folha danificado, finalmente, tornar-se-á necrótico. Devido à natureza química do relacionamento herbicida - solo, provavelmente os sintomas de dano aumentarão, conforme o pH do solo aumente (acima de 7,2).

Exemplos de uréias substituídas incluem linurona (Afolan, Lorox, Layby pro, Linex 4L), diurona (Dibro 4+4, Direx, Diurona 4L, Diurona 80DF, Ginstar EC, Krovar I DF, Riverdale Dibro 2+2, Riverdale Dibro 4+2, Karmex, Sahara DG, Thidiazuron-Diurona EC, Velpar Alfamax MP), metobromuron (Patoran), fluometuron (Cotoran, Lanex), tebutiurona (Graslan, Spike) e monolinurona (Afesin). Uma uréia substituída preferida é linurona. Uréias substituídas e uracilas são móveis em xilema, se ligam à proteína de quinona D1 do transporte de elétrons fotossintético, e têm sintomas similares que em relação às triazinas.

Exemplos de fenil-carbamatos incluem desmedifam (Betamix, Betamix beta, Betanex, Betanex beta, Progress, Progress beta) e fenmedifam (Spin-Aid, Betamix, Betamix beta, Betanex, Betanex beta, Progress, Progress beta). Um exemplo de uma piridazinona é pirazona (Pyramin). Exemplos de uracilas incluem bromacila (Hyvar, Krovar, Riverdale Dibro 2+2, Riverdale Dibro 4+2, Dibro 4+4) e terbacila (Sinbar). Um exemplo de um

benzotiadiazol é bentazona (Basagran, Conclude Xact, Laddok S-12, Result B). Um exemplo de uma nitrila é bromoxinila (Bromox MCPA 2-2, Bronate, Bronate Advanced, Brominal, Buctril, Buctril 4 Cereals, Buctril 4EC, Buctril + atrazina, Connect 20 WSP, Double Up B+D, Maestro D, Maestro MA, Starane NXTcp, Pardner, Wildcat Xtra). Um exemplo de uma fenil-piridazina é piridato (Lentagran, Tough).

Com alguns inibidores de PSII, tais como bentazona, bromoxinila e piridato (contato), o dano é confinado à folhagem que tenha entrado em contato com o herbicida (isto é, em folhas que tenham emergido no momento do tratamento, mas, não em folhas novas emergindo depois do tratamento). Folhas afetadas tornar-se-ão de cor amarela ou bronze, ocasionalmente, têm veias médias marrons, e, finalmente, tornar-se-ão necróticas. Baixas doses desses herbicidas mimetizam inibidores de fotossíntese clássicos. Doses elevadas mimetizam rompedores de membrana celular. Concentrados de óleo de culturas, outros aditivos e clima quente podem intensificar os sintomas de dano à cultura. Plantas gramíneas são, em geral, tolerantes aos inibidores de fotossíntese não sistêmicos.

Inibidores adequados de acetil-CoA-carboxilase (ACCCase) incluem arilóxi-fenóis (clodinafop), propionatos (cihalofop-butílico, diclofop, fenoxaprop, fluazifop-P, haloxifop, propaquizafop ou quizalofop-P) e ciclohexanodionas (aloxidim, butroxidim, cletodim, cicloxidim, setoxidim ou tralcoxidim).

Inibidores de acetolactato sintase (ALS), que são adequados, incluem imidazolinonas (imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin ou imazetapir), pirimidiniltio-benzoatos (bispiribac-sódico, piritiobac ou piribenzoxim), sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas (flucarbazona-sódico ou propóxi-carbazona), sulfonil-uréias (amidossulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinossulfuron, ciclossulfamuron, etametsulfuron, etoxissulfuron, flazassulfuron, flupirsulfuron-metílico, foramsulfuron, halossulfuron, iodossulfuron, metsulfuron, nicossulfuron, primissulfuron, prossulfuron, pirazossulfuron-etílico, rimsulfuron, sulfometuron, sulfossulfuron, tifensulfuron, triassulfuron, tribenuron, trifloxissulfuron sódico ou triflussulfuron) e triazolopirimidinas (cloransulam-metílico, diclossulam, flo-

rassulam ou flumetsulam).

Inibidores de montagem de microtúbulos, úteis nos métodos da invenção, incluem dinitroanilinas (benefin, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, prodiamina ou trifluralina), piridinas (ditiopir ou tiazopir) e DCPA.

- 5 Auxinas sintéticas adequadas incluem fenóis (2,4-D, 2,4-DB, dicloropr, 2,4-DP, MCPA, MCPB ou mecoprop, PP), ácidos benzóicos (dicamba), ácidos carboxílicos (clopiralid, fluroxipir, picloram ou triclopir) e ácidos quinalino-carboxílicos (quinclorac).

- 10 Tiocarbonatos, que são adequados, incluem butilato, cicloato, EPTC, esprocarb, molinato, pebulato, prossulfocarb, tiobencarb, trialato e vernolato.

- 15 Inibidores de biossíntese de carotenóides, para uso nos métodos da invenção, incluem triazóis (amitrol ou aclonifen), assim como beflubtiamid, fluridona, flurocloridona, flurtamona, piridazinonas (norflurazon) e pirinina-carboxamidas (diflufenican ou picolinafeno).

- 20 Inibidores de protoporfirinogênio oxidase (PPO) adequados incluem difenil-éteres (acifluorfen, bifenox, fomessafeno, fluroglicofeno, lactofeno ou oxifluorfen), N-fenil-ftalimidas (flutiacet, flumiclorac ou flumioxazina), assim como flufenpir-etílico, oxadiazóis (oxadiazona, oxadiargila ou sulfentrazona), fenil-pirazóis (pirafllufen-etílico), pirimidindionas (butafenacila), tiadiazóis (flutiacet-metílico) e triazolinonas (azafenidina ou carfentrazona-etílico).

- 25 Acetamidas, que são adequadas, incluem napropamida, cloroacetamidas (acetoclor, alaclor, butaclor, dimethenamid, metolaclor, metazaclor, pretilaclor, propaclor ou tenilclor) e oxiacetamidas (mefenacet ou flufenacet).

Inibidores de fotossistema I adequados incluem bupiridilíis, tais como diquat ou paraquat.

- 30 Inibidores de 4-hidróxi-fenil-piruvato-dioxigenase (4-HPPD), para uso nos métodos da invenção, incluem calistemonas (mesotriona), isoxazóis (isoxaflutol), pirazóis (benzofenap, pirazolinato ou pirazoxifen) e tricetonas (sulcotriona).

Demonstrou-se que, em algumas plantas, feijão ou ervilha, por exemplo, tratamento com doses subletais de glifosato provocam clorose intervenal pronunciada nas folhas mais jovens. Os pesquisadores sugeriram que a clorose induzida por glifosato está ligada a efeitos prejudiciais sobre a síntese de ácido aminolevulínico (ALA), um precursor na síntese de clorofila. Ver Grossbard e Atkinson (1985) *The Herbicide Glyphosate*, Butterworth & Co., p. 36. O glifosato inibe fortemente a síntese de clorofila e de seu precursor ácido aminolevulínico (ALA) por meio de inibição da incorporação de glutamato, 2-cetoglutarato e glicina em ALA. Kitchen, Witt e Reick (1981) *Weed Sci.*, 29, 513-516.

Ao contrário, inibidores de PSII bloqueiam o transporte de elétrons, impedindo a redução de plastoquinona, e, como resultado, a energia de excitação absorvida não pode ser disposta da maneira usual. Nessa situação, a clorofila se acumula no estado de triplete mais estável. O pigmento acessório β -caroteno pode dragar alguma clorofila de triplete excitada e reemitir a energia absorvida de uma maneira não radiante. Ver, em geral, Siefermann-Harms, *Physiol. Plant.* (1987) 69, 561-568. Embora essa e outras vias de rompimento sejam eficientes e adequadas sob condições normais, a capacidade de rompimento de energia é sobrecarregada em folhas herbicidamente inibidas, permitindo que a clorofila de triplete em excesso reaja com oxigênio para formar espécies reativas com oxigênio. Essas espécies reativas com oxigênio podem induzir alvejamento de pigmento e peroxidação de lipídio. *Know and Dodge Phytochemistry* (1985) 24, 889-896. Dano visual inicial é manifestado como clorose e, com uma dose subletal de um inibidor de fotossistema II, isso pode ser a única sintomatologia evidente.

Embora não se esteja ligado a qualquer mecanismo em particular, concebe-se que a combinação de um inibidor de PSII e glifosato, em uma cultura tolerante a glifosato, tal como milho, causaria impacto em clorofila a partir de duas direções diferentes. Uma conduziria a dano a clorofila e a outra inibiria a síntese de clorofila. Embora nenhum herbicida sozinho causaria, necessariamente, sintomas de dano visual, a combinação dos dois seria capaz de induzir dano suficiente para produzir sintomatologia clorótica

dependente de taxa.

Será evidente a um versado na técnica que um grande número de diferentes combinações de glifosato e inibidor de PSII podem ser feitas. Por meio de exemplo, metribuzina pode ser usada como um herbicida suplementar em combinação com glifosato. Similarmente, linurona pode ser usado para suplementar glifosato no presente método. A tabela 2 lista inúmeras combinações de glifosato/inibidor de PSII, que podem ser usadas no presente método.

