

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 716**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2000 E 05009071 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 1554932**

54 Título: **Uso de lipo-quitooligosacáridos para aumentar la fotosíntesis en plantas y métodos y composiciones correspondientes**

30 Prioridad:

08.10.1999 CA 2285727

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

27.05.2015

73 Titular/es:

**MCGILL UNIVERSITY (100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, 3550
UNIVERSITY STREET
MONTREAL, QUEBEC H3A 2A7, CA**

72 Inventor/es:

**SMITH, DONALD L.;
PRITHIVIRAJ, BALAKRISHNAN;
ZHOU, XIAOMIN y
SOULEIMANOV, ALFRED**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 716 T3

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

DESCRIPCIÓN

5 Uso de lipo-quitooligosacáridos para aumentar la fotosíntesis en plantas y métodos y composiciones correspondientes

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a la agricultura. Más particularmente, la invención se refiere a un método para aumentar la fotosíntesis de una planta de cultivo. Además, la invención se refiere a un método para aumentar la fotosíntesis en plantas de cultivo, que comprende una exposición de las mismas a lipo-quitooligosacáridos y composiciones de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, conocidas colectivamente como los rizobios, forman órganos especializados denominados nódulos en las raíces, y a veces en los tallos de las leguminosas y fijan nitrógeno atmosférico dentro de estas estructuras. La formación de nódulos es un proceso altamente especializado que está modulado por moléculas señal. En general, esta fase de la interacción es un proceso en dos etapas. Inicialmente, las moléculas de señal desde la planta a las bacterias, habitualmente flavonoides o isoflavonoides específicos, se liberan por las raíces de las plantas hospedadoras. En respuesta a las señales desde la planta a las bacterias, el microsimbionte libera moléculas de señal desde las bacterias a la planta, que son lipo-quitooligosacáridos (LQO), denominados genes de los factores nod (también *nod* y *noe*) muy rápidamente (solamente unos minutos después de la exposición) y a concentraciones muy bajas (de 10^{-7} a 10^{-8} M) (Peters *et al.*, 1986). Generalmente esto tiene lugar a través de una interacción con *nodD*, el cual activa los genes *nod* comunes, aunque la situación puede ser más compleja, como en el caso de *B. japonicum* donde están implicados *nodD₁*, *nodD₂* y *nodVW* (Gillette y Elkan 1996; Stacey 1995). Los genes nod se han identificado en los rizobios que forman relaciones de fijación de nitrógeno con una serie de miembros de la familia Fabaceae (véase el documento US 5.549.718 y las referencias en el mismo). Recientemente, se ha demostrado que las moléculas señal desde la planta a las bacterias promueven la nodulación de la soja y la fijación de nitrógeno a temperaturas del suelo frías (documento CA 2.179.879) y aumentan el rendimiento final del grano de soja en un promedio del 10 % en el campo y hasta el 40 % en determinadas condiciones. (Long, 1989; Kondorosi, 1991; Schenes *et al.*, 1990; Boone *et al.*, 1999). Entre los productos de los genes nod inducidos por las moléculas de señal fenólicas de la planta están diversas enzimas implicadas en la síntesis de una serie de lipo-quitooligosacáridos (LQO) (Spaink, 1995; Stacey, 1995). Estos LQO de nueva síntesis actúan como señales desde las bacterias a la planta, induciendo la expresión de muchos de los genes tempranos de nodulina (Long, 1989).

35 Las moléculas señal de LQO están compuestas de tres a cinco restos de acetilglucosamina con enlaces β 1-4 con el grupo N-acetilo del azúcar no reductor terminal reemplazado por una cadena de acilo. Sin embargo, son posibles varias modificaciones de la estructura básica y estas, al menos en parte, determinan la especificidad de hospedador de los rizobios (Spaink *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1992).

40 Se sabe que los lipo-quitooligosacáridos afectan a una serie de procesos fisiológicos de la planta hospedadora. Por ejemplo, estos inducen: la deformación de los pelos radiculares (Spaink *et al.*, 1991), la ontogenia de las estructuras completas del nódulo (Fisher y Long, 1992; Denarie y Cullimore, 1993), la división de las células corticales (Sanjuan *et al.*, 1992; Schlaman *et al.*, 1997) y la expresión de genes de nodulina del hospedador esenciales para la formación del hilo de infección (Horvath *et al.*, 1993; Pichon *et al.*, 1993; Minami *et al.*, 1996). También se ha mostrado que los LQO activan genes relacionados con enzimas defensivas (Inui *et al.*, 1997). Estas señales desde la bacteria a la planta ejercen una influencia poderosa sobre el genoma de la planta y, cuando se añaden en ausencia de las bacterias, pueden inducir la formación de nódulos radiculares (Truchet *et al.*, 1991). Por tanto, las señales desde la bacteria a la planta pueden, sin la bacteria, inducir toda la actividad génica para la organogénesis del nódulo (Denarie *et al.*, 1996; Heidstra y Bisseling, 1996). Además, las actividades anteriormente mencionadas inducidas por los LQO pueden producirse por concentraciones tan bajas como 10^{-14} M (Stokkermans *et al.* 1995). El intercambio mutuo de señales entre las bacterias y la planta son esenciales para la interacción simbiótica. Los rizobios mutantes incapaces de sintetizar LQO no formarán nódulos. El análisis de los genes *nod* de *B. japonicum* indica que la capacidad de inducir la nodulación de la soja requiere al menos 1) un factor Nod tetramérico básico que requiere solamente los genes *nodABC* o 2) un LQO pentamérico LQO (C18:1, C16:0 o C16: un ácido graso y una metilfucosa en el extremo reductor, a veces acetilada) que requiere los genes *nodABCZ* (Stokkermans *et al.* 1995).

50 Cuando se añaden a la leguminosa adecuada, los LQO pueden causar la inducción de los meristemos nodulares (Denarie *et al.* 1996), y por lo tanto la actividad de división celular. También se ha mostrado que los LQO inducen actividades del ciclo celular en un sistema *in vitro*: (un sistema de embriogénesis de zanahoria) a niveles tan bajos como 10^{-14} M (DeJong *et al.* 1993).

60 Se ha descrito una estructura química de lipo-quitooligosacáridos, también denominada "señales simbióticas Nod" o "factor Nod", en las Patentes de EE.UU. 5.549.718 y 5.175.149. Estos factores Nod tienen las propiedades de un

ligando de lectina o de sustancias de lipooligosacáridos que pueden purificarse de bacterias o sintetizarse o producirse mediante ingeniería genética.

El proceso de la fijación N₂ es energéticamente intenso requiriendo aproximadamente el 10-20 % del carbono fijado por la planta. Se ha estimado que se requiere un promedio de aproximadamente 6 mg de carbono por mg de nitrógeno fijado (Vance y Heichel, 1991). La fotosíntesis potenciada, debida a la asociación *Bradyrhizobium*-soja se ha notificado anteriormente. Imsande (1988, 1989) notificó una fotosíntesis neta y un rendimiento del grano potenciados en soja inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* en comparación con las plantas que no se inocularon pero que se complementaron adecuadamente con fertilizante de N. Recientemente, Phillips *et al.*, (1999) mostraron que el lumicromo podría actuar como una molécula de señal en la rizosfera de las plantas de alfalfa, dando lugar a una respiración y una asimilación de carbono neta aumentadas durante las etapas tempranas de la simbiosis de *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa.

Los métodos para aumentar la acumulación de materia seca y el rendimiento de la planta son esenciales ya que está proyectado que la población mundial crezca en 4 mil millones (66 %) durante los próximos cincuenta años (Naciones Unidas, División de Población, 1998). En los últimos cincuenta años, la producción de los cultivos aumentó en 2,5 veces, con poco aumento del área de tierra cultivada (Hoisington *et al.*, 1999). Dado el aumento proyectado en la población mundial debe proporcionarse otro aumento de 2,5 veces durante los próximos 50 años para que todo el mundo tenga un acceso razonablemente viable a los alimentos (James, 1997). Sin embargo, las principales causas del aumento de producción de alimentos durante los últimos 50 años (aumentos en el índice de cosechas, la cantidad de tierra en irrigación y el uso de fertilizantes, particularmente fertilizante de N) se han agotado en gran medida. Un siglo de cruzamientos de plantas ha dado como resultado un pequeño o ningún aumento en las tasas fotosintéticas de la mayor parte de las plantas de cultivo (Moss y Musgrave, 1971; Evans 1975, 1980). Por lo tanto sigue habiendo una necesidad tremenda de aumentar las tasas fotosintéticas y el crecimiento de las plantas de cultivo. También sigue habiendo una necesidad de aumentar la producción de las plantas de cultivo.

El documento DE 19633502 divulga que la aplicación de una composición que contiene LQO en las hojas de la vid para potenciar el efecto de determinados fungicidas da como resultado el crecimiento reducido de las plantas tratadas.

Ha habido esfuerzos considerables para potenciar la fotosíntesis en plantas de cultivo con vistas a aumentar la productividad de la planta. Makela *et al.*, (1999) notificaron la fotosíntesis potenciada bajo estrés por sequía y salinidad en tomate y nabo forrajero después de la aplicación foliar de glicina-betanina a muy bajas concentraciones. La aplicación foliar de metanol también aumentó la fotosíntesis en una serie de plantas (Noumora y Benson, 1991). Johnson y Stelizer (1991) notificaron la fotosíntesis aumentada en pino taeda por la aplicación de dosis subletales de hexazinona.