Tabela 2

Herbicida Testado	Herbicida Suplementar
Glifosato de potássio	Ametrina
Glifosato de potássio	Atrazina
Glifosato de potássio	Cianazina
Glifosato de potássio	Simazina
Glifosato de potássio	Hexazinona
Glifosato de potássio	Metribuzina
Glifosato de potássio	Terbacila
Glifosato de potássio	Diurona
Glifosato de potássio	Linurona
Glifosato de potássio	Tebutiurona
Glifosato de potássio	Bromoxinila
Glifosato de potássio	Bentazona
Glifosato de potássio	Piridato
Glifosato de monoamônio	Ametrina
Glifosato de monoamônio	Atrazina
Glifosato de monoamônio	Cianazina
Glifosato de monoamônio	Simazina
Glifosato de monoamônio	Hexazinona
Glifosato de monoamônio	Metribuzina
Glifosato de monoamônio	Terbacila
Glifosato de monoamônio	Diurona
Glifosato de monoamônio	Linurona
Glifosato de monoamônio	Tebutiurona
Glifosato de monoamônio	Bromoxinila
Glifosato de monoamônio	Bentazona
Glifosato de monoamônio	Piridato
Glifosato de diamônio	Ametrina
Glifosato de diamônio	Atrazina
Glifosato de diamônio	Cianazina
Glifosato de diamônio	Simazina
Glifosato de diamônio	Hexazinona
Glifosato de diamônio	Metribuzina
Glifosato de diamônio	Terbacila
Glifosato de diamônio	Diurona
Glifosato de diamônio	Linurona

Glifosato de diamônio	Tebutiurona
Glifosato de diamônio	Bromoxinila
Glifosato de diamônio	Bentazona
Glifosato de diamônio	Piridato
Glifosato de sódio	Ametrina
Glifosato de sódio	Atrazina
Glifosato de sódio	Cianazina
Glifosato de sódio	Simazina
Glifosato de sódio	Hexazinona
Glifosato de sódio	Metribuzina
Glifosato de sódio	Terbacila
Glifosato de sódio	Diurona
Glifosato de sódio	Linurona
Glifosato de sódio	Tebutiurona
Glifosato de sódio	Bromoxinila
Glifosato de sódio	Bentazona
Glifosato de sódio	Piridato
Glifosato de monoetanolamina	Ametrina
Glifosato de monoetanolamina	Atrazina
Glifosato de monoetanolamina	Cianazina
Glifosato de monoetanolamina	Simazina
Glifosato de monoetanolamina	Hexazinona
Glifosato de monoetanolamina	Metribuzina
Glifosato de monoetanolamina	Terbacila
Glifosato de monoetanolamina	Diurona
Glifosato de monoetanolamina	Linurona
Glifosato de monoetanolamina	Tebutiurona
Glifosato de monoetanolamina	Bromoxinila
Glifosato de monoetanolamina	Bentazona
Glifosato de N-propilamina	Piridato
Glifosato de N-propilamina	Ametrina
Glifosato de N-propilamina	Atrazina
Glifosato de N-propilamina	Cianazina
Glifosato de N-propilamina	Simazina
Glifosato de N-propilamina	Hexazinona
Glifosato de N-propilamina	Metribuzina
Glifosato de N-propilamina	Terbacila
Glifosato de N-propilamina	Diurona
Glifosato de N-propilamina	Linurona
Glifosato de N-propilamina	Tebutiurona
Glifosato de N-propilamina	Bromoxinila
Glifosato de N-propilamina	Bentazona
Glifosato de N-propilamina	Piridato
Glifosato de isopropilamina	Ametrina
Glifosato de isopropilamina	Atrazina
Glifosato de isopropilamina	Cianazina
Glifosato de isopropilamina	Simazina
Glifosato de isopropilamina	Hexazinona
Glifosato de isopropilamina	Metribuzina
Glifosato de isopropilamina	Terbacila

Glifosato de isopropilamina	Diurona
Glifosato de isopropilamina	Linurona
Glifosato de isopropilamina	Tebutiurona
Glifosato de isopropilamina	Bromoxinila
Glifosato de isopropilamina	Bentazona
Glifosato de isopropilamina	Piridato
Glifosato de etilamina	Ametrina
Glifosato de etilamina	Atrazina
Glifosato de etilamina	Cianazina
Glifosato de etilamina	Simazina
Glifosato de etilamina	Hexazinona
Glifosato de etilamina	Metribuzina
Glifosato de etilamina	Terbacila
Glifosato de etilamina	Diurona
Glifosato de etilamina	Linurona
Glifosato de etilamina	Tebutiurona
Glifosato de etilamina	Bromoxinila
Glifosato de etilamina	Bentazona
Glifosato de etilamina	Piridato
Glifosato de etilenodiamina	Ametrina
Glifosato de etilenodiamina	Atrazina
Glifosato de etilenodiamina	Cianazina
Glifosato de etilenodiamina	Simazina
Glifosato de etilenodiamina	Hexazinona
Glifosato de etilenodiamina	Metribuzina
Glifosato de etilenodiamina	Terbacila
Glifosato de etilenodiamina	Diurona
Glifosato de etilenodiamina	Linurona
Glifosato de etilenodiamina	Tebutiurona
Glifosato de etilenodiamina	Bromoxinila
Glifosato de etilenodiamina	Bentazona
Glifosato de etilenodiamina	Piridato
Glifosato de hexametilenodiamina	Ametrina
Glifosato de hexametilenodiamina	Atrazina
Glifosato de hexametilenodiamina	Cianazina
Glifosato de hexametilenodiamina	Simazina
Glifosato de hexametilenodiamina	Hexazinona
Glifosato de hexametilenodiamina	Metribuzina
Glifosato de hexametilenodiamina	Terbacila
Glifosato de hexametilenodiamina	Diurona
Glifosato de hexametilenodiamina	Linurona
Glifosato de hexametilenodiamina	Tebutiurona
Glifosato de hexametilenodiamina	Bromoxinila
Glifosato de hexametilenodiamina	Bentazona
Glifosato de hexametilenodiamina	Piridato
Glifosato de trimetil-sulfônio	Ametrina
Glifosato de trimetil-sulfônio	Atrazina
Glifosato de trimetil-sulfônio	Cianazina
Glifosato de trimetil-sulfônio	Simazina
Glifosato de trimetil-sulfônio	Hexazinona

Glifosato de trimetil-sulfônio	Metribuzina
Glifosato de trimetil-sulfônio	Terbacila
Glifosato de trimetil-sulfônio	Diurona
Glifosato de trimetil-sulfônio	Linurona
Glifosato de trimetil-sulfônio	Tebutiurona
Glifosato de trimetil-sulfônio	Bromoxinila
Glifosato de trimetil-sulfônio	Bentazona
Glifosato de trimetil-sulfônio	Piridato

Dois ou mais inibidores de PSII podem ser usados para suplementar o glifosato no presente método. Por exemplo, linurona e metribuzina, metribuzina e atrazina, linurona e diurona, diurona, atrazina e cianazina são alguns dos exemplos de combinações de inibidores de PSII que podem ser usados.

Composições herbicidas úteis na invenção podem ser preparadas simplesmente diluindo-se uma composição herbicida concentrada em água. As composições de aspersão herbicidas, incluídas na presente invenção, podem ser aplicadas à folhagem das plantas a serem tratadas por meio de quaisquer métodos apropriados que sejam bem-conhecidos pelos versados na técnica. A aplicação de soluções de tratamento herbicida à folhagem pode ser realizada, por exemplo, por aspersão por qualquer meio convencional de aspersão de líquidos, tais como bocais, atomizadores ou similares.

Além disso, as combinações de acordo com a invenção podem ser empregadas em conjunto com outros compostos ativos, por exemplo, a partir do grupo de protetores, fungicidas, inseticidas e reguladores do crescimento de plantas, ou a partir do grupo dos aditivos e auxiliares de formulação, que sejam habituais em proteção de culturas.

Um herbicida testado e um herbicida suplementar, tais como glifosato e o inibidor de PSII, são aplicados a uma planta em conjunto ou seqüencialmente. Um exemplo de aplicação em conjunto é aplicação por meio de um tanque de mistura. Em outra concretização, os dois herbicidas são aplicados em momentos diferentes (por exemplo, em separado). Em uma concretização adicional, os herbicidas, tais como glifosato e o inibidor de PSII, são aplicados em uma pluralidade de porções (por exemplo, aplicação seqüencial).

Em uma concretização, ambos os herbicidas são aplicados em uma concentração não suficiente para danificar a planta, se cada um fosse aplicado isoladamente. Em outra concretização, os herbicidas testado e suplementar são aplicados em uma concentração suficiente para danificar a planta se cada um fosse aplicado isoladamente. Em uma concretização adicional, o herbicida testado é aplicado em uma concentração não suficiente para danificar a planta se aplicado isoladamente, enquanto que o herbicida suplementar é aplicado em uma concentração suficiente para danificar a planta se aplicado isoladamente. Em ainda outra concretização, o herbicida testado é aplicado em uma concentração suficiente para danificar a planta se aplicado isoladamente, enquanto que o herbicida suplementar é aplicado em uma concentração não suficiente para danificar a planta se aplicado isoladamente. De preferência, o herbicida testado é glifosato e o herbicida suplementar é um inibidor de PSII.

Em várias concretizações da invenção, nenhum dano significativo é observado com a aplicação de glifosato ou do inibidor de PSII isoladamente; entretanto, a aplicação desses compostos em conjunto demonstra uma interação incitando dano em uma planta, tal como milho Roundup Ready. Em outras concretizações, a aplicação de glifosato ou de inibidor de PSII resulta em alguma quantidade mensurável de dano quando aplicados de maneira independente, e, além disso, a aplicação desses compostos em conjunto aumenta o dano mensurável da planta. A resposta de dano diferencial é, então, correlacionada à tolerância da planta ao glifosato. Em uma concretização preferida, o nível de dano a planta está correlacionado de maneira inversa com a tolerância a glifosato.

O presente método de avaliação de tolerância a um herbicida é aplicável a inúmeras plantas diferentes, tais como monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em uma concretização, as plantas monocotiledôneas são selecionadas a partir de milho, arroz, trigo, cevada, aveia, centeio, trigo negro, cana de açúcar, cebola, banana, tâmara e abacaxi. De preferência, a planta monocotiledônea é selecionada a partir de milho, arroz e trigo. Em outra concretização preferida, a planta monocotiledônea é milho. Alternativamente,

as plantas dicotiledôneas são selecionadas a partir do grupo consistindo em algodão, sojas, canola, feijões, lentilhas, amendoins, açafrão, brócolis, alfafa, trevo, cenouras, morangos, framboesas, laranjas, maçãs, cerejas, ameixas, salas, coentro, aneto e erva-doce. De preferência, as dicotiledôneas são selecionadas a partir de algodão, sojas, feijões, lentilhas, amendoins, alfafa e açafrão. Mais preferivelmente, as plantas dicotiledôneas são selecionadas a partir de algodão e sojas.

Embora qualquer planta possa ser avaliada de acordo com os métodos descritos aqui, esses métodos são especialmente úteis para a avaliação de plantas com potencial tolerância a glifosato devido à inserção de um evento de tolerância a glifosato no genoma da planta ou no genoma de seus progenitores. Conseqüentemente, em algumas das concretizações, a planta compreende eventos de Roundup Ready ou é uma sua progenia. Por exemplo, a planta Roundup Ready é selecionada a partir de milho Roundup Ready, sojas Roundup Ready, algodão Roundup Ready, trigo Roundup Ready e alfafa Roundup Ready. De preferência, a planta é um milho Roundup Ready. A geração, seleção e testagem genotípica/fenotípica de tais eventos em milho Roundup Ready é adicionalmente descrita em, por exemplo, na patente norte-americana de número 5.554.798, comumente designada, intitulada "Fertile glyphosate-resistant transgenic corn plants", a descrição da qual é especificamente aqui incorporada por referência.

De acordo com várias concretizações da presente invenção, uma planta, que estiver sendo tratada para tolerância com relação a um herbicida em particular, é plantada e cultivada em uma estufa, câmara de cultivo ou campo, e tratada com uma quantidade suficiente de um herbicida testado e um herbicida suplementar, para resultar em dano mensurável. Em uma concretização, semente de milho compreendendo eventos de Roundup Ready, ou sua progenia, são plantadas e tratadas conforme descrito. Em outra concretização, o herbicida testado é glifosato e o herbicida suplementar é um inibidor de PSII. O dano mensurável resultante a partir da aplicação de herbicidas é, então, correlacionado com a tolerância do evento na planta com respeito ao herbicida testado.

De acordo com várias concretizações do exame, depois do plantio da semente de interesse, a planta resultante é cultivada durante um tempo predeterminado ou até uma idade predeterminada antes da aplicação de um herbicida testado de um herbicida suplementar. Em uma concretização, a planta é uma planta de milho, o herbicida testado é glifosato e o herbicida suplementar é um inibidor de PSII. Depois da aplicação do herbicida suplementar, a planta tratada é deixada crescer durante um tempo predeterminado adicional ou até uma segunda idade predeterminada. Várias combinações de idade de desenvolvimento e tempo cronológico são úteis para a invenção.

Em alguma extensão, a escolha de quanto tempo se permite a planta crescer dependerá das condições de cultivo, do híbrido em particular sendo avaliado, da formulação de herbicida testado usada, do herbicida suplementar usado, do sintoma de dano sendo avaliado e de outros fatores conforme comumente entendidos pelo versado na técnica. Em uma concretização, quando se correlaciona a inibição de crescimento à tolerância ao glifosato, uma planta de milho pode ser cultivada até cerca do estágio 11 de crescimento (cerca de uma folha desdobrada) ou cerca do estágio de crescimento 12 (cerca de duas folhas desdobradas) antes da aplicação de glifosato e de inibidor(es) de PSII, e, então, cultivada durante cerca de 2 a cerca de 15 dias depois da aplicação. Por exemplo, uma planta de milho pode ser cultivada cerca de 5 a cerca de 10 dias depois da aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. Como outro exemplo, uma planta de milho pode ser cultivada cerca de 8 dias depois da aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. Períodos de tempo similares podem ser usados para cultivo de sojas, algodão, canola e outras culturas. Em adição, um versado na técnica pode determinar prontamente os períodos de tempo adequados durante os quais plantas particulares devem ser cultivadas.

Como é conhecido na técnica, uma variedade de índices de desenvolvimento de plantas são úteis para se avaliar a idade de desenvolvimento da planta. Exemplos de tais índices, úteis para monocotiledôneas, incluem, mas, não estão limitados a, o Método de Colar de Folha, o método

da folha "inclinada para baixo" e a escala BBCH Extendida. Em milho, o Método de Colar de Folha determina o estágio da folha pela contagem do número de folhas em uma planta com colares de folha visíveis, iniciando com a folha verdadeira a mais baixa possível, curta, de ponta arredondada, e terminando com a folha a mais elevada possível com um colar de folha visível. O colar de folha é a "faixa" semelhante a colar de cor clara localizada na base de uma lâmina de folha exposta, próxima ao ponto onde a lâmina de folha entra em contato com o caule da planta. Folhas dentro do verticilo, não ainda completamente expandidas e sem qualquer colar de folha visível, em geral, não são incluídas neste método de classificação de estágio de folha. Usualmente, estágios de folhas são descritos como estágios "V", por exemplo, V2 = duas folhas com colares de folha visíveis. O método do colar de folha é um método de agronomia amplamente usado, especialmente nos Estados Unidos. Ver, em geral, Ritchie et al. 1992, *How a corn plant develops*, Sp. Rpt. Nº 48, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames, IA.

A escala BBCH Extendida é uma sistema para a codificação uniforme de estágios fenomenologicamente idênticos de espécies de plantas monocotiledôneas. O código decimal, que é dividido em estágios de crescimento (GS) principal e secundário, é baseado no código para cereal bem-conhecido desenvolvido por Zadoks et al. (1974), um código decimal para os estágios de crescimento de cereais. Weed Res. 14:415-421. O estágio de crescimento principal 0 (00-09) descreve os estágios de germinação. O estágio de crescimento principal 1 (10-19) descreve o desenvolvimento de folhas. Por exemplo, no GS 11, existe uma folha desdobrada, enquanto que, no GS 12, existem duas folhas desdobradas. Estágios de crescimento principais 2-9 descrevem perfilhamento, alongamento de caule, emborrachamento, desenvolvimento da espiga, floração, frutificação, maturação e senescência, respectivamente. A Escala BBCH Extendida é adicionalmente descrita em Stauss 1994, *Compendium of Growth Stage Identification Keys for Mono- and Dicotyledenous Plants*, Ciba-Geigy AG, ISBN 3-9520749-0-X. Application.

Várias concretizações da invenção são, em geral, dirigidas à seleção de plantas com relação à resistência a glifosato. Devido ao fato de que muitas das plantas selecionadas têm pelo menos alguma resistência a glifosato, freqüentemente, glifosato aplicado isoladamente, em quantidades herbicidamente eficazes, será insuficiente para danificar de maneira significativa a planta avaliada. No entanto, de acordo com os métodos da invenção, a aplicação de glifosato em conjunção com um inibidor de PSII, pode proporcionar sintomas de dano herbicida na planta avaliada. Essa expressão de dano pode, então, ser correlacionada à tolerância a glifosato da planta avaliada.

Em várias concretizações, o glifosato é aplicado em uma taxa herbicidamente eficaz. Geralmente, uma taxa herbicidamente eficaz é suficiente para propiciar sintomas visuais de tratamento com glifosato em plantas não tolerantes a glifosato dentro de dois a sete dias depois do tratamento. Dependendo da tolerância a glifosato da planta avaliada, uma taxa herbicidamente eficaz de glifosato aplicado sem um inibidor de PSII pode ou não propiciar sintomas visuais na planta avaliada.

A seleção de taxas de aplicação, que sejam herbicidamente eficazes, para um herbicida testado ou herbicida suplementar da invenção, está dentro da capacidade do cientista agrícola ordinário. Os versados na técnica igualmente reconhecerão que condições de plantas, clima e condições de crescimento individuais, assim como os ingredientes ativos específicos e sua razão em peso na composição, influenciarão o grau de eficácia herbicida alcançado na prática desta invenção. Com respeito ao uso de composições de glifosato, muita informação é conhecida sobre taxas de aplicação apropriadas. Durante duas décadas de uso de glifosato e de estudos publicados com relação a tal uso forneceram informação abundante a partir da qual aquele que exerce a profissão pode selecionar taxas de aplicação de glifosato, que sejam herbicidamente eficazes em espécies particulares, em estágios de crescimento particulares, em condições ambientais particulares.

Em várias concretizações, o glifosato pode ser aplicado a partir de cerca de 1x a cerca de 4x das taxas de campo sugeridas. Essas taxas de

aplicação são usualmente expressas como quantidade de glifosato por unidade de área tratada, por exemplo, gramas por hectare (g/ha). Em uma concretização, o glifosato é aplicado em uma concentração de cerca de 840 g/ha a cerca 3.360 g/ha. Por exemplo, o glifosato pode ser aplicado em uma
5 concentração de cerca de 840 g/ha. Como outro exemplo, o glifosato pode ser aplicado em uma concentração de cerca de 1.680 g/ha. Como um exemplo adicional, o glifosato pode ser aplicado em uma concentração de cerca de 2.520 g/ha. Como ainda outro exemplo, o glifosato pode ser aplicado em uma concentração de cerca de 3.360 g/ha.

10 De acordo com várias concretizações da invenção, um inibidor de PSII é aplicado em conjunção com glifosato, resultando em dano mensurável, que pode, então, ser correlacionado à resistência a glifosato. Em várias concretizações, o inibidor de PSII é aplicado em uma concentração não
15 suficiente para danificar de maneira significativa a planta quando aplicado de maneira independente. Como um exemplo, um inibidor de PSII pode ser aplicado em 1/4x a taxa de campo para milho. Como outro exemplo, um inibidor de PSII pode ser aplicado em 1/2x a taxa de campo. Em uma concretização, o inibidor de PSII é aplicado em uma concentração de cerca de 56 g/ha a cerca de 224 g/ha. Como um exemplo, o inibidor de PSII pode ser
20 aplicado em uma concentração de cerca de 56 g/ha. Como outro exemplo, o inibidor de PSII pode ser aplicado em uma concentração de cerca de 112 g/ha. Como um exemplo adicional, o inibidor de PSII pode ser aplicado em uma concentração de cerca de 224 g/ha.

25 Com respeito às combinações herbicidas diferentes de glifosato e de inibidor de PSII, os herbicidas testado e suplementar podem ser aplicados nas taxas similares àquelas de glifosato e de inibidor de PSII. Por exemplo, quando o herbicida testado for um inibidor de ALS, ele pode ser aplicado em uma taxa de campo desde cerca de 1x a cerca de 4x, enquanto que o herbicida suplementar (por exemplo, glifosato) pode ser aplicado em uma
30 taxa de campo de desde cerca de 1/4x a cerca de 1/2x. Taxas de campo adequadas para combinações particulares do herbicida testado e do herbicida suplementar podem ser prontamente determinadas por um versado na

técnica.

De acordo com várias concretizações da invenção, vários sintomas de estresse fisiológico ou de desenvolvimento, resultantes da aplicação do herbicida testado (por exemplo, glifosato) e do herbicida suplementar (por exemplo, um inibidor de PSII), podem ser medidos, e esse valor correlacionado à tolerância ao herbicida testado (por exemplo, tolerância a glifosato) da planta. Assim, por exemplo, depois de cultivo da planta a ser avaliada, a aplicação dos herbicidas testado e suplementar (por exemplo, glifosato e inibidor de PSII), e permitindo-se crescimento ulterior depois de tal tratamento, a planta testada pode ser avaliada com relação aos sintomas de dano resultantes. A extensão em que a planta é deixada crescer depois do tratamento com inibidor é, em alguma parte, dependente do quadro de tempo de expressão de sintomas de dano.

Sintomas de dano resultantes do tratamento com herbicidas combinados podem ser medidos por vários métodos comumente entendidos na técnica. Por exemplo, sintomas de dano podem ser medidos como impacto de tratamento sobre: clorose, necrose, redução de crescimento, nanismo morfológico, troca de gás, eficiência fotossintética, propriedades ópticas de folhas ou outros parâmetros fisiológicos fisiológicos de estresses conhecidos na técnica.