El documento AT 494324 describe la aplicación de una composición basada en *Rhizobium* a tomate, pimiento y maíz, dando como resultado la fotosíntesis y crecimiento de la planta aumentados.

Aunque que se han descrito los efectos de las moléculas de señal desde la planta a las bacterias (es decir, isoflavonas) en la nodulación, la fijación de nitrógeno, el crecimiento y el rendimiento proteico de leguminosas, tales como la soja, y en las moléculas de señal desde las bacterias a la planta (LQO) en la nodulación y la fijación de nitrógeno en leguminosas en determinadas condiciones, se desconoce el efecto de las moléculas señal desde las bacterias a la planta en el crecimiento de las no leguminosas. De hecho, aún no se ha comunicado el papel de dichas moléculas señal desde las bacterias a la planta en no leguminosas. Además, aún no se ha descrito el efecto de los LQO en los procesos distintos a la nodulación de las leguminosas. Asimismo, aunque los LQO se han asociado con un efecto promotor del crecimiento en las etapas tempranas de la iniciación de la relación simbiótica entre la planta y las bacterias, queda por determinar si los LQO pueden tener un efecto en plantas en etapas más tardías de su ciclo de vida.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de evaluar el efecto de los LQO en el crecimiento de la planta y especialmente en las etapas más tardías del mismo. Además, sigue habiendo una necesidad de evaluar si las composiciones que comprenden LQO pueden tener un efecto en la tasa sintética y/o crecimiento de las plantas en general y especialmente de las plantas no leguminosas.

También sigue habiendo una necesidad de entender mejor el funcionamiento del complejo sistema homeostático que está implicado en la regulación de la fotosíntesis. Además, sigue habiendo una necesidad de evaluar el papel de los LQO en la fotosíntesis de las plantas.

La presente invención busca satisfacer estas y otras necesidades.

La presente descripción se refiere a una serie de documentos, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad al presente documento por referencia.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos y composiciones para aumentar la tasa fotosintética.

5 Sorprendentemente, las composiciones que se usan en la presente invención no solamente actúan en una leguminosa, tal como la soja, sino en plantas en general, tal como se ejemplifica con una serie de cultivos de no leguminosas. Más específicamente, estos cultivos de no leguminosas se ejemplifican con cultivos diversificados y evolutivamente divergentes tales como el arroz (Poaceae); el melón (Cucurbitaceae); la colza (Brassicaceae); el manzano (Rosaceae); y la vid (Vitaceae).

10 La presente invención demuestra que rociando los LQO sobre las hojas de una planta (por ejemplo, una aplicación foliar) se aumenta significativamente la tasa fotosintética de la misma. La presente invención, por lo tanto, se refiere a métodos para aumentar la tasa fotosintética de plantas evolutivamente divergentes que consisten en la aplicación foliar directa a una de cultivo, preferentemente mediante rociado, de una composición que comprende una cantidad potenciadora de la fotosíntesis de al menos un lipo-quitooligosacárido (LQO) y un vehículo agrícolamente adecuado.

15 En un conjunto particular de experimentos se demostró que una composición que comprende un LQO potenciaba significativamente la tasa fotosintética de plantas evolutivamente divergentes, tales como la soja (Fabaceae), el maíz, el arroz (Poaceae), el melón (Cucurbitaceae), la colza (Brassicaceae), el manzano (Rosaceae) y la vid (Vitaceae), en condiciones de invernadero.

En otro conjunto de experimentos en el campo se demostró, que una composición que comprende LQO aumentaba significativamente la tasa fotosintética de la soja, el maíz, el manzano y la vid.

25 Aunque la presente invención, se ha demostrado usando plantas evolutivamente divergentes, será evidente para una persona experta en la materia a la cual pertenece esta invención, que basándose en la distancia evolutiva entre los tipos de plantas ensayadas y su respuesta similar a una aplicación de LQO, se espera que otros tipos de plantas deberían responder de modo similar a la aplicación de LQO, mostrando un aumento de la tasa fotosintética.

30 La presente invención puede aplicarse a plantas en general. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos para distintas familias de plantas incluyendo, pero sin limitación, Poaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Brassicaceae, Rosaceae, Vitaceae, Fabaceae y Solanaceae. Más específicamente, los cultivos dentro del alcance de la presente invención incluyen sin limitación maíz, algodón, cantalupo, melón, pepino, colza, lechuga, patata, manzano, vid y remolacha. Los ejemplos no limitantes de plantas de cultivo también incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas, miembros de la familia de los pastos (que contiene a los cereales) y leguminosas.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos para usar composiciones agrícolas que comprenden al menos un LQO para promover aumentos de la tasa fotosintética. Será evidente para una persona experta en la materia que pueden añadirse otros compuestos para el aumento de la tasa fotosintética, y/o aumento del rendimiento a las composiciones de la presente invención.

40 El Solicitante ha demostrado que una composición que comprende un LQO puede tener un efecto significativo en la tasa fotosintética de las leguminosas. Además, el Solicitante ha demostrado el efecto sorprendente de las moléculas de señal implicadas en la señalización bacterias-leguminosa en la tasa fotosintética.

45 También debe entenderse que las plantas convencionales y las plantas genéticamente modificadas pueden usarse de acuerdo con la presente invención. En una realización particular y preferente de la presente invención, se tratan plantas no genéticamente modificadas con el método de la presente invención.

50 Aunque las capacidades para potenciar la tasa fotosintética de las composiciones que se usan en la presente invención se demuestran en las condiciones de campo con el maíz, el manzano, la vid y la soja, se espera que otros cultivos también muestren el mismo tipo de respuesta al tratamiento con LQO. Estas plantas incluyen sin limitación plantas significativamente divergentes de diez familias distintas: (1) el maíz, la única monocotiledónea ensayada en el presente documento, de la familia de los pastos (Poaceae), que también contiene a los cereales; (2) el pepino y el cantalupo, siendo este último una planta usada en horticultura y que germina lentamente a baja temperatura [su temperatura base es de aproximadamente 14 °C] (Cucurbitaceae); (3) el algodón, uno de los cultivos de fibras más importantes del planeta (Malvaceae); (4) la lechuga (Asteraceae); (5) la remolacha (Chenopodiaceae); (6) la patata, un cultivo muy importante (Solanaceae, que también incluyen el tabaco, los pimientos y el tomate); y dos familias de leguminosas (7) la colza, que representa al grupo de las mostazas (Brassicaceae) y (8) la soja (representativa de los cultivos de semillas oleaginosas), la judía (representativa de un cultivo para consumo humano) y el trébol rojo y la alfalfa (leguminosas forrajeras) (todas de la familia Fabaceae); (9) el manzano, que representa a las Rosaceae; y (10) la vid, que representa a las Vitaceae.

65 A la vista de la distancia evolutiva entre las plantas anteriormente enumeradas y su respuesta similar al tratamiento con LQO en condiciones de invernadero o condiciones de campo, puede predecirse que dichos resultados serán de

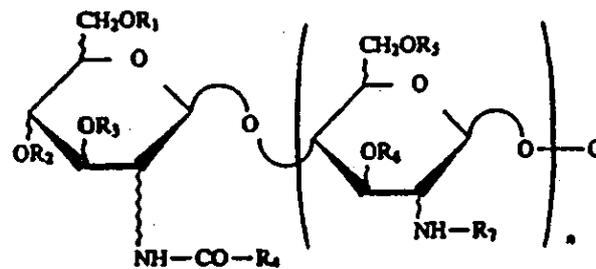
aplicación a las plantas de cultivo en general. De ello se deduce que una persona experta en la materia puede adaptar las enseñanzas de la presente invención a otros cultivos. Los ejemplos no limitantes de los mismos incluyen tabaco, tomate, trigo, cebada, arroz, girasol y plantas crecidas para la producción de flores (margarita, clavel, pensamiento, gladiolo, lirios y similares). Se entenderá que las composiciones pueden adaptarse a cultivos específicos, para satisfacer necesidades específicas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona por lo tanto un método para potenciar la tasa fotosintética de una planta de cultivo que comprende la aplicación foliar de una cantidad promotora de la tasa fotosintética de al menos un lipo-quitooligosacárido (LQO) junto con un vehículo agrícolamente aceptable.

La expresión "oligosacárido de lipoquitina" y el término "lipo-quitooligosacárido" se usan indistintamente en el presente documento.

La expresión "crecido en condiciones de campo" se entenderá que abarca las condiciones a las cuales se somete una planta cuando crece en el campo, en oposición a cuando crece en condiciones más controladas, tales como las condiciones de invernadero.

Tal como se usa en el presente documento, el término "LQO" se refiere ampliamente a un factor Nod que está bajo el control de al menos un gen de nodulación (gen *nod*), común para los rizobios. LQO por lo tanto se refiere a moléculas de señal desde las bacterias a la planta que inducen la formación de nódulos en leguminosas y permiten que las bacterias simbióticas colonicen a las mismas. De manera amplia, los LQO son moléculas de señal de quitooligosacáridos, que actúan como fitohormonas, que comprenden un resto de oligosacárido que tiene un ácido graso condensado en uno de sus extremos. A continuación, se presenta un ejemplo de un LQO como el de la fórmula I



en la que:

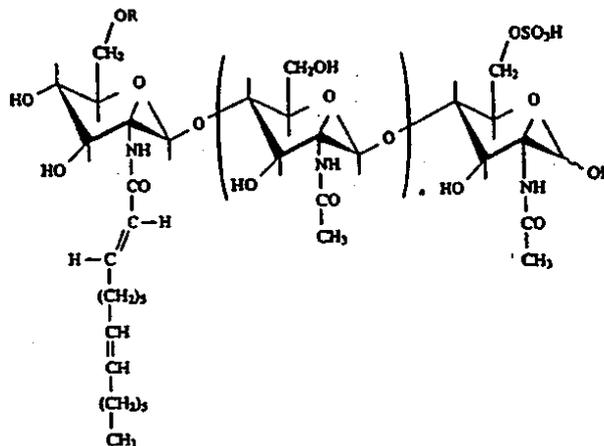
G es una hexosamina que puede sustituirse, por ejemplo, por un grupo acetilo en el nitrógeno, un grupo sulfato, un grupo acetilo y/o un grupo éter en un oxígeno,

R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ y R₇, que pueden ser idénticos o distintos, representan H, CH₃CO-, C_xH_yCO- donde x es un número entero entre 0 y 17, y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo acilo, tal como, por ejemplo un carbamilo,

R₄ representa una cadena alifática mono-, di- o triinsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y

n es un número entero entre 1 y 4.

También se han descrito LQO más específicos de *R. meliloti* en el documento US 5.549.718 como los que tienen la fórmula II



en los que R representa H o CH₃CO- y n es igual a 2 o 3.

Los LQO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1 y NodRM-3. Cuando están acetilados (los R = CH₃CO-), estos se convierten en AcNodRM-1 y AcNodRM-3, respectivamente (documento US 5.545.718).

Los LQO de *B. japonicum* también se han caracterizado en los documentos U.S. 5.175.149 y 5.321.011. De manera amplia, estos son fitohormonas de pentasacáridos que comprenden metilfucosa. Se describe una serie de estos LQO derivados de *B. japonicum* : BjNod-V (C_{18:1}); BjNod-V (Ac, C_{18:1}), BjNod-V (C_{16:1}); y BjNod-V (Ac, C_{16:0}), con "V" indicando la presencia de cinco N-acetilglucosaminas; "Ac" una acetilación; el número que sigue a la "C" indicando el número de carbonos de la cadena lateral del ácido graso; y el número que sigue a ":" el número de dobles enlaces.

También se entenderá que las composiciones que comprenden los distintos LQO, se usan dentro del alcance de la presente invención. De hecho, aunque la presente invención se ilustra con los LQO obtenidos de *B. japonicum*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, y en particular NodBj-V(C_{18:1}, MeFeu), se espera que cualquier LQO producido por un rizobio que sea capaz de entrar en una relación de fijación de nitrógeno con una leguminosa (es decir, un miembro de la familia Fabaceae) muestre las mismas propiedades que los LQO ilustrados en el presente documento. Será evidente para la persona el experto habitual en la materia, que puede ser ventajosa la selección de un rizobio que se sabe que expresa los LQO a altos niveles, o que se sabe que expresa un LQO que tiene un efecto de un espectro de leguminosas más amplio (tal como NGR234).

También será evidente que las composiciones de LQO usadas en la presente invención también pueden comprender más de una molécula de señal. Los ejemplos no limitantes de dichas composiciones incluyen composiciones agrícolas que comprenden además de un LQO: (1) al menos un LQO adicional; (2) al menos una molécula de señal desde la planta a las bacterias; (3) ácido giberélico u otros agentes o compuestos que se sabe que promueven el crecimiento o vigor de las plantas; y mezclas de dichas composiciones (1), (2) o (3).

Resulta evidente que al haber identificado nuevos usos para los LQO, se pueden modificar bacterias genéticamente para expresar genes nod y usarse para producir LQO o para la administración directa a las plantas y/o semillas.

Por lo tanto, Aunque la presente invención se demuestra en particular con los LQO de *Bradyrhizobium japonicum*, y los cultivos de leguminosas y no leguminosas seleccionados, la invención no es tan limitada. Pueden usarse otros cultivos leguminosos, cultivos de no leguminosas y cepas rizobianas usando los mismos principios que se enseñan en el presente documento. Los grupos de cultivos de leguminosas emparejados con rizobios incluyen, por ejemplo:

Especie rizobiana	Grupo de cultivo de leguminosa
<i>R. meliloti</i> alfalfa,	meliloto
<i>R. leguminosarum</i>	guisantes, lentejas
<i>R. phaesolii</i>	judías
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	sojas
<i>R. trifolii</i>	trébol rojo

Será evidente para el experto habitual en la materia a la que se dirige la presente invención que las composiciones estimuladoras del crecimiento de la presente invención pueden aplicarse a otras plantas de cultivo y especialmente a otras plantas de cultivo adaptadas a climas cálidos (plantas o cultivos que han evolucionado en condiciones cálidas [es decir, tropicales, subtropicales o zonas de temperatura cálida] y cuyo metabolismo está optimizado para dichos climas). Debe entenderse que las composiciones potenciadoras de la fotosíntesis de la presente invención deberían encontrar utilidad siempre que un cultivo particular crezca en unas condiciones que limiten su crecimiento. Por ejemplo, siempre que una planta de cultivo particular crezca a una temperatura (o en parámetros ambientales) que esté por debajo de su temperatura óptima para la fotosíntesis y/o crecimiento. Dichas temperaturas se conocen en la técnica. Por ejemplo, las temperaturas óptimas para la germinación del maíz, la soja, el arroz y el algodón son de 30 °C, 34-36 °C, 30-32 °C, y 34 °C, respectivamente. Las temperaturas de germinación mínimas (o temperaturas base) para estos cultivos son de 9 °C, 4 °C, 8 a 10 °C, y 14 °C, respectivamente, mientras que las temperaturas de germinación máximas son de 40 °C, 42-44 °C, 44 °C y 37 °C, respectivamente. Las composiciones de la presente invención por lo tanto encuentran utilidad, entre otras cosas, para potenciar la fotosíntesis de cultivos adaptados a climas cálidos cuando crecen a temperaturas entre su temperatura base para la fotosíntesis y/o crecimiento. Las composiciones de la presente invención encuentran utilidad en general en la potenciación de la tasa de fotosíntesis de plantas de cultivo cuando crecen en condiciones que retrasan o inhiben la fotosíntesis y/o crecimiento de las mismas. Los ejemplos no limitantes de dichas condiciones de inhibición (tal como se conoce a partir de su inhibición de la señalización en interacciones bacteria-leguminosa, su inhibición o retraso de la relación simbiótica bacterias-planta) incluyen estrés por pH, estrés térmico, y estrés hídrico.

Se reconocerá, no obstante, que los métodos de la presente invención también pueden potenciar el crecimiento de las plantas en condiciones óptimas de crecimiento.

Por lo tanto, los métodos de la presente invención no deberían limitarse a plantas que crecen en condiciones subóptimas.

La expresión "condiciones ambientales que inhiben o retrasan la relación simbiótica bacterias-planta" debe interpretarse en el presente documento como denominadora de las condiciones ambientales que posponen o inhiben la producción e intercambio de moléculas de señal entre las mismas e incluye, sin limitarse a las mismas: condiciones que estresan a la planta, tales como el estrés por temperatura, estrés hídrico, estrés por pH así como concentraciones inhibitoras de nitrógeno en el suelo o nitrógeno fijado.

"Una cantidad potenciadora de la fotosíntesis" para aumentar la tasa fotosintética de una planta de cultivo de acuerdo con la presente invención, se refiere a una cantidad que es suficiente para dar como resultado una potenciación estadísticamente significativa de la tasa fotosintética de la planta de cultivo en comparación con la tasa fotosintética del cultivo vegetal tratado con el control. Tal como se verá a continuación, la actividad fotosintética y/o promotora del rendimiento de los LQO puede observarse a lo largo de un intervalo amplio de concentraciones. De hecho, las actividades promotoras de la tasa fotosintética de los LQO pueden observarse a una concentración aplicada de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-14} M, preferentemente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} M y más preferentemente de 10^{-6} a aproximadamente 10^{-10} M. Tal como se muestra en el presente documento, sin embargo, la mejor concentración promotora de la tasa fotosintética de los LQO depende de las condiciones de crecimiento (por ejemplo, controladas frente a ambientales) y de la planta tratada. Una persona experta en la materia será capaz de adaptar el intervalo o concentración real de LQO de la composición para satisfacer sus necesidades.

Aunque que se prefiere un método directo de inoculación con la composición de la presente invención, también puede emplearse un método indirecto. Durante la inoculación directa se aplica la composición directamente sobre la planta y preferentemente mediante aplicación foliar. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, rociando las hojas.

Las aplicaciones foliares tales como tratamientos por rociado de las hojas se conocen bien en la técnica. Por supuesto, el método de administración de una composición de la presente invención a las hojas puede adaptarse por un experto para que cumpla con necesidades particulares.

El tiempo al cual los métodos de la presente invención son eficaces para potenciar la tasa fotosintética de la planta de acuerdo con la presente invención, va desde tan pronto como esté presente una hoja hasta la madurez fisiológica de la planta. Más particularmente, la administración del compuesto debería ocurrir entre la etapa de plántula y las etapas tardías del llenado de la vaina. Por lo tanto, la administración puede ocurrir durante las etapas de plántula, floración y llenado de la vaina.