Em geral, uma taxa subletal de glifosato produzirá o sintoma visual de clorose na maioria das plantas. Se a taxa de aplicação for baixa o bastante, essa sintomatologia será transiente e a planta recuperar-se-á. Concebe-se que taxas elevadas de glifosato criam estresse em plantas de Roundup Ready, com o nível de estresse estando inversamente relacionado ao nível de tolerância. Os inibidores de PSII também causariam clorose em taxas subletais. Quando aplicado em conjunção com taxas de aplicação subletais de glifosato, um inibidor de PSII acentuariam clorose a um grau maior em plantas com níveis mais baixos de tolerância a glifosato.

Em uma concretização, a clorose é tipicamente observada a partir de cerca de 3 a cerca de 5 dias depois do tratamento em plantas, tal como milho. Esse dano é transiente e um versado na técnica reconhecerá que tal

avaliação pode ser quantificada no tempo para expressão máxima. A clorose pode ser medida de várias maneiras. Em um exemplo, uma estimativa visual pode ser feita em comparação à verificação não tratada. Dano pode ser observado como clorose % (0 = nenhuma clorose, 100 = clorose completa).

- 5 Cem por cento de clorose corresponderia à planta inteira exibindo um amarelamento completo de todo o tecido. Como outro exemplo, a clorose pode ser medida diretamente com um medidor de clorofila. Um instrumento desse tipo mede a fluorescência de clorofila e é, portanto, um meio mais direto de medição de clorose. Como um exemplo adicional, a clorose pode ser medida
- 10 por extração de clorofila do tecido da folha e quantificando-se espectrofotometricamente a quantidade presente, com base em área de superfície de folha ou de peso fresco.

- Em geral, uma taxa subletal de glifosato produzirá uma inibição de taxa de crescimento na maioria das plantas. Em uma concretização, a
- 15 inibição de crescimento é tipicamente observada desde cerca de 5 a cerca de 10 dias depois do tratamento em plantas de milho. Em uma concretização adicional, a inibição de crescimento atinge expressão de pico em cerca de 8 dias depois do tratamento, e em 15 dias depois do tratamento, o dano é diminuído de maneira substancial. O dano medido como inibição de tratamen-
- 20 to se beneficia de ser facilmente quantificado. A redução de crescimento pode ser observada como redução de crescimento % por estimativa visual versus planta não tratada (0 = nenhuma redução de crescimento, 100 = redução de crescimento completa). Um meio mais direto é medir a altura de plantas de milho. A redução de tamanho pode ser, então, expressa como per-
- 25 centagem de crescimento com relação à verificação não tratada (a altura de planta afetada/altura de verificação não tratada) ou simplesmente comparando as alturas diretamente.

- Outros métodos de caracterização do início, da progressão e da severidade de sintomas de estresse fisiológico associados com a aplicação
- 30 de herbicidas da presente invenção, tais como glifosato e inibidor de PSII, serão evidentes para o versado na técnica.

Várias concretizações da invenção são capazes de determinar a

tolerância a herbicida (por exemplo, tolerância a glifosato) de uma planta correlacionando-se a tolerância com níveis diferenciais de dano. Conforme mostrado pelos exemplos fornecidos, a metodologia de avaliação da invenção é capaz de reproduzir a tolerância a glifosato relativa historicamente observada das plantas de milho híbridas.

Uma correlação em biologia é a extensão, na qual duas variáveis estatísticas variam em conjunto ou a interdependência entre duas variáveis. Ver, por exemplo, *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, 2d. ed. John Wiley & Sons, 1989. A determinação de relacionamentos em exames biológicos por meio de correlação é bem-conhecida pelos versados na técnica.

Antes dessa invenção, a seleção de eventos ocorria nos testes de campo por observação de dano a partir de herbicida (por exemplo, glifosato), usualmente, com tratamentos feitos mais tarde na estação, e comparando-se os rendimentos de cultura. A desvantagem de uma tal abordagem era que exames de campo foram conduzidos em plantas de milho relativamente desenvolvidos, portanto, exigindo tempo substancial para os experimentos. O método da invenção fornece um exame adequado para determinação de tolerância a herbicida, e, em particular, tolerância a glifosato, de uma planta em uma idade mais prematura foi historicamente possível, assim como a conveniência de se realizar o exame em uma estufa ou câmara de crescimento. A presente invenção se beneficia de métodos históricos de caracterização de tolerância a glifosato pelo fato de que dados a partir destes tipos de experimentos podem servir para verificar a correlação descrita pelo exame da invenção. Por exemplo, comparar os Exemplos 1 e 2 com o Exemplo 5. Além disso, plantas com tolerância a glifosato caracterizada podem servir como padrões contra os quais a tolerância a glifosato relativa de eventos previamente não caracterizados possa ser determinada. Ver os Exemplos 3 e 4.

Plantas examinadas, por exemplo, plantas híbridas de milho, podem ter tolerância a glifosato conhecida ou desconhecida. Além disso, plantas examinadas podem ser comparadas a plantas com tolerância a glifo-

sato conhecida ou desconhecida. Para as finalidades da presente invenção, uma planta padrão é uma planta com uma tolerância a herbicida caracterizada, e, em particular, tolerância a glifosato. A tolerância a glifosato relativa de uma planta padrão pode ser determinada por resultados fenotípicos de expressão de eventos. Exames para se caracterizar a tolerância a glifosato fenotípica de plantas padrão podem assumir muitas formas, incluindo, mas, não limitadas a, análise de mudanças na composição química, morfologia ou propriedades fisiológicas da planta. Exemplos de dados de campo que caracterizam a tolerância a glifosato de dois eventos em milho de Roundup Ready, GA21 e NK 603, são fornecidos no Exemplo 5. Tais técnicas, e outras conhecidas pelo versado na técnica, podem ser empregadas para caracterizar a tolerância a glifosato de uma planta, de modo a usar aquela planta como um padrão contra o qual se determina a tolerância a glifosato relativa de uma planta avaliada de acordo com os métodos da invenção. As mesmas técnicas podem ser adaptadas para determinação da tolerância de uma planta também a outros herbicidas.

Métodos de caracterização do fenótipo tolerante a glifosato de diferentes híbridos de evento em milho são descritos, por exemplo, nas patentes norte-americanas, comumente designadas, de números 5.633.435 intitulada "*Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases*"; 5.804.425 intitulada "*Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases*"; 4.940.835 intitulada "*Glyphosate-resistant plants*"; 5.188.642 intitulada "*Glyphosate-resistant plants*"; e 6.040.497 intitulada "*Glyphosate resistant corn lines*"; as descrições das quais são, cada uma, especificamente incorporadas aqui por referência. Esses métodos de caracterização podem ser usados nessa invenção como uma escala relativa de tolerância a glifosato de plantas padrão contras as quais se compara a tolerância a glifosato de plantas que não tenham sido previamente caracterizadas.

Plantas úteis como plantas padrão da invenção incluem, mas, não estão limitadas a, aquelas plantas geneticamente transformadas ou selecionadas para tolerar um herbicida, tal como glifosato. Plantas genética-

mente transformadas ou selecionadas para tolerar glifosato incluem, mas, não estão limitadas a, aquelas cujas sementes são vendidas pela Monsanto Company ou sob a licença a partir de Monsanto Company portando a marca comercial Roundup Ready®. Exemplos de plantas resistentes a glifosato comercialmente disponíveis úteis para a invenção como plantas de milho padrão incluem qualquer híbrido com os eventos GA 21 e/ou NK 603.

Usualmente, uma planta padrão (conforme o termo é aqui usado) será uma planta híbrida com uma capacidade conhecida de destoxificar glifosato e, por meio disso, resistir a dano induzido por glifosato. Em várias concretizações, a planta padrão recebe substancialmente o mesmo regime de tratamento que a planta examinada com relação a tolerância a glifosato (ver, por exemplo, os Exemplos 4 e 5). Conforme usado aqui, regime de tratamento engloba aquelas variáveis, que possam afetar a expressão de sintomas de dano em resposta à aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. Exemplos de variáveis incluídas dentro de regime de tratamento incluem condições de crescimento, idade de desenvolvimento ou cronológica de plantas em tratamento, idade de desenvolvimento ou cronológica de plantas na avaliação de dano, e métodos e taxas de aplicação para glifosato e inibidor de PSII. Exemplos de condições de crescimento incluem umidade relativa, intensidade de luz, comprimento do dia, programa de rega, suprimento de nutrientes e meios de plantio.

Em uma concretização, o nível de dano relativo de uma planta examinada com tolerância a herbicida desconhecida é comparada ao nível de dano relativo de outra planta examinada da mesma espécie com tolerância a herbicida desconhecida. Alternativamente, a planta examinada pode ser comparada a outra planta da mesma espécie com tolerância a herbicida conhecida. Em uma concretização preferida, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrida examinada com tolerância a glifosato desconhecida é comparado ao nível de dano relativo de outra planta de milho híbrido examinada com tolerância a glifosato desconhecida. Ainda em outra concretização preferida, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrida examinada com tolerância a glifosato desconhecida é comparada ao nível de dano rela-

tivo de outra planta de milho híbrida examinada com tolerância a glifosato conhecida (isto é, uma planta de milho padrão).

Em várias concretizações, a planta examinada pode ser comparada a uma, duas, três, quatro ou mais plantas com tolerância a herbicida conhecida, e, em particular, tolerância a glifosato. Tal comparação fornece uma escala de tolerância. Em uma concretização, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrido examinada é comparado à tolerância conhecida de um híbrido de planta de milho conhecido como sendo altamente tolerante a glifosato. Como um exemplo, o evento NK 603 (como contido em, por exemplo, o híbrido DKC 53-33) é altamente tolerante a glifosato e, tipicamente, não exibe dano a partir de aplicações de glifosato de até 3.360 g/ha, mesmo aplicado seqüencialmente (ver, por exemplo, o Exemplo 5).

Em uma concretização adicional, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrida examinada é comparado à tolerância conhecida de um híbrido de milho medianamente tolerante a glifosato. Um exemplo de uma planta de milho medianamente tolerante a glifosato é o híbrido de evento GA 21 (Número de acesso do ATCC 209033, depositado em 14 de maio de 1997). O fenótipo de tolerância a glifosato do evento GA 21 é descrito na patente norte-americana de número 6.040.497 intitulada "*Glyphosate resistant corn lines*", as descrições da qual são aqui especificamente incorporadas por referência. Além disso, a tolerância a glifosato de GA 21 é caracterizada, por exemplo, no Exemplo 5.

Em outra concretização, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrida examinada é comparado à tolerância conhecida de um híbrido de milho de baixa tolerância a glifosato. Um híbrido de milho de baixa tolerância a glifosato pode ser, por exemplo, um híbrido de milho com menos tolerância a glifosato do que mesmo um evento de GA 21.

Em ainda outra concretização, o nível de dano relativo de uma planta de milho híbrida examinada é comparado com uma planta de milho híbrida que não seja Roundup Ready (isto é, que expresse somente resistência relativa a glifosato).