La expresión "condiciones de temporada corta" se refiere en general en el presente documento a temperaturas de las zonas medias y templadas y durante un tiempo más corto. Típicamente, la temporada de crecimiento activo es de alrededor de 1/2 a 2/3 del año. Las condiciones de temporada corta se refieren en general a un periodo libre de congelación menor que la mitad del año, a menudo del orden de 100 días libres de congelación.

Por "gen inductor de la nodulación" o "gen inductor *nod*" se entienden los genes bacterianos que están implicados en el establecimiento y la función del nódulo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Habiendo descrito por lo tanto generalmente la invención, ahora se hará referencia a los dibujos acompañantes, mostrando a modo de ilustración una realización preferente de la misma, y en los que:

La Figura 1 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) a lo largo del tiempo en un aumento en el porcentaje de la tasa fotosintética de la soja (cv Bayfield) en condiciones de invernadero;

La Figura 2 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética del maíz (cv Pioneer 3921) (en el tiempo de efecto máximo, 2 días después del tratamiento)

La Figura 3 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética del arroz (cv Cypress) (en el tiempo de efecto máximo, tres días después del tratamiento);

La Figura 4 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética de la colza (cv Springfield) (en el tiempo de efecto máximo, dos días después del tratamiento);

La Figura 5 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética del melón (cv Nova) (en el tiempo de efecto máximo, tres días después del tratamiento);

La Figura 6 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética del manzano (cv Empire) en condiciones de campo (en el tiempo de efecto máximo, cinco días después del tratamiento);

La Figura 7 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética de la vid (cv DuChaunac) en condiciones de campo (en el tiempo de efecto máximo, tres días después del tratamiento);

La Figura 8 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu), a lo largo del tiempo, en la tasa fotosintética de la soja (cv Bayfield) en condiciones de campo; y

La Figura 9 muestra el efecto del lipo-quitooligosacárido Nod Bj V(C18:1, MeFeu) en la tasa fotosintética del maíz en condiciones de campo (en el tiempo de efecto máximo, dos días después del tratamiento).

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

5 La investigación comunicada en el presente documento se llevó a cabo para estudiar los efectos de las aplicaciones foliares de LQO en las tasas fotosintéticas de una planta hospedadora (soja) y en plantas no hospedadoras (arroz, melón, colza, y maíz) en condiciones de invernadero. También, se llevaron a cabo experimentos de campo para estudiar el efecto de la aplicación de LQO en la fotosíntesis del maíz, la vid, el manzano y la soja. Los experimentos de campo se llevaron a cabo a través del examen del rendimiento y los componentes del rendimiento.

10 Durante el curso del trabajo sobre la capacidad de los LQO para estimular la germinación de las semillas de las plantas, se observó que las plántulas que quedaron expuestas a una composición que comprendía los LQO, después de la germinación, continuaban creciendo más rápido. La posibilidad de que una aplicación de LQO a las hojas pudiera aumentar sus tasas fotosintéticas, conduciendo a tasas de crecimiento más rápidas, se ensayó por tanto del modo anterior. Se demostró de este modo que los LQO aumentan las tasas fotosintéticas y/o rendimiento
15 de las plantas en general, tal como se ilustra tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo con una serie de plantas evolutivamente divergentes.

Se evaluó el efecto del oligosacárido de Lipoquitina (LQO) nod Bj V (C18:1, MeFeu) aislado de *Bradyrhizobium japonicum* 532C en las tasas fotosintéticas de una serie de plantas de cultivo que pertenecen a diversas familias botánicas: soja (Fabaceae), maíz, arroz (Poaceae); melón (Cucurbitaceae), colza (Brassicaceae), manzano (Rosaceae) y vid (Vitaceae). El LQO potenció la fotosíntesis de todas las plantas ensayadas. Sin embargo, el grado de las respuestas es dependiente de la especie vegetal y de la concentración de LQO usada. En condiciones de invernadero, la soja (cv Bayfield) mostró el mayor aumento de la fotosíntesis debido al rociado de LQO; por término medio hubo un aumento de la tasa fotosintética del 50 %. Como una aplicación de LQO dio como resultado una
20 apertura estomática aumentada sin ningún aumento en la concentración de CO₂ en el interior de la hoja, los datos indican que hubo un aumento en la captación de CO₂ por los cloroplastos, que condujo a una apertura estomática aumentada. Las plantas rociadas con LQO tenían mayor área foliar y peso seco que los controles rociados con agua. En condiciones de campo se ensayó el rociado con LQO en plantas de soja, maíz, manzano y vid. En el caso de la soja, el rociado aplicado en las etapas de plántula, floración y llenado de las vainas, dio como resultado un
25 número aumentado de ramas, área foliar, número de vainas, materia vegetal seca y rendimiento del grano. La aplicación de LQO aumentó el rendimiento del grano en un 33-44 %. Los datos ilustran que los LQO pueden usarse para aumentar la productividad de una amplia gama de cultivos.

35 La presente invención se ilustra en más detalle por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Producción, extracción y purificación de lipo-quitooligosacáridos (LQO)

Cultivo bacteriano

Se creció *Bradyrhizobium japonicum* (cepa 532C) a 28 °C en medio de levaduras con manitol (YEM) (10 g de Manitol, 0,5 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄/ H₂O, 0,1 g de NaCl, 0,4 g de extracto de levadura y 1000 ml de agua destilada), pH 6,8, agitado a 150 rpm hasta que la DO₆₂₀ alcanzó 0,4-0,6 (4-6 días) en la oscuridad. A continuación,
45 se comenzó con 2 l de subcultivo bacteriano inoculando con material del primer cultivo (5 ml del primer cultivo por cada 250 ml de medio YEM), durante 5-7 días (DO₆₂₀ - 0,8-1,0), tal como se hizo anteriormente. En esta etapa, se añadieron 0,25 ml de genisteína 50 µM (en metanol) a cada 250 ml de subcultivo bacteriano (concentración de genisteína de 5 µM) y se incubó el cultivo durante 48-96 horas.

Extracción de LQO

50 Se hicieron particiones de fases de dos litros del subcultivo bacteriano contra 0,8 l de 1-butanol para uso en HPLC agitando durante toda la noche. La capa superior de butanol se transfirió a un matraz de evaporación de un litro y se concentró hasta unos 2-3 ml de un material viscoso de color pardo claro con un evaporador rotatorio funcionando a 80 °C (Yamota RE500, Yamato, EE.UU.). Este extracto se resuspendió en 4 ml de acetonitrilo al 18 % y se mantuvo
55 en la oscuridad a 4 °C en un vial de vidrio sellado hasta su uso. El análisis por HPLC (Waters, MA, EE.UU.) se llevó a cabo con una columna de fase inversa Vydac C18 (Vydac, CA, EE.UU.; N° de catálogo # 218TP54) con una caudal de 1,0 ml min⁻¹ y una columna de guarda Vydac (N° de catálogo # 218GK54). Se corrió acetonitrilo al 18 % (AcN/ H₂O; p/p) inicialmente a través del sistema durante al menos 10 min antes de la inyección. Se cargó la muestra y se llevó a cabo la elución isocrática con AcN al 18 % durante 45 min para eliminar todas las fracciones no polares ligeras. A continuación, se llevó a cabo la elución en gradiente durante 90 min con AcN al 18-82 %. El LQO se eluyó a un tiempo de ejecución de la HPLC de 94-96 min.

65 La identidad química del LQO se confirmó por análisis de espectrometría de masas (EM-EM) para que fuera Nod Bj V (C18:1 MeFeu) (R. Carlson, Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos, University of Georgia, Atenas, EE.UU.) y por medio de un ensayo de deformación de los pelos radiculares (Prithiviraj *et al.*, 2000).

Materia Vegetal

Brevemente, se esterilizaron superficialmente semillas de soja (cv AC Bravor) con hipoclorito sódico al 2 % durante 2 min y se lavaron con al menos cuatro cambios de agua destilada estéril. Después, se colocaron las semillas en agar acuoso al 1,5 % (20 ml) en placas Petri de 9 cm de diámetro (dos semillas por placa). Las placas Petri se incubaron en la oscuridad a 25 °C durante 7-8 días; durante este tiempo las semillas germinaron y desarrollaron raíces pivotantes y laterales en la superficie del agar. Las raíces laterales con abundantes pelos radiculares, que podían distinguirse fácilmente por la apariencia vellosa que estos impartían a las raíces laterales, se escindieron con un escalpelo estéril. Estas raíces laterales se colocaron en portaobjetos de vidrio estériles libres de grasa que contenían de 40-60 µl de solución de LQO. Después, se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda y se incubaron durante 24 h a 25 °C en la oscuridad. Al final del tiempo de incubación se recogieron los portaobjetos y se fijaron las raíces en una solución de tinción [azul de metileno (0,02 % p/v) + glicerol (20 % v/v) + fenol (10 % p/v)]. Se observaron los portaobjetos en un microscopio de campo brillante para la deformación de los pelos radiculares.

Ejemplo 2

Tratamiento con LQO y recogida de datos para los experimentos en el invernadero

Tratamiento de las plantas

Se esterilizaron superficialmente semillas de soja (cv Bayfield) con hipoclorito sódico al 2 % durante 3-4 minutos, se lavaron con varios cambios de agua destilada estéril y se germinaron en bandejas de plástico que contenían vermiculita estéril. Las plántulas en la etapa de dos hojas, aproximadamente a los siete días de la siembra, se trasplantaron a macetas de plástico de 15 cm que contenían promix (Premier Brands Inc., New Rochelle, NY., EE.UU.). Se colocaron las macetas en un invernadero y se mantuvieron a 25±2 °C con un ciclo día/noche de 16/8 h. Las plantas se regaron según necesidad.

Se esterilizaron superficialmente semillas de arroz (*Oryza sativa* cv Cypress), colza (*Brassica napus* cv Springfield), maíz (*Zea mays* cv Pioneer 3921) y melón (*Cucumis melo* cv Nova) con hipoclorito sódico al 2 % durante 3-4 min, se lavaron con varios cambios de agua destilada estéril y se plantaron en macetas de plástico (15 cm de diámetro) que contenían promix (Premier Brands Inc., New Rochelle, NY). EE.UU.).

Tratamiento con LQO

Se hicieron concentraciones de LQO (10^{-6} M - 10^{-12} M) con agua destilada que contenía Tween 20 al 0,02 %. También se aplicó un tratamiento control que contenía Tween 20 al 0,02 % pero sin LQO. Dado que las tasas de crecimiento y desarrollo diferían entre las especies vegetales usadas en los experimentos, se llevó a cabo el tratamiento por rociado en distintos tiempos después de la siembra. En general, se aplicó el rociado cuando las plantas eran lo suficientemente grandes como para permitir mediciones fáciles de las tasas fotosintéticas de las hojas. Las edades de las plantas cuando se llevaron a cabo los rociados son las siguientes: soja 21 días después de la siembra (DDS), maíz 25 DDS, arroz 45 DDS, melón (35 DDS) y colza 30 DDS. Se rociaron las plantas con soluciones de LQO hasta el goteo. Se aplicaron los rociados con un atomizador (Nalgene, EE.UU.). Cada planta requirió 2-3 ml de solución de rociado. Cada tratamiento se replicó al menos cinco veces y se organizó en la mesa del invernadero en un diseño de bloques completos al azar. Se repitió cada experimento (con cada una de las especies cultivadas) al menos dos veces.

Recogida de datos

Se registró la fotosíntesis cada 24 h usando un sistema de fotosíntesis portátil Li-Cor 6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.) durante 6 días. En el caso de la soja, se registró la fotosíntesis en la segunda hoja nodal a partir de la parte superior, mientras que en las otras especies usadas se midió la tasa fotosintética para la hoja superior más completamente extendida. Se cosecharon las plantas de soja después de siete días de tratamiento con LQO y se secaron a 80 °C durante 48 h. Se analizaron los datos con el Sistema de Análisis Estadístico (SAS Inc., NC, EE.UU.). Se calculó el aumento en el porcentaje de la fotosíntesis a lo largo del control. Se llevaron a cabo comparaciones de medias múltiples con una prueba DMS protegida con ANOVA, por lo tanto, el ensayo DMS no se realizaba si el ensayo ANOVA no indicaba la presencia de diferencias debidas al tratamiento.

Ejemplo 3

Experimentos de Campo (año 1999)

Soja

El experimento en soja se llevó a cabo en el Lods Agronomy Research Centre, McGill University, Campus Macdonald, Ste-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá durante el periodo de Junio a Septiembre de 1999. Se siguió un diseño de bloques completos al azar con tres bloques. El tamaño de la parcela fue 2 x 4 m con un espacio entre las

hileras de 25 cm y de 10 cm entre las plantas dentro de una hilera. Las semillas de soja (cv OAC Bayfield), tratadas con inoculo comercial *Bradyrhizobium japonicum* (Bios Agriculture Inc., Quebec, Canadá) a la tasa de 3 g por kilogramo de semilla, se plantaron manualmente.

5 25 días después de la siembra se marcaron veinte plantas de cada parcela al azar y se rociaron con soluciones de LQO (10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M) que contenían Tween 20 al 0,02 % hasta el goteo con un rociador manual. También se rociaron las plantas de cada lado dentro de la hilera de las plantas marcadas. Se llevó a cabo un segundo rociado en la etapa de floración y un tercer rociado en el llenado de las vainas.

10 Manzano, Vid y Maíz

Estos experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones hortícolas de la McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá durante Julio de 2000. Las distintas concentraciones de LQO (10^{-8} y 10^{-10} M) se prepararon tal como se describe anteriormente. Se rociaron las ramas de manzano (cv Empire) y las Vides (cv De Chaunac) con LQO y se observó la fotosíntesis cada 24 h durante cinco días con un sistema de fotosíntesis portátil Li-Cor 6400 (Li-Cor Inc., EE.UU.). Se aplicó cada tratamiento a tres ramas de la misma planta. Se tuvo cuidado de asegurarse de que las ramas estaban al mismo nivel y orientación. Se roció parte de cada rama con LQO y la parte restante sirvió como un control. La porción control de la rama se roció con agua destilada que contenía la misma cantidad de Tween 20 que la solución de LQO de tratamiento. Se tomaron las observaciones en 15 hojas por replicado para cada tratamiento. Tanto para el manzano como para la vid se repitió el procedimiento completo dos veces en dos plantas distintas.

Se establecieron parcelas de maíz con hileras sencillas (Pioneer 2921) durante las temporadas de cultivo de 1999 y 2000. Las hileras estaban separadas 75 cm y había una media de 20 cm entre las plantas. Se rociaron las plantas a los 40 DDS. Se registraron las tasas fotosintéticas cada día durante 5 días después de la aplicación del rociado. Sin embargo, no fueron posibles múltiples rociados de LQO en maíz debido a limitaciones en los suministros de LQO, y no se registraron los rendimientos debido a que se usaron solamente parcelas de hileras sencillas.

30 Recogida de los Datos de Campo

Al igual que con los experimentos de interior, se tomaron lecturas fotosintéticas cada día durante cinco días después de la aplicación de LQO. Se recogieron los datos del desarrollo y agronómicos adicionales para la soja. Se llevó a cabo la primera cosecha 25 días después del primer tratamiento por rociado. Se cosecharon cinco plantas de cada parcela y se analizaron las siguientes variables de crecimiento: altura de la planta, número de ramas, número de hojas, área foliar, número de grupos florales, número de vainas, número de nódulos, pesos secos de las hojas, tallo y raíces. La cosecha final se llevó a cabo después de la madurez fisiológica de las plantas (Fehr *et al.* 1971); en este tiempo se cosecharon las quince plantas restantes tratadas de cada parcela y se recogieron los datos del número de ramas, número de vainas, número de semillas y rendimiento del grano por planta.

40 Ejemplo 4

Efecto de los LQO en la tasa fotosintética de la soja y de las no leguminosas en condiciones de invernadero

El rociado de LQO aumentó la tasa fotosintética de la soja a concentraciones muy bajas (Tabla 1).

45 Tabla 1. Efecto del oligosacárido de lipoquitina (Nod Bj V (C18:1, MeFeu)) en la fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la soja en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Días después del tratamiento				
	1	2	4	5	6
Control	11,2 d [®]	8,1 c	10,1 d	12,1 c	10,4 a
10^{-6}	14,9 ab	12,1 a	16,2 a	16,7 ab	13,1 a
10^{-7}	12,1 cd	9,1 bc	12,9 bcd	14,1 bc	11,1 a
10^{-8}	13,8 b	8,1 bc	12,3 cd	16,4 ab	10,3 a
10^{-9}	15,8 a	8,4 bc	15,7 ab	17,5 ab	11,2 a
10-10).	13,6 bc	8,7 bc	14,6 abc	16,9 ab	11,2 a
10-11).	14,0 b	8,7 bc	17,4 a	17,9 a	12,5 a
10-12).	15,0 ab	10,3 ab	16,9 a	17,0 ab	12,0 a
DMS (p<0,05)	1,67	2,24	3,15	3,78	2,87

[®] las medias dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente distintas

(p < 0,05) mediante prueba DMS protegida con ANOVA

La tasa de fotosíntesis aumentó desde el día 1 hasta el día 4 después de lo cual disminuyó y para el día 5 generalmente alcanzó niveles que no eran distintos a los de las plantas control. Sin embargo, el aumento máximo de la fotosíntesis se observó en el día 4 en la mayor parte de los tratamientos. El aumento del porcentaje de fotosíntesis a lo largo del control varió con la concentración del rociado de LQO (Fig.1). El LQO a 10^{-11} M causó el mayor aumento de la tasa fotosintética, seguido por 10^{-12} M, ocurriendo estos máximos cuatro días después del tratamiento, mientras que otras concentraciones causaron aumentos más sostenidos de la fotosíntesis, que permanecieron más altos que el control durante periodos de tiempo más extensos. Los tratamientos con LQO causaron un aumento del área foliar y del peso seco de la soja a los siete días después del tratamiento (Figs. 2 y 3). Los pesos secos de descarga de las plantas tratadas fueron estadísticamente más altos ($p < 0,05$) que los de las plantas control, mientras que las áreas foliares solamente aumentaron numéricamente ($p = 0,09$).