Várias combinações e números desses padrões de tolerância

alta, média, baixa ou não tolerantes são possíveis. Em uma concretização, e planta de milho examinada é comparada a híbridos de plantas de milho com tolerâncias a glifosato elevada e baixa. Em outra concretização, a planta de milho examinada é comparada a híbridos de plantas de milho com tolerâncias a glifosato alta, média e baixa (ver, por exemplo, o Exemplo 4). Em uma
5 outra concretização, a planta de milho examinada é comparada a híbridos de plantas de milho com tolerâncias a glifosato alta, média, baixa e não tolerantes a glifosato. É evidente que as várias iterações de possíveis combinações são numerosas.

10 Tendo-se descrito a invenção em detalhes, será evidente que modificações e variações são possíveis sem se desviar do escopo da invenção definido nas reivindicações apensas. Além disso, deve ser apreciado que todos os exemplos na presente descrição são fornecidos como exemplos não limitantes.

15 Exemplos

Os seguintes exemplos não limitantes são fornecidos para ilustrar adicionalmente a presente invenção. Deve ser apreciado pelos técnicos especializados no assunto que as técnicas reveladas nos exemplos que se seguem representam abordagens dos inventores constataram funcionarem
20 bem na prática da invenção, e, portanto, podem ser considerados a constituírem exemplos de modos para sua prática. No entanto, os técnicos especializados no assunto, à luz da presente descrição, apreciam que muitas mudanças podem ser feitas nas concretizações específicas que são reveladas e ainda obter um resultante igual ou similar, sem se desviar do espírito e escopo da invenção.
25

Exemplo 1

A interação de glifosato e de inibidores de PSII em milho Roundup Ready foi investigada com relação à utilidade de uso em um exame com relação à tolerância a glifosato. Híbridos de milho Roundup Ready testados
30 eram DK 580 (evento GA 21, número de acesso do ATCC 209033) e DCK 53-33 (evento NK 603). Sabe-se que o evento NK 603 exibe maior tolerância a glifosato sob condições de campo do que o evento GA 21.

Duas sementes de milho foram plantadas em pote de plástico de 2,54 cm (uma polegada) de profundidade por 8,89 x 8,89 cm (3,5 x 3,5 polegadas) enchido com mistura de plantio em vaso comercial (terra Redi). A mistura de plantio em vaso foi suplementada com fertilizante de liberação lenta Osmacote TM 14-14-14 em 3,28 g/cm (100 g/pé) cúbico para otimizar o crescimento. Os potes foram, então, colocados em uma estufa (25°C de dia/19°C de noite, dia de 14 horas) e água foi fornecida por meio de subirrigação. As plantas foram deixadas crescer para o estágio em que 3 folhas estivessem desdobradas (6 - 9 dias depois do plantio, estágio de crescimento aproximado de GS 13) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de fotosistema II.

Os tratamentos com herbicida consistiram em aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. As taxas de aplicação para glifosato (Roundup UltraMAX, Monsanto, St. Louis) incluíram: 840 g/ha; 1.680 g/ha e 3.360 g/ha (isto é, 0,34 kg/A; 0,79 kg/A e 1,36 kg/A (0,75 lb/A; 1,5 lb/A e 3,0 lb/A)). Taxas de aplicação para linurona (Lorox, DuPont) incluíram: 56 g/ha; 112 g/ha e 224 g/ha. Taxas de aplicação para metribuzina (Sencor, Bayer) incluíram: 56 g/ha; 112 g/ha e 224 g/ha. Os tratamentos foram aplicados de maneira espalhada em um atomizador tipo "**research track**" utilizando uma ponta de atomização em leque plana uniforme. As plantas foram retornadas para a estufa seguindo-se as aplicações. A inibição de crescimento foi medida 10 dias depois do tratamento (DAT). As plantas suscetíveis exibiram clorose transiente 2 - 4 dias depois do tratamento (DAT), que subsequente resultou em crescimento reduzido com relação às plantas não tratadas. A redução de crescimento pode ser medida cerca de 7 - 10 DAT por estimativa direta ou visual (0 = nenhuma redução de crescimento, 100 = redução de crescimento completa).

Os resultados mostraram que aplicações únicas de glifosato, metribuzina ou linurona forneceram dano mínimo (< 3%) a nenhum dano em cada um do evento de GA 21 ou do evento de NK 603. Combinações de glifosato com cada um de linurona ou de metribuzina, contudo, produziram dano significativo e estava claramente relacionado à taxa. A sintomatologia de

dano expressa como baixos níveis de clorose discernível, um menor grau de necrose de folha (somente taxas de combinação elevadas), e uma redução de crescimento. Os dados mostraram uma clara resposta de taxa tanto com linurona (Lerox) quanto com metribuzina (Sencor), com o dano aumentando conforme as taxas aumentaram. Igualmente, os dados mostraram que o dano por glifosato aumentou conforme as taxas aumentaram. O evento de GA 21 demonstrou, de maneira consistente, mais dano em resposta a essas combinações do que o evento de NK 603, sugerindo que o evento de NK 603 tem um grau mais elevado de tolerância a glifosato (ver, por exemplo, a figura 3). Sintomas de dano eram evidentes em 10 dias depois do tratamento. O dano pareceu atingir um pico em cerca de 8 dias depois do tratamento. Em 13 dias depois do tratamento, plantas de milho tinham se recuperado de maneira significativa.

Conforme esses resultados demonstram, maior tolerância a glifosato sob condições de campo estava correlacionada com sintomatologia de dano de combinações de glifosato com baixas taxas de inibidores de PSII. Portanto, a sintomatologia de dano de combinações de glifosato com baixas taxas de inibidores de PSII em milho Roundup Ready pode ser usada como uma ferramenta eficaz para seleção de eventos em milho Roundup Ready em um estágio inicial, com base em tolerância a glifosato.

Exemplo 2

A interação de glifosato e de inibidores de PSII em milho Roundup Ready foi demonstrada em dois híbridos de milho, para mostra a utilidade de uso em um exame com relação à tolerância a glifosato.

Híbridos de milho Roundup Ready testados eram RX 686Roundup Ready (evento de GA 21) e DKC 53-33 (evento de NK 603). O crescimento de material de planta e o regime de tratamento eram conforme descrito no Exemplo 1, exceto que as plantas foram deixadas crescer ao estágio em que 2 folhas estivessem desdobradas (aproximadamente GS 12) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. A inibição de crescimento foi medida 10 dias depois do tratamento (DAT).

Os resultados mostraram que aplicações únicas de glifosato,

metribuzina ou linurona não produziram qualquer dano de cultura discernível em cada um dos híbridos de milho. Combinações de glifosato com cada um de linurona ou metribuzina, entretanto, não forneceram dano de cultura significativo que fosse relacionado à taxa. Clorose e necrose foram observadas nos tratamentos de combinação. Dados de redução de crescimento estão relatados nas figuras 4 - 6. Os dois eventos de milho testados, GA 21 (no híbrido de RX 686Roundup Ready) e NK 603 (no híbrido de DKC 53-33), demonstraram uma resposta diferencial com níveis mais elevados de dano vistos em RX 686Roundup Ready. Diferenças entre híbridos são muitíssimo claramente observadas na taxa de aplicação mais elevada de glifosato em conjunção com cada um de linurona ou de metribuzina (ver, por exemplo, a figura 6).

E, assim, combinações de glifosato com baixas taxas de inibidores de PSII induzem dano em híbridos de milho Roundup Ready e diferenças em dano entre híbridos contendo o evento de NK 603 e o evento de GA 21 estão correlacionadas à tolerância a glifosato.

Exemplo 3

A interação de glifosato e de inibidores de PSII em milho Roundup Ready pode ser demonstrada em vários híbridos de milho e o dano resultante comparado ao dano infligido a plantas de milho com níveis conhecidos de tolerância a glifosato (isto é, plantas de milho padrão). Com efeito, essa abordagem usa plantas de milho padrão para estabelecer uma curva padrão de resistência a glifosato relativa, onde essa curva possa ser usada para avaliar a tolerância a glifosato relativa de plantas de milho com tolerância a glifosato desconhecida.

Híbridos de milho Roundup Ready testados conterão eventos de resistência a glifosato. Plantas de milho com os eventos de NK 603 e de GA 21 serão selecionadas como plantas de milho padrão. Outro híbrido contendo evento que tenha baixa tolerância a glifosato será escolhido como uma terceira planta padrão. Baixa tolerância a glifosato para as finalidades desse exemplo constitui uma tolerância entre tolerância zero e aquela tolerância a glifosato exibida pelo evento de GA 21. A terceira planta padrão será carac-

terizada com relação à tolerância a glifosato através de métodos esboçados no Exemplo 5. Crescimento de material de planta e regime de tratamento serão conforme descrito no Exemplo 1, exceto que as plantas serão deixadas crescerem ao estágio, em que 2 folhas estivessem desenroladas (aproximadamente GS 12) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de PSII. No momento de aplicação, plantas de tamanho igual serão selecionadas para cada híbrido ou natural. A inibição de crescimento será medida 10 dias depois do tratamento (DAT).

Tipicamente, resultados a partir de experimentos delineados acima mostraram uma gama de graus de dano a partir de aplicações somente de glifosato, a partir de essencialmente nenhum dano em NK 603 e em GA 21 a dano moderado a severo no terceiro híbrido selecionado com o evento de não tolerância. A separação muitíssimo aparente entre os vários eventos em milho foi vista a partir de combinações de glifosato com a taxa de linurona de 112 g/ha. A combinação de glifosato mais linurona tem sido observada a causar um gradiente de dano visível, com o menor dano ao evento de NK 603, dano moderado ao evento de GA 21, e dano severo à terceira planta padrão, selecionada com relação à sua conhecida baixa tolerância a glifosato.

Portanto, a seleção de três plantas padrão pode ser realizada tal que a aplicação conjunta de glifosato e de linurona produz um gradiente de dano que pode servir como uma escala relativa de referência com relação a tolerância a glifosato de plantas examinadas com tolerância a glifosato desconhecida.

25 Exemplo 4

Esse exemplo descreve como conduzir uma comparação de vários eventos em milho para sua tolerância a glifosato com relação aos eventos NK 603, GA 21 e uma terceira planta padrão selecionada pela sua conhecida baixa tolerância a glifosato (ver o Exemplo 3).

30 Vários híbridos de milho contendo um evento de resistência a glifosato será selecionado por exame de tolerância a glifosato. O crescimento de material de planta e o regime de tratamento será conforme descrito no

Exemplo 1, exceto: plantas serão cultivadas ao estágio em que somente uma folha está desdobrada (aproximadamente, GS 11) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de fotossistema II, taxas de aplicação para glifosato (Roundup UltraMax, Monsanto, St. Louis) serão de 1.680 g/ha e de 3.360 g/ha; taxa de aplicação para linurona (Lorox) será de 112 g/ha; e a inibição de crescimento será medida 6 dias depois do tratamento (DAT).