El tratamiento con LQO también potenció las tasas fotosintéticas de las no leguminosas: maíz (Fig. 4), arroz (fig. 5), colza (fig.6) y melón (fig. 7). Fue evidente que los días para el aumento máximo y la concentración más eficaz de LQO difería entre las especies. En general fue común un aumento de la fotosíntesis del 10-20 %. Para las plantas C_3 (arroz, melón, colza) las tasas fotosintéticas aumentadas estuvieron siempre acompañadas por un aumento concomitante en la conductancia estomática y la transpiración mientras que la concentración intracelular de CO_2 no se vio afectada por los tratamientos. Para el maíz (una planta C_4), la aplicación de LQO aumentó la tasa fotosintética, disminuyó la concentración de CO_2 del interior de la hoja y no alteró significativamente la apertura estomática. Estos datos argumentan que el aumento de la tasa fotosintética se debió a un aumento de la captación fotosintética de CO_2 en el interior de la hoja, que, en el caso de las plantas C_3 , desencadenó un aumento de la apertura estomática. Si se hubiera dado el caso de que el aumento de la apertura estomática fuera la causa principal del aumento de las tasas fotosintéticas se habrían esperado aumentos en la concentración de CO_2 en el interior de la hoja (Morison, 1998).

Ejemplo 5

Efecto de los LQO en la tasa fotosintética, crecimiento y rendimiento de la soja y las no leguminosas crecidas en condiciones de campo (año 1999)

Vid; Manzano y Maíz

El rociado de LQO también causó aumentos de las tasas fotosintéticas en el manzano y la vid que crecieron en el campo (Figs. 8 y 9). En el caso del manzano, el aumento de la fotosíntesis alcanzó un pico a los seis días después del tratamiento; el tratamiento con LQO a 10^{-8} M dio como resultado una tasa fotosintética de $1,41 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que la tasa para el control fue $10,8 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Al igual en los otros cultivos, hubo aumentos de la conductancia estomática sin ningún efecto en la Ci. El tratamiento con LQO también aumentó la transpiración (Fig.6). En las vides, el mayor aumento de la tasa fotosintética ocurrió tres días después del tratamiento con LQO a 10^{-10} M, y este dio como resultado un aumento concomitante de la conductancia estomática. La aplicación de LQO aumentó la tasa fotosintética de crecimiento en el campo en un máximo de aproximadamente el 10 % (Fig.10) dos días después de la aplicación del tratamiento. Mientras que la aplicación de LQO causó niveles de Ci reducidos en el invernadero ($p=0,05$) no hubo tal efecto en la Ci de las plantas crecidas en el campo.

Soja

En general, las respuestas fotosintéticas de la soja en el campo fueron similares a las observadas en condiciones de invernadero. El tratamiento con LQO dio como resultado aumentos de las tasas fotosintéticas desde el día uno hasta el día cuatro después de la aplicación. La concentración más eficaz fue de 10^{-6} M, que dio como resultado una tasa fotosintética de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el día tres en comparación con $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para el control (Fig. 10). El aumento de la tasa fotosintética se acompañó por aumentos de la conductancia estomática; de nuevo el tratamiento con LQO a 10^{-6} M dio como resultado los valores de conductancia estomática más altos. Sin embargo, el efecto de los LQO en las plantas crecidas en el campo fue menos pronunciado que para las plantas crecidas en el invernadero y requirió una concentración más alta para mejorar los efectos. El requerimiento de concentraciones más altas puede deberse a las diferencias anatómicas en las hojas; las plantas crecidas en el campo habitualmente tienen cutículas más espesas que las plantas crecidas en el invernadero. Podría darse también el caso de que los microorganismos epifitos, o las hojas en sí mismas, puedan producir quitinasas que degraden el LQO. Dada la probabilidad de menores niveles de actividad microbiana en condiciones de invernadero, ambas cosas pueden contribuir a la necesidad de concentraciones más altas de LQO en el campo que en el invernadero. El menor grado de respuesta en condiciones de campo puede deberse a la mayor variabilidad ambiental, y la probabilidad aumentada de al menos algunas otras limitaciones que imponen estrés, al menos parte del tiempo, en condiciones de campo. Raschke *et al.*, (1979) observó diferencias en la sensibilidad estomática al nivel de CO_2 entre maíz crecido en el invernadero y en el campo. De un modo similar, Talbott *et al.* (1996) mostraron diferencias en la sensibilidad estomática al CO_2 entre plantas crecidas en una cabina y en el invernadero. El tratamiento con LQO dio como resultado la transpiración aumentada, probablemente debida a la apertura estomática aumentada.

El rociado de LQO dio como resultado el crecimiento aumentado de las plantas de soja. Hubo aumentos en las siguientes variables de crecimiento: número de ramas, número de hojas y área foliar. Sin embargo, la altura de la

planta no se vio afectada por el tratamiento con LQO. También aumentan las variables de rendimiento del número de grupos de vainas por planta, número de vainas y número total de semillas por planta. Esta última dio como resultado un aumento del rendimiento de las semillas que variaba de 33.7 a 44.8 % (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del oligosacárido de lipoquitina (Nod Bj V (C18:1, MeFeu)) en el área foliar y el peso seco de descarga de la soja en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Área de las hojas (cm ²)	peso seco de descarga (mg)
Control	188,0 ab [Ⓜ]	951,6 b
10 ⁻⁶	223,6 a	1065,8 ab
10 ⁻⁷	193,6 ab	1135,2 a
10 ⁻⁸	217,6 ab	1095,7 ab
10 ⁻⁹	194,3 ab	999,9 ab
10 ⁻¹⁰	195,3 b	1012,3 ab
10 ⁻¹¹	202,6 ab	931,6 b
10 ⁻¹²	230,3 a	1060,8 ab
MDS (p<0,05)	36,2	168,3

[Ⓜ] la medias dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente distintas (p < 0,05) mediante ensayo ANOVA de MDS protegido

Tabla 3. Efecto del oligosacárido de lipoquitina (Nod Bj V (C18:1, MeFeu)) en el crecimiento y rendimiento de la soja en condiciones de campo

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Nº de ramas/Planta	Nº de hojas/Planta	Área foliar /Planta (cm ²)	Nº de nódulos/Planta	Peso seco radicular /planta (g)	Peso seco dedescarga/planta (g)	Nº de grupos de vainas/planta	Nº de vainas/planta	Nº de semillas/planta	Rendimiento de las semillas/Planta (g)
Control	85,2	4,4	22,1	1388,1	60,1	2,0	19,0	18,6	33,5	80,9	15,7
LQO 10 ⁻⁶ M	78,5	4,2	29,4	2306,3	63,5	3,0	24,7	24,3	42,9	104,7	22,1
LQO 10 ⁻⁸ M	85,8	5,1	25,4	2120,4	84,6	2,3	23,7	24,8	42,4	106,3	21
LQO 10 ⁻¹⁰ M	83,5	3,4	22,2	1513,1	68,3	2,3	19,8	28,3	48,0	118,1	22,6
Diferencia de (p<0,05): LQO frente al control	NS	*	*	**	NS	*	*	*	*	*	*

Los resultados presentados demuestran que la aplicación foliar del LQO Nod Bj (C1:18 MeFeu) causa la fotosíntesis potenciada tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras. Para las plantas C₃ el aumento de la fotosíntesis estaba siempre acompañado por aumentos en la conductancia estomática, aunque no hay cambios en los valores

de la Ci, mientras que para maíz (una planta C₄) la apertura estomática no aumentó y los valores de la Ci disminuyeron en condiciones de invernadero. En ambos casos, los datos indican que los aumentos de la fotosíntesis debidos al tratamiento con LQO se deben a la captación más eficaz de CO₂ en el interior de la hoja. Para las plantas C₃ esto condujo a una apertura estomática aumentada. Debido a que los estomas de las plantas C₃ estaban más abiertos hubo aumentos concomitantes en la transpiración para las hojas de las plantas tratadas con LQO. Estos resultados fueron similares a los observados para la aplicación de glicina-betanina (Rajasekaran *et al.*, 1997; Makela *et al.*, 1999). La aplicación foliar de glicina-betanina potenció la fotosíntesis neta y la eficacia del uso de agua y mitigó el estrés por sequía y salinidad. La conductancia estomática aumentada se ha correlacionado positivamente con el rendimiento en una serie de cultivos y se ha sugerido que la selección de la conductividad estomática aumentada dará como resultado rendimientos potenciados (Lu *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1999). Podría parecer que se aplica la relación entre la apertura estomática y la tasa fotosintética en el caso de las plantas C₃ que se ensayan en el presente documento, aunque, está claro que, en el caso de la aplicación del LQO, los estomas más abiertos fueron el resultado de una mayor captación fotosintética de CO₂ por los cloroplastos, y no la causa principal de las tasas fotosintéticas aumentadas.

La fijación de di-nitrógeno es un proceso intensamente energético. Aproximadamente del 10-20 % de los fotosintetizados de una leguminosa fijadora de nitrógeno se consumen en la fijación de N₂. Si esto no se compensara con un aumento de la fotosíntesis neta conduciría a la reducción en el rendimiento del cultivo en comparación con las plantas que reciben un fertilizante de nitrógeno, y dicha compensación fotosintética ha sido demostrada (Imsade, 1983). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que las plantas compensan la demanda aumentada durante esta, y otras, interacciones planta-microbio. Este trabajo sugiere que esto podría controlarse por las moléculas señal de LQO desde las bacterias a la planta. Varias líneas de investigación sugieren que las plantas de soja noduladas tienen tasas fotosintéticas netas más altas que las que adquieren su nitrógeno de formas minerales disponibles en el medio de enraizamiento (Imsade, 1989a,b). Esto podría provocarse ya sea por un aumento de la fotosíntesis debido a la eficacia mejorada de las reacciones oscuras o por la eficacia mejorada de los fotosistemas tal como lo notificaron Maury *et al.* (1993), o ambas.

Recientemente, Phillips *et al.* (1999) aislaron el lumicromo, un producto de la degradación de la riboflavina, de la rizosfera de las plantas de alfalfa durante la nodulación temprana y mostraron que causa una respiración y fijación de carbono fotosintética aumentada. En un experimento más temprano se observó la germinación potenciada y el crecimiento temprano de diversas plantas de cultivo debido al tratamiento con LQO (resultados no publicados) y esto condujo a la hipótesis de que el LQO mejora el crecimiento temprano a través de la fotosíntesis aumentada. Los resultados del presente experimento sostienen la hipótesis anterior. La identificación de receptores de alta afinidad específicos para los LQO sigue siendo difícil de alcanzar. Sin embargo, se han caracterizado recientemente dos clases de receptores para LQO (Stacey *et al.*, 2000; Bono *et al.*, 1995; Gressent *et al.*, 1999). Esto condujo a la hipótesis de que uno de estos receptores se asocia con el proceso de nodulación y el otro con un proceso más generalizado que desencadena la maquinaria de crecimiento de las plantas cuando se exponen a quitina y compuestos relacionados, tales como los LQO. La observación de que ocurrió esta estimulación en dicha amplia variedad de angiospermas (el trabajo aquí notificado muestra los efectos en cinco familias de plantas, todas angiospermas: Poaceae, Fabaceae, Brassicaceae, Rosaceae, Vitaceae) sugiere que este mecanismo de respuesta a LQO es al menos tan antiguo como las angiospermas. Existen varios informes de la presencia de genes respondedores a los factores nod en no leguminosas tales como el arroz (Kouchi *et al.* 1999; Reddy *et al.* 1998). Estos pueden desempeñar un papel en la detección de, y respuesta a, patógenos de plantas, muchos de los cuales contienen quitina en sus paredes celulares. Presumiblemente, el crecimiento más vigoroso es una respuesta a la presencia de un patógeno detectado. Existen varios informes de fotosíntesis aumentada debida a patógenos fúngicos (Ayers, 1979; 1981) esto puede deberse a las respuestas de estrés de la planta y podría estar mediado por fragmentos de la pared celular que son oligómeros de quitina.

El fenómeno de la fotosíntesis potenciada y el rendimiento debido a la aplicación de LQO, tal como se observa en este estudio, podría explicar, al menos en parte, la productividad aumentada de los sistemas de cultivo intercalado de leguminosas y no leguminosas y rotaciones de cultivo. Hungría y Stacey (1997) notificaron el crecimiento y rendimiento potenciado de maíz y judía cultivados de modo intercalado en comparación con los monocultivos y postularon que este aumento podría deberse a la estimulación recíproca de *A. lipoferum* y *R. tropici* en el suelo por los exudados radiculares de maíz y judía. Hasta donde se sabe, este es el primer informe de la potenciación por LQO de la fotosíntesis en leguminosas y no leguminosas. Los LQO, además de mediar los eventos más tempranos de la nodulación, también actúan como señales para la fotosíntesis potenciada en una serie de plantas y esto abre la posibilidad de aprovechar estas moléculas señal para mejorar la producción de los cultivos, y finalmente, para la producción de mundial de alimentos.

60 Ejemplo 6

El efecto de los LQO en la tasa fotosintética de la soja y el maíz crecidos en condiciones de campo (año 2000)

Se cultivaron *Rhizobium Leguminosarum* (127K105) y *Sinorhizobium meliloti* (RCR 2011) en medio mínimo de Bergerson modificado (Spaink *et al.*, 1992) durante cuatro días, cuando la DO₍₆₂₀₎ del cultivo alcanzó 0,37 para *S. meliloti* y 0,28 para *R. leguminosarum*, se añadió el isoflavonoide nariginina a *R. leguminosarum* a una concentración

final de 5 µM y se añadió luteolina a 5 µM a *S. meliloti*. Los cultivos se incubaron adicionalmente durante cinco días y se extrajeron usando el método tal como se describe para *Bradyrhizobium japonicum*. Se eluyeron los LQO de *R. leguminosarum* a los 27-31 min de una ejecución de HPLC mientras que los de *S. meliloti* se eluyeron a los 35-38 min.

5 Los LQO de *R. leguminosarum* potenciaron la fotosíntesis de la soja y fueron más eficaces en comparación con los LQO de *S. meliloti*. Los LQO de *S. meliloti* potenciaron las fotosíntesis del maíz (Tablas 4 & 5).

10

Tabla 4. Efecto de los LQO de *Rhizobium leguminosarum* (127K105) y *Sinorhizobium meliloti* (RCR 2011) en las tasas fotosintéticas de la soja (cv Bayfield) dos días después del tratamiento

Tratamiento	Fotosíntesis (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Conductancia (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Ci (mmol CO ₂ mol ⁻¹)	Transpiración (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
LQO de <i>Rhizobium Leguminosarum</i> (127K105) 10 ⁻⁶ M	14,5a	0,26a	277,0a	3,42ab
LQO de <i>Rhizobium Leguminosarum</i> (127K105) 10 ⁻⁸ M	16,0a	0,29a	272,6a	4,2a
LQO de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (RCR 2011) 10 ⁻⁶ M	12,36b	0,15bc	241,0b	2,89b
LQO de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (RCR 2011) 10 ⁻⁸ M	14,5a	0,26ab	272,3 a	2,89b
Control	12,03b	0,13c	224,3b	2,72
MDS (p<0,05)	2,12	0,10	28,9	0,96

Los números de las columnas que están seguidos por las mismas letras no son significativamente distintos (p <0,05) mediante el ensayo ANOVA con MDS protegido.

Tabla 5. Efecto de los LQO de *Rhizobium leguminosarum* (127K105) y *Sinorhizobium meliloti* (RCR 2011) en las tasas fotosintéticas del maíz (cv Pioneer 3921) dos días después del tratamiento

Tratamiento	Fotosíntesis (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Conductancia (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Ci (mmol CO ₂ mol ⁻¹)	Transpiración (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
LQO de <i>Rhizobium Leguminosarum</i> (127K105) 10 ⁻⁶ M	25,9ab	0,13b	63,8a	3,3bc
LQO de <i>Rhizobium Leguminosarum</i> (127K105) 10 ⁻⁸ M	30,5ab	0,17ab	78,3ab	4,1ab
LQO de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (RCR 2011) 10 ⁻⁶ M	26,9b	0,14b	57,4ab	3,4bc
LQO de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (RCR 2011) 10 ⁻⁸ M	35,1a	0,21a	88,5ab	4,9a
Control	23,1b	0,11	42,6b	2,7
MSD (p<0,05)	7,9	0,07	42,9	1,3

Los números de las columnas que están seguidos por las mismas letras no son significativamente distintos (p <0,05) mediante el ensayo ANOVA con MDS protegido.

15 La tabla 6 muestra el efecto del rociado foliar de LQO de la soja durante el año 2000. El LQO potenció todos los componentes de rendimiento, el LQO a 10⁻⁶ M y 10⁻¹⁰ M mostró los efectos máximos. El LQO a 10⁻⁶ M mejoró el rendimiento en aproximadamente el 60 %. El aumento del rendimiento se debió al aumento del número de vainas/ planta. El peso de 100 semillas no aumento por el rociado de LQO durante la temporada de campo del 2000.

20

Tabla 6. Efecto de los LQO en el rendimiento de la soja (temporada de cultivo del 2000)

Tratamiento	Vainas/planta	Peso de las vainas/planta (g)	Semillas/planta	peso de 100 semillas (g)	Rendimiento de las semillas/planta (g)	Rendimiento de las semillas (t/ha)
LQO 10 ⁻⁶ M	46,8 a	31,4 a	118,0 a	17,4 a	21,0 a	10,5 a
LQO 10 ⁻⁸ M	39,1 b	24,1 b	96,4 b	17,8 a	16,2 b	8,1 b
LQO10 ⁻¹⁰ M	47,7 a	29,1 ab	117,7 a	18,1a	21,8 a	10,9 a
Control	28,3 c	18,7 c	70,4 c	17,7 a	13,2 b	6,6 b
MSD	7,6	5,2	18,4	2,7	3,8	1,9

Los números de las columnas que están seguidos por las mismas letras no son significativamente distintos (p <0,05) mediante el ensayo ANOVA con MDS protegido.
 Los rendimientos son a una humedad de la semilla del 0 %.
 Los rendimientos se calcularon tomando muestras de 10 plantas seleccionadas al azar por parcela, determinando el rendimiento por planta y asumiendo una base media de 500.000 plantas por ha.

Tomados en conjunto, los resultados de las Tablas 4 y 5 muestran que los efectos promotores de la tasa fotosintética observados con el LQO NodBj-V (C_{18:1}, MeFeu) de *B. japonicum* durante los experimentos de 1999 también son observables con los LQO obtenidos de otros rizobios. Por lo tanto, también se espera que la adición de la cepa rizobiana promiscua NGR234, conocida por promover la nodulación de una amplia gama de leguminosas u otras, potencie la tasa fotosintética de las plantas de modo similar a los datos que se presentan en el presente documento.

Los datos efecto del rociado foliar de LQO en el rendimiento de la soja durante el año 2000 también muestran un efecto de aumento del rendimiento, similar al mostrado en el año 1999. Más específicamente, en el 2000, la aplicación de LQO potenció las vainas/planta y el rendimiento de las semillas. Los datos sugieren que (1) el LQO a 10⁻⁶M mostró el máximo efecto; (2) el LQO a 10⁻⁶M mejoró el rendimiento en más del 100 %; y (3) el aumento del rendimiento se debió al aumento en el número de vainas/planta.