Espera-se que os resultados para os eventos padrão NK 603 e GA 21 mostrem níveis relativos similares de tolerância a glifosato, conforme descrito nos exemplos acima (ver os Exemplos 1 - 2). Espera-se que os resultados para o terceiro evento padrão mostrem resultados consistentes com sua conhecida baixa tolerância por glifosato. Consistente com efeitos de dano observados descritos acima, os eventos de teste devem exibir níveis de dano, como um resultado da aplicação combinada de glifosato e linurona. Esse nível de dano será correlacionado à tolerância ao glifosato, permitindo comparação direta dos eventos testados. Além disso, o nível de dano dos eventos testados será comparado aos níveis de dano das plantas padrão do exame. A tolerância a glifosato dos eventos testados será determinada por correlação ao relacionamento dano/tolerância demonstrado pelas plantas padrão. Essa comparação fornecerá uma avaliação da tolerância a glifosato relativa dos eventos testados ao longo de um gradiente de tolerância a glifosato representado pelas plantas padrão. Com base nesses dados, os eventos em milho Roundup Ready podem ser agrupados da seguinte maneira com respeito à tolerância a glifosato: Muitíssimo tolerante - aquela similar a NK 603; Tolerância intermediária - aquela similar a GA 21; Pouquíssimo tolerante - aquela similar à terceira planta padrão selecionada pela baixa tolerância.

Portanto, dano diferencial a partir da combinação de glifosato e de inibidor de PSII pode ser usado como um determinante para a resistência a glifosato de eventos em plantas de milho.

30 Exemplo 5

Seleção de eventos historicamente tem sido feita em testes de campo, por observação de dano a partir de glifosato, usualmente, com tra-

tamentos feitos mais tarde na estação, e por comparação de rendimentos de cultura. Esses tipos de experimentos, e os dados resultantes, são úteis para verificar a correlação descrita pelo exame com glifosato/inibidor de PSII da invenção.

5 A tolerância a glifosato de eventos em milho Roundup Ready de NK 603 e GA 21 foram caracterizados em testes de campo. Milho foi planta-
do em filas de 91,44 cm (36 polegadas) em pontos de 4 filas por 9,14 cm
(30 pés) com as duas filas de centro sendo colhidas. O estudo compreendeu
22 locais com 4 replicatas de cada experimento por local e os dados foram
10 reunidos através dos locais. Plantas de milho foram tratadas com glifosato em duas idades de desenvolvimento consecutivas de V4 e de V8. Taxas de aplicação de glifosato foram de 0,34, 0,68 e 1,06 kg (0,75, 1,5 e 2,23 libras) por acre (lb/A). O volume de aplicação foi de (10 galões)/acre. Em 10 dias depois do tratamento (DAT), foram determinados a percentagem de plantas
15 exibindo clorose (% de clorose), folhas mal-formadas (% de mal-formação) e redução de crescimento (% G.R.). Em 30 DAT, a percentagem de plantas exibindo redução de crescimento foi novamente determinada. Os dados foram expressos como o número de locais exibindo dano maior do que 9%, seguido pela faixa de percentagem de dano observado. Dados para clorose,
20 folhas mal-formadas e redução de crescimento foram coletados em 22 locais. Além disso, na colheita de plantas de milho maduras, a percentagem de rendimento e percentagem de umidade em grão foram avaliadas. Dados para rendimento e umidade de grão foram coletados em colheita em 19 locais e expressos como o rendimento ou umidade percentual média com res-
25 peito aos controles.

Exemplos de resultados mostraram que nem os eventos em milho de NK 603 ou de GA 21 exibiram clorose elevada em 10 DAT em 0,34 kg/A (0,75 lb/A) (ver, por exemplo, a Tabela 5). No entanto, em 0,68 kg/A (1,5 lb/A), o evento de GA 21 exibiu clorose elevada, enquanto que o de NK
30 603 não o fez. Uma tendência de dados similares foi observada para redução de crescimento tanto em 10 DAT quanto em 30 DAT. Tanto GA 21 quanto Nk 603 tiveram percentagens de rendimento significativamente reduzidas,

entretanto, o evento de NK 603 foi menos afetado (ver, por exemplo, a Tabela 6). Tomados em conjunto, esses dados mostram que, enquanto que ambos os eventos testados exibiram tolerância a glifosato, NK 603 é relativamente mais tolerante a glifosato, quando comparado ao evento de GA 21.

- 5 Essas dados são úteis para o fornecimento de um padrão relativo de resistência a glifosato, contra o qual se correlacionar o nível de dano observado em conexão com a metodologia de exame aqui descrita.

TABELA 5: Testes em Milho Roundup Ready

Evento	Taxa de Glifosato	Estágio de tratamento	%Clorose 10 DAT	%Mal-form. 10 DAT	%Redução Crescimento 10 DAT	%Redução Crescimento 30 DAT
GA 21	0,75/0,75	V4/V8	nenhuma	nenhuma	nenhuma	nenhuma
GA 21	1,5/1,5	V4/V8	3(10-14)	5(11-16)	5(10-14)	1(11)
GA 21	2,25/2,25	V4/V8	3(11-21)	6(10-33)	7(11-30)	4(10-13)
NK 603	0,75/0,75	V4/V8	nenhuma	nenhuma	nenhuma	nenhuma
NK 603	1,5/1,5	V4/V8	nenhuma	3(10-11)	nenhuma	nenhuma
NK 603	2,25/2,25	V4/V8	3(11-19)	6(11-19)	3(10-19)	2(11-15)

TABELA 6: Testes em Milho Roundup Ready

Evento	Taxa de Glifosato	Estágio de tratamento	% Rendimento	% Umidade de grão
GA 21	0,75/0,75	V4/V8	101,0	100,7
GA 21	1,5/1,5	V4/V8	97,8	101,0
GA 21	2,25/2,25	V4/V8	90,8	101,6
NK 603	0,75/0,75	V4/V8	103,3	100,2
NK 603	1,5/1,5	V4/V8	99,4	101,7
NK 603	2,25/2,25	V4/V8	96,6	103,1

Exemplo 6

- 10 A interação de glifosato e de inibidor de PSII em algodão Roundup Ready pode ser demonstrada em vários híbridos de algodão e o dano resultante comparado ao dano infligido a plantas de algodão com níveis conhecidos de tolerância a glifosato (isto é, plantas de algodão padrão). Com efeito, essa abordagem usa as plantas de algodão padrão para estabelecer uma curva padrão de resistência a glifosato relativa, onde esta curva
- 15 possa ser usada para avaliar a tolerância a glifosato relativa de plantas de algodão com tolerância a glifosato desconhecida.

Híbridos de algodão, que são testados, conterão eventos de re-

sistência a glifosato. Plantas de algodão com os eventos de 1445 ou de 88913 serão selecionadas como plantas de algodão padrão. Outro híbrido contendo evento, que tem baixa tolerância a glifosato, será escolhido como uma terceira planta padrão. Baixa tolerância a glifosato, para as finalidades

5 deste exemplo, constitui uma tolerância entre tolerância zero e aquela tolerância a glifosato exibida pelos eventos acima. A terceira planta padrão será caracterizada com relação à tolerância a glifosato por meio de métodos similares àqueles descritos no Exemplo 5 para milho. Crescimento de material de planta e regime de tratamento serão conforme descritos no Exemplo 1,

10 exceto que plantas serão deixadas crescer ao estágio, em que 4 folhas estivessem desdobradas (aproximadamente GS 14) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de fotossistema II. No momento da aplicação, plantas de igual tamanho serão selecionadas para cada híbrido ou natural. A inibição de crescimento será medida 10 dias depois do crescimento (DAT).

15 Espera-se que os resultados a partir de experimentos descritos acima mostrarão uma faixa de graus de dano a partir de aplicações somente de glifosato, a partir de essencialmente nenhum dano em eventos de 1445 ou 88913 a dano moderado ou severo no terceiro híbrido selecionado com o evento de baixa tolerância.

20 Portanto, a seleção de três plantas padrão pode se realizada tal que a aplicação conjunta de glifosato e de inibidor de PSII produza um gradiente de dano que possa servir como uma escala relativa de referência para tolerância a glifosato de plantas examinadas com tolerância a glifosato desconhecida. A tolerância a glifosato é determinada por exame com relação a,

25 por exemplo, a percentagem de plantas exibindo clorose, folhas malformadas e redução de crescimento.

Exemplo 7

A interação de glifosato e de inibidores de PSII em soja Roundup Ready pode ser demonstrado em vários híbridos de soja e o dano resultante

30 comparado ao dano inflingido a plantas de soja com níveis conhecidos de tolerância a glifosato (isto é, plantas de soja padrão). Com efeito, essa abordagem usa as plantas de soja padrão para estabelecer uma curva padrão de

resistência a glifosato relativa, onde esta curva possa ser usada para avaliar a tolerância a glifosato relativa de plantas de soja com tolerância a glifosato desconhecida.

Híbridos de soja, que são testados, conterão eventos de resistência a glifosato. Plantas de soja com o evento de GM A19788 serão selecionadas como plantas de soja padrão. Outro híbrido contendo evento, que tem baixa tolerância a glifosato, será escolhido como uma terceira planta padrão. Baixa tolerância a glifosato, para as finalidades deste exemplo, constitui uma tolerância entre tolerância zero e aquela tolerância a glifosato exibida pelo evento de GM A19788. A terceira planta padrão será caracterizada com relação à tolerância a glifosato por meio de métodos similares àqueles descritos no Exemplo 5 para milho. Crescimento de material de planta e regime de tratamento serão conforme descritos no Exemplo 1, exceto que plantas serão deixadas crescer ao estágio, em que 4 folhas estivessem desdobradas (aproximadamente GS 14) antes da aplicação de glifosato e de inibidor de fotossistema II. No momento da aplicação, plantas de igual tamanho serão selecionadas para cada híbrido ou natural. A inibição de crescimento será medida 10 dias depois do crescimento (DAT).

Espera-se que os resultados a partir de experimentos descritos acima mostrarão uma faixa de graus de dano a partir de aplicações somente de glifosato, a partir de essencialmente nenhum dano em evento GM A19788 a dano moderado ou severo no terceiro híbrido selecionado com o evento de baixa tolerância.

Portanto, a seleção de três plantas padrão pode se realizada tal que a aplicação conjunta de glifosato e de inibidor de PSII produza um gradiente de dano que possa servir como uma escala relativa de referência para tolerância a glifosato de plantas examinadas com tolerância a glifosato desconhecida. A tolerância a glifosato é determinada por exame com relação a, por exemplo, a percentagem de plantas exibindo clorose, folhas malformadas e redução de crescimento.

Quando se introduz elementos da presente invenção, ou de sua(s) concretização(ões) preferida(s), os artigos "um(a)", "uns(umas)", "o(a)" e

"os(as)" devem pretender significar que há um ou mais dos elementos. Os termos "compreendendo", "incluindo" e "tendo" pretendem ser inclusivos e significar que pode haver elementos adicionais diferentes dos elementos listados.

- 5 Em vista do exposto, será visto que os vários objetos da invenção são alcançados e que outros resultados vantajosos são atingidos. Como várias mudanças poderiam ser feitas nos métodos acima sem se desviar do escopo da invenção, pretende-se que toda a matéria contida na descrição acima e mostrada em qualquer das figuras acompanhantes será interpretada
- 10 como ilustrativa e não em um sentido limitante.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de ensaio da tolerância herbicida em uma planta compreendendo:

5 cultivo da planta até uma idade de desenvolvimento predeterminada ou durante um intervalo de tempo predeterminado;

aplicação de um herbicida, para o qual a tolerância está sendo testada com relação à planta;

10 aplicação de pelo menos um herbicida suplementar, para o qual a tolerância não está sendo testada com relação à planta;

determinação da extensão do dano à planta; e

correlação da extensão do dano à tolerância da planta com relação ao herbicida testado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o herbicida testado é glifosato.

15 3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o herbicida suplementar é um inibidor do Fotossistema II (PSII).

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em uréia substituída, triazina, uracila, fenil-carbamato, piridazona, benzotiadiazol, nitrila e fenil-piridazina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em linurona, diurona, metobromurona, fluometurona, tebutiurona e monolinurona.

25 6. Método, de acordo com a reivindicação 5, em que o inibidor de PSII de uréia substituída é linurona.

7. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em metribuzina, atrazina, cianazina, hexazinona, prometrina e simazina.

30 8. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que o inibidor de PSII é metribuzina.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a planta é monocotiledônea.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que a planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em milho, arroz, trigo, cevada, aveia, centeio, trigo negro, cana-de-açúcar, cebola, banana, tâmara e abacaxi.

5 11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que a planta monocotiledônea é milho.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que a planta monocotiledônea é arroz.

10 13. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que a planta monocotiledônea é trigo.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a planta é uma dicotiledônea.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que a planta dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, soja, canola, soja, lentilha, amendoim, açafrão, brócolis, alface, trevo, cenoura, morango, framboesa, laranja, maçã, cereja, ameixa, salsa, coentro, aneto e erva-doce.

20 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que a planta dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, soja, lentilha, amendoim, alface e açafrão.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que o herbicida testado e o herbicida suplementar são aplicados em combinação.

25 18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que o herbicida testado e o herbicida suplementar são aplicados em momentos diferentes.

30 19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, compreendendo adicionalmente a etapa de comparação da extensão do dano à planta com pelo menos uma planta padrão com uma tolerância conhecida com relação ao herbicida testado, sendo que a planta padrão recebe um regime de tratamento substancialmente similar à planta.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que existem

pelo menos duas plantas padrão.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que existem pelo menos três plantas padrão.

5 22. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que existem pelo menos quatro plantas padrão.

23. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que pelo menos uma planta padrão é uma planta de milho compreendendo um evento de milho independentemente selecionado a partir do grupo consistindo em NK 603 e GA 21.

10 24. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que pelo menos uma planta padrão é uma planta de milho padrão com uma resistência a glifosato substancialmente similar a eventos de milho independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em NK 603 e GA 21.

15 25. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que pelo menos uma planta padrão não compreende um evento que forneça tolerância à glifosato.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, em que o herbicida testado é aplicado em uma taxa herbicidamente eficaz.

20 27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que o herbicida testado é aplicado em cerca de 1 x a cerca de 4x a taxa de aplicação no campo.

25 28. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que o herbicida testado é glifosato e o glifosato é aplicado em uma concentração de cerca de 840 gramas por hectare (g/ha) a cerca de 3.360 g/ha.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, em que o herbicida testado é glifosato e o glifosato é aplicado em uma concentração de cerca de 1.680 a cerca de 2.520 g/ha.

30 30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, em que pelo menos um herbicida suplementar é aplicado em uma concentração não suficiente para prejudicar de maneira significativa a planta quando aplicado de maneira independente.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, em que pelo menos um herbicida suplementar é aplicado em cerca de 1/4x a cerca de 1x a taxa de aplicação no campo.

5 32. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos um herbicida suplementar é um inibidor de PSII e o inibidor de PSII é aplicado em uma concentração de cerca de 56 g/ha a cerca de 224 g/ha.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, em que a planta é cultivada até uma idade de desenvolvimento prede-
10 tar.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, em que a planta é uma planta de milho cultivada até uma idade de desenvolvimento de cerca de estágio de crescimento (GS) 11 a cerca de GS 12, antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

15 35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, em que a planta é cultivada durante um intervalo de tempo predeterminado, antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, em que a planta é uma planta de milho cultivada durante cerca de 14 dias a cerca de 21 dias,
20 antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, em que a planta é cultivada durante cerca de 2 a cerca de 15 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

25 38. Método, de acordo com a reivindicação 37, em que a planta é uma planta de milho cultivada durante cerca de 5 a cerca de 10 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, em que a planta de milho é cultivada durante cerca de 8 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

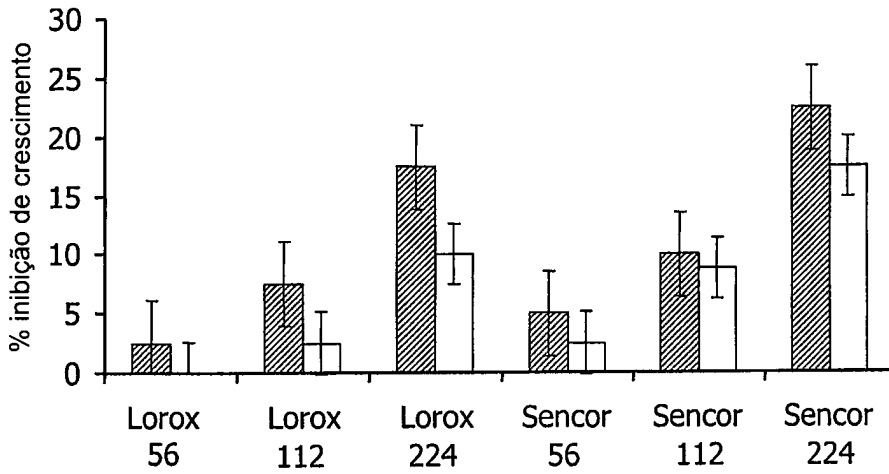
30 40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que a extensão do dano é medida como inibição do crescimento.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

39, em que a extensão do dano é medida como clorose.

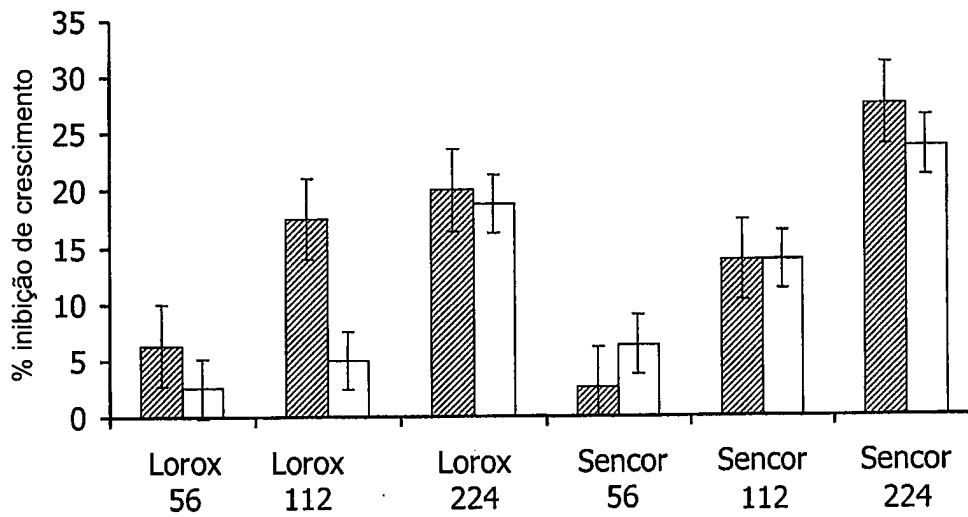
42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que a extensão do dano é medida como necrose.

FIG. 1



■ DK 580 (GA 21 EVENTO)
 □ DKC 53-33 (NK 603 EVENTO)

FIG. 2



■ DK 580 (GA 21 EVENTO)
 □ DKC 53-33 (NK 603 EVENTO)