Es notable que las temporadas de cultivo del 1999 y del 2000 fueron muy distintas. En comparación con una temporada de cultivo promedio, el 1999 fue un año seco y cálido, mientras que el 2000 fue un año húmedo y frío.

Tomados en conjunto con los resultados de los efectos de la aplicación de LQO en la tasa fotosintética y en el rendimiento del 1999, los del 2000 muestran que el efecto del LQO sobre los mismos es robusto a lo largo de una amplia gama de condiciones ambientales.

También es notable, que la aplicación de LQO en los experimentos de campo en el año 2000 se hicieron rociando parcelas completas, en oposición a las plantas individuales (1999). Por lo tanto, los efectos del LQO descritos en la presente invención también fueron observables cuando se usaban métodos de aplicación de producción a gran escala.

CONCLUSIÓN

La presente invención demuestra que la composición de LQO puede potenciar significativamente la tasa fotosintética de las leguminosas y no leguminosas crecidas en condiciones de laboratorio (por ejemplo condiciones de invernadero). Además, estos resultados de las condiciones de invernadero se validan en el campo usando soja, vid, maíz y manzano. Adicionalmente se muestra que el efecto del LQO es observable con distintos LQO, validando de este modo la actividad potenciadora de la tasa fotosintética de los LQO en general. Además, la presente invención muestra que el efecto potenciador de la tasa fotosintética de los LQO en plantas es robusto entre las condiciones ambientales de campo. La presente invención proporciona, por lo tanto, composiciones agrícolas y métodos por los que puede usarse el LQO para potenciar la tasa fotosintética, el crecimiento y rendimiento de un cultivo en condiciones de campo controladas y diversificadas. Los aumentos similares en las tasas fotosintéticas y el rendimiento para el cultivo ensayado (por ejemplo, soja) implica que se esperan aumentos del rendimiento a partir de la aplicación de LQO en una amplia gama de cultivos.

REFERENCIAS

Ayres, PG. 1979, En. Marcelle, R.,Clijsters, H., van Poucke, M., Ed. Photosynthesis and Plant Development páginas. 343-354. W. Junk, The Hauge, Holanda.
 Ayres, PG. 1981, Journal of Phytopathology 100:312-318.
 Bono et al, 1995, Plant Journal 7:253-260.

- Boone *et al.*, 1999, Carbohydrate Research 317:155-163.
 Denarie *et al.*, 1993, Cell 74:951-954.
 Evans LT., 1975, En L.T. Evans (ed) Crop Physiology. Cambridge Univesity Press, Cambridge, páginas 327-355.
 Evans LT., 1980, American Scientist 68:388-397.
 5 Fay *et al.*, 1996, New Phytologist 132:425-433.
 Fehr *et al.*, 1971, Crop Science 2:929-930.
 Fisher *et al.*, 1992, Nature 357:655-660.
 Gressent *et al.*, 1999, Proceedings of National Academy of Sciences, EE.UU., 96: 4704, -4709.
 Horvath *et al.*, 1993, Plant Journal 4:727-733.
 10 Hungria *et al.*, 1997, Soil Biology and Biochemistry 29:819-830.
 Imsande, J., 1988, Journal of Phytopathology 39:1313-1321.
 Imsande, J., 1989, Agronomy Journal 81:549-556.
 Inui *et al.*, 1997, Bioscience Biotechnology Biochemistry 61:975-978.
 Kondorosi A., 1991, En: Advances in Molecular Genetics of Plant -Microbe interactions. H. Hennecke y D.P.S.
 15 Verma, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
 Long SR., 1989, Cell 56:203-214.
 Lu *et al.*, 1998, Journal of Phytopathology 49:453-460.
 Makela *et al.*, 1999, Physiologia Plantarum 105:45-50.
 Maury *et al.*, 1993, Plant Physiology 101:493-497.
 20 Minami *et al.*, 1996, Molecular Plant-Microbe Interact 9:574-583.
 Morison, J., 1998, Journal of Phytopathology 49:443-452.
 Morrison *et al.*, 1999, Agronomy Journal 91:685-689.
 Moss *et al.*, 1971, Advances in Agronomy 23:317-336.
 Neave *et al.*, 1989, Canadian Journal of Forest Research 19:12-17. Nonomura *et al.*, 1992, Proceedings of the
 25 National Academy of Science EE.UU. 89:9794- 9798.
 Osborne, BA., 1989, Plant, Cell and Environment 12:941-946.
 Pichon *et al.*, 1993, En: R. Palacios, J. Mora WE Newton eds. New Horizons in Nitrogen fixation. Kluwer
 Academic Publishers, Dordrecht, Holanda páginas 285-290.
 Raschke, K., 1979, En: Haupt, W., Feinleib M.E. eds. Physiology of movements. Vol. 7 Encyclopedia of Plant
 30 Physiology. Springer Verlag, Berlín 383-441.
 SAS Institute Inc. 1989. Guía del usuario SAS, Versión 9.0.6, Cary, EEUU página 1673.
 Sasaki *et al.*, 1995, Journal of Fermentation and Bioengineering 79:453-457.
 Schmidt *et al.*, 1988, Proceedings of National Academy of Sciences, EE.UU., 85: 8587, -8582.
 Schulman *et al.*, 1997, Development 124:4887-4895.
 35 Schultze *et al.*, 1994, Proceedings of National Academy of Sciences, EE.UU., 92: 2706, -2709.
 Shabayev *et al.*, 1996, Biology and Fertility of Soils 23:425-430.
 Spaink *et al.*, 1991, Nature 354:125-130.
 Spaink *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interact 5:72-80.
 Stacey *et al.*, 2000, En: Biology of Plant -Microbe Interactions, Vol 2 páginas 120-125. Ed. P.J.G.M.de Wit, Ton
 40 Bisseling y W.J. Stietema.
 Staehelin *et al.*, 1994, Proceedings of National Academy of Sciences, EE.UU., 91: 2196, -2200.
 Talbott *et al.*, 1996, Plant, Cell and Environment 19:1188-1194.
 Thomas *et al.*, 1983, Crop Science 23:453-456.
 Truchet *et al.*, 1991, Nature 351:670-673.
 45 Vance *et al.*, 1991, Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:373-392.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para potenciar la tasa fotosintética de una planta de cultivo, consistiendo dicho método en la aplicación foliar directa a dicha planta de cultivo de una composición que comprende una cantidad potenciadora de la fotosíntesis de al menos un lipo-quitooligosacárido (LQO) y un vehículo agrícolamente aceptable.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha aplicación foliar directa se realiza por rociado.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho LQO se produce por un rizobio que es capaz de entrar en una relación de fijación de nitrógeno con una leguminosa.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha planta de cultivo no es una leguminosa.
- 15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha planta de cultivo es una leguminosa.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho LQO se obtiene de un rizobio seleccionado del grupo que consiste en *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum*.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho LQO está presente en dicha composición a una concentración de entre aproximadamente 10^{-5} M hasta aproximadamente 10^{-14} M.
- 25 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho LQO está presente en dicha composición a una concentración de entre aproximadamente 10^{-6} M hasta aproximadamente 10^{-12} M.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho LQO está presente en dicha composición a una concentración de entre aproximadamente 10^{-7} M hasta aproximadamente 10^{-10} M.

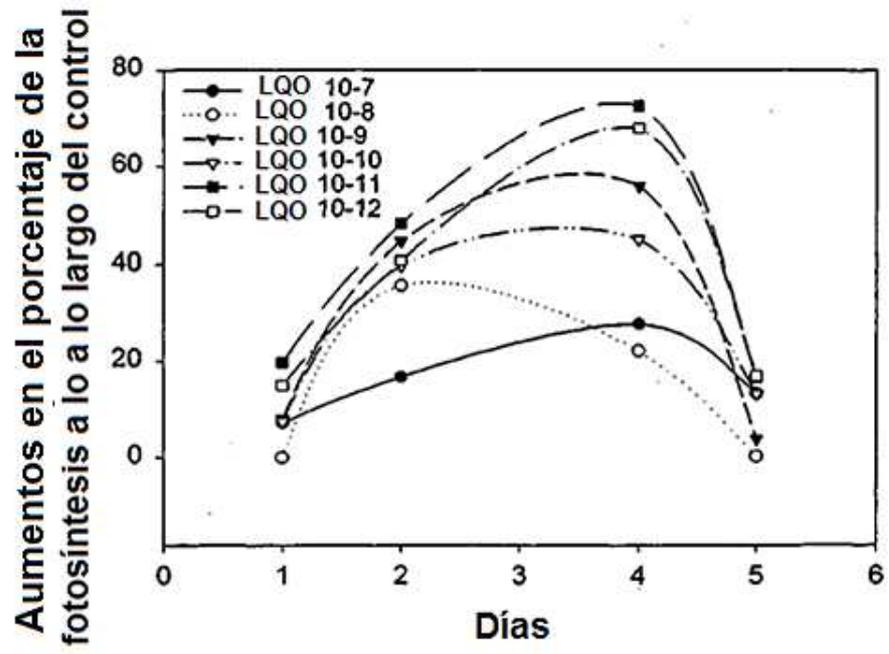


Fig. 1