FIG. 3

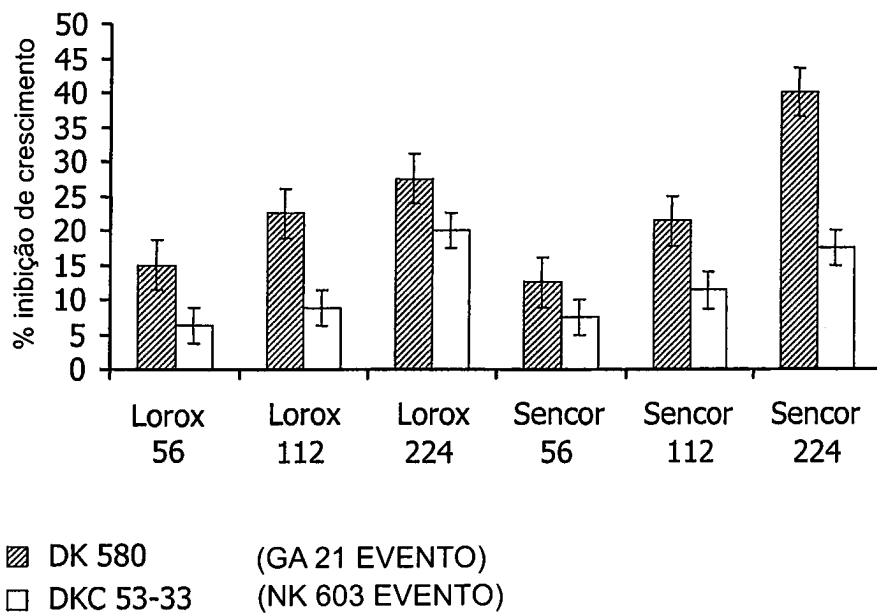


FIG. 4

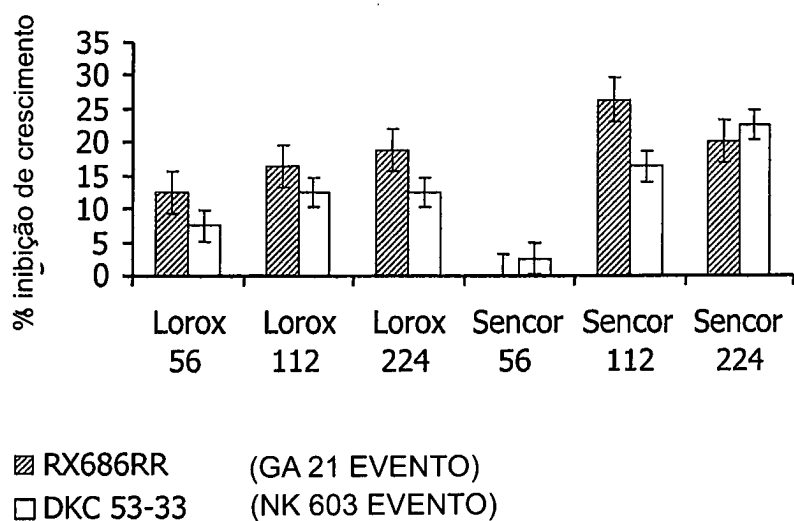
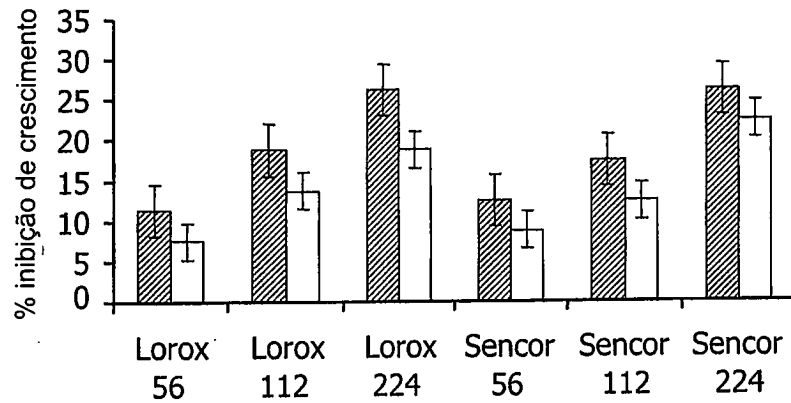
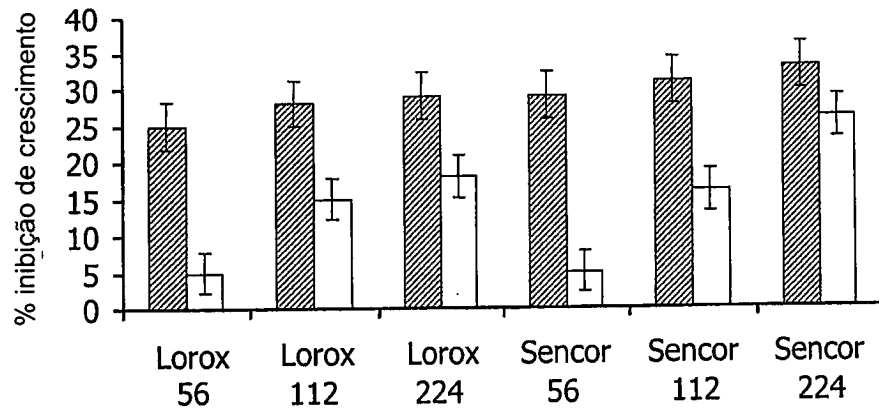


FIG. 5



■ RX686RR (GA 21 EVENTO)
 □ DKC 53-33 (NK 603 EVENTO)

FIG. 6



■ RX686RR (GA 21 EVENTO)
 □ DKC 53-33 (NK 603 EVENTO)

RESUMO

Patente de Invenção: **"INTERAÇÃO DE GLIFOSATO COM HERBICIDAS DE INIBIDOR DE FOTO-SISTEMA II COMO UMA FERRAMENTA DE SELEÇÃO PARA EVENTOS DE ROUNDUP READY"**.

5 A presente invenção refere-se a um método de avaliação de tolerância herbicida em uma planta. O método de determinação de tolerância herbicida em plantas compreende a aplicação do herbicida a ser testado em conjunção com pelo menos um herbicida suplementar, a determinação da extensão de dano resultante, e correlação da extensão do dano com relação
10 à tolerância herbicida da planta.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE ENSAIO DA TOLERÂNCIA HERBICIDA EM UMA PLANTA**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se, de maneira genérica, à avaliação da tolerância herbicida em plantas. Mais particularmente, a invenção refere-se à avaliação da tolerância a glifosato em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como milho, arroz, trigo, algodão, soja, canola, amendoim, feijão, lentilha, alfafa e açafrão.

Antecedentes

10 Milho é uma cultura importante e é a fonte de alimentação primária para seres humanos e animais domesticados em muitas áreas do mundo. Os processos de biotecnologia têm sido aplicados ao milho para aperfeiçoamento das características agronômicas e da qualidade do produto. Uma tal característica agronômica é a tolerância herbicida, em particular, a tolerância ao herbicida glifosato. Essa característica em
15 milho pode ser conferida pela expressão de um transgene nas plantas de milho.

Sabe-se que expressão de genes exógenos em plantas é influenciada por sua posição cromossomial, talvez devido à estrutura de
20 cromatina (por exemplo, heterocromatina) ou à proximidade a elementos de regulação transcricional (por exemplo, intensificadores) próximos ao sítio de integração. Weising et al., *Ann. Rev. Genet* (1988) 22, 421-477. Por essa razão, é freqüentemente necessário selecionar um grande número de eventos, a fim de identificar um evento caracterizado por expressão ótima de um gene de interesse introduzido. Por exemplo, foi observado, em plantas e em outros organismos, que pode haver uma ampla variação em níveis de expressão de um gene introduzido entre eventos. Também pode haver diferenças em padrões de expressão espaciais ou temporais, por exemplo, diferenças na expressão relativa de um transgene em vários tecidos de plantas, que podem não corresponder aos padrões esperados a partir de elementos reguladores transcricionais presentes
30 no construto de gene introduzido.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de ensaio da tolerância herbicida em uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 cultivo da planta até uma idade de desenvolvimento predeterminada ou durante um intervalo de tempo predeterminado;

aplicação de um herbicida, para o qual a tolerância está sendo testada com relação à planta;

aplicação de pelo menos um herbicida suplementar, para o qual a tolerância não está sendo testada com relação à planta;

10 determinação da extensão do dano à planta; e

correlação da extensão do dano à tolerância da planta com relação ao herbicida testado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado é glifosato.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o herbicida suplementar é um inibidor do Fotossistema II (PSII).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em uréia substituída, triazina, uracila, fenil-carbamato, piridazona, benzotiadiazol, nitrila e fenil-piridazina.

25 5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em linurona, diurona, metobromurona, fluometurona, tebutiurona e monolinurona.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PSII é linurona.

30 7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PSII é selecionado a partir do grupo consistindo em metribuzina, atrazina, cianazina, hexazinona, prometrina e simazina.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PSII é metribuzina.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a planta é monocotiledônea.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em milho, arroz, trigo, cevada, aveia, centeio, trigo negro, cana-de-açúcar, cebola, banana, tâmara e abacaxi.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é milho.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é arroz.

13. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é trigo.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a planta dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, soja, canola, soja, lentilha, amendoim, açafrão, brócolis, alface, trevo, cenoura, morango, framboesa, laranja, maçã, cereja, ameixa, salsa, coentro, aneto e erva-doce.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a planta dicotiledônea é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, soja, lentilha, amendoim, alface e açafrão.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado e o herbicida complementar são aplicados em combinação.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado e o herbicida complementar são aplicados em momentos diferentes.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, a etapa de comparação da extensão do dano à planta com pelo menos uma planta padrão com uma tolerância conhecida com relação ao herbicida testado, sendo

que a planta padrão recebe um regime de tratamento substancialmente similar à planta.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que existem pelo menos duas plantas padrão.

5 21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que existem pelo menos três plantas padrão.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que existem pelo menos quatro plantas padrão.

10 23. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma planta padrão é uma planta de milho compreendendo um evento de milho independentemente selecionado a partir do grupo consistindo em NK 603 e GA 21.

15 24. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma planta padrão é uma planta de milho padrão com uma resistência a glifosato substancialmente similar a eventos de milho independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em NK 603 e GA 21.

20 25. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma planta padrão não compreende um evento que forneça tolerância à glifosato.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado é aplicado em uma taxa herbicidamente eficaz.

25 27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado é aplicado em cerca de 1 vez a cerca de 4 vezes a taxa de aplicação no campo.

30 28. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado é glifosato e o glifosato é aplicado em uma concentração de cerca de 840 gramas por hectare (g/ha) a cerca de 3.360 g/ha.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o herbicida testado é glifosato e o glifosato é aplicado em uma

concentração de cerca de 1.680 a cerca de 2.520 g/ha.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que pelo menos um herbicida suplementar é aplicado em uma concentração não suficiente para prejudicar de maneira significativa a planta quando aplicado de maneira independente.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que pelo menos um herbicida suplementar é aplicado em cerca de 1/4x a cerca de 1x a taxa de aplicação no campo.

32. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um herbicida suplementar é um inibidor de PSII e o inibidor de PSII é aplicado em uma concentração de cerca de 56 g/ha a cerca de 224 g/ha.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que a planta é cultivada até uma idade de desenvolvimento predeterminada antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta de milho cultivada até uma idade de desenvolvimento de cerca de estágio de crescimento (GS) 11 a cerca de GS 12, antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que a planta é cultivada durante um intervalo de tempo predeterminado, antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta de milho cultivada durante cerca de 14 dias a cerca de 21 dias, antes da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que a planta é cultivada durante cerca de 2 a cerca de 15 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta de milho cultivada durante cerca de 5 a cerca de 10 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

5 39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a planta de milho é cultivada durante cerca de 8 dias depois da aplicação do herbicida testado e do herbicida suplementar.

10 40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que a extensão do dano é medida como inibição do crescimento.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que a extensão do dano é medida como clorose.

15 42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que a extensão do dano é medida como necrose.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO DE ENSAIO DA TOLERÂNCIA HERBICIDA EM UMA PLANTA"**.

5 A presente invenção refere-se a um método de avaliação de tolerância herbicida em uma planta. O método de determinação de tolerância herbicida em plantas compreende a aplicação do herbicida a ser testado em conjunção com pelo menos um herbicida suplementar, a determinação da extensão de dano resultante, e correlação da extensão do dano com relação à tolerância herbicida da planta.