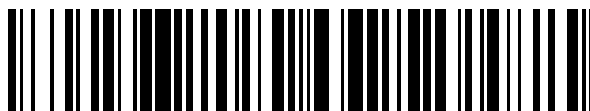


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 924**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2005 E 05714657 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1755392**

54 Título: **Compuestos isoflavonoides y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**18.03.2004 CA 2461261**  
**17.06.2004 CA 2470669**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2015**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOAG A/S (100.0%)**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**MCIVER, JOHN;**  
**CHEN, CHUNQUAN;**  
**SCHULTZ, BIRGIT y**  
**MCIVER, HANNAH**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

**ES 2 547 924 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**

Compuestos isoflavonoides y uso de los mismos.

La invención

5 La presente invención versa sobre el uso de uno o más compuestos isoflavonoides o de una composición agrícola de los mismos para el tratamiento de semillas antes de plantar dichas semillas para aumentar la producción y/o mejorar la germinación de las semillas, y/o aumentar la densidad de la plantación, y/o para que resulte en un brote más precoz y/o para mejorar el vigor de las plantas, y/o mejorar el crecimiento de las plantas, y/o aumentar la biomasa, y/o para que resulte en una fructificación más precoz en una planta no leguminosa o en un cultivo de las mismas.

10 Prácticas agrícolas antecedentes

15 La agricultura en el mundo en vías de desarrollo utiliza frecuentemente una práctica de cultivo intercalar de especies vegetales para maximizar la productividad del terreno. Esa práctica implica frecuentemente un cultivo de legumbres dejando espacio, hilera por hilera, para otra especie vegetal de valor regional. Hace tiempo que es sabido que el cultivo de no leguminosas generalmente se beneficia en producción de haber estado en contacto íntimo con las legumbres al nivel de las raíces. Tradicionalmente, se ha creído que esto era debido al conocido beneficio de las legumbres de devolver al suelo el nitrógeno fijo utilizable por las plantas a través del nitrógeno residual de su propia simbiosis fijadora de nitrógeno con las bacterias rizobianas. Se creía que este nitrógeno era utilizado por el cultivo intercalar, creciendo mejor.

20 En el mundo desarrollado, el cultivo intercalar de legumbres con otros cultivos agrícolas, aunque conocido y entendido, sencillamente, no es viable. Es una práctica que requiere un mantenimiento manual de los terrenos para la obtención de los mejores resultados, y, en la agricultura de volumen los equipos no se prestan a disparidad en altura y tamaño de las plantas experimentado; es decir, la soja (una legumbre) es físicamente muy diferente del maíz.

Prácticas de cultivo en Norteamérica

25 Las prácticas de cultivo intercalar procedentes del mundo en vías de desarrollo son trasladadas, en los países desarrollados, a prácticas agrícolas de rotación de cultivos, en las que se cultiva un solo cultivo en el terreno un año y se cultiva otro cultivo al año siguiente. Estos cultivos son rotados para mantener el terreno de forma óptima y reducir su pérdida de nutrientes y puede implicar dos, tres o cuatro cultivos en rotación regular año tras año.

30 Uno de estos cultivos será una legumbre, dependiendo el tipo de la misma del terreno, los mercados, la región, etc., y podría implicar soja, guisantes, alubias, alfalfa, trébol, etc. —todas legumbres con su propia relación simbiótica con una especie bacteriana rizobiana particular—, y produciendo cada especie bacteriana una estructura LQO específica para la especie vegetal anfitriona particular.

35 Hace tiempo que se sostiene que la rotación de cultivos debe incluir una legumbre, por la capacidad de estas de dejar un residuo de nitrógeno disponible para el siguiente cultivo, reconociéndose generalmente que ese residuo es de un kilo de nitrógeno por cada 56 kilos de semilla de legumbre cosechada; es decir, para la soja, 45-56 kg de N por hectárea disponibles para el siguiente cultivo, generalmente no leguminoso.

En Norteamérica, las rotaciones de cultivos fundamentales son: (1) maíz-soja, y se usa en los Estados productores importantes de EE. UU. —Illinois, Ohio, Iowa, Nebraska—, y (2) trigo-guisantes, en Canadá occidental.

Desarrollo científico

40 Aunque no está plenamente explicada, ahora se comprende mucho mejor la simbiosis de las legumbres con los rizobios. Implica y requiere una serie de señales del vegetal y de los microbios para iniciar los cambios en el tejido vegetal, lo que protege y soporta a los rizobios internamente en la raíz, en la que pueden acometer la conversión del gas nitrógeno en nitrógeno utilizable por la planta utilizando energía de la planta. La bibliografía científica y de patentes, que resume el conocimiento actual, disponible para la persona experta incluye el número de publicación internacional WO 00/04778, publicado el 3 de febrero de 2000 y el WO 01/26465, publicado el 19 de abril de 2001, ambos de Smith y otros, y el documento canadiense con número de serie 2.439.421, incorporados todos a la presente memoria por referencia.

50 Ahora se sabe científicamente que la señal rizobiana enviada a la planta leguminosa para iniciar los cambios en el tejido de la raíz es un lipo-quitoooligosacárido (LQO) al que se denomina factor de nodulación en esta solicitud. Su producción surge de bacterias rizobianas adyacentes que reciben productos químicos isoflavonoides —también denominados señales— exudados por la raíz de la legumbre que activan los genes para la producción de estos LQO. Las señales son compuestos fenólicos, flavonas, isoflavonas y flavononas, segregados por las raíces de las legumbres, que actúan como quimioatrayentes hacia los rizobios y como activadores de los genes de nodulación.

Se aprecia además aquí, por los estudios y las patentes actuales, que los LQO tienen una función de crecimiento de las plantas no restringida a las legumbres. Se ha demostrado que las semillas no leguminosas, así como las semillas leguminosas, germinan antes en presencia de niveles mínimos ( $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  M) de LQO en disolución.

5 Se ha demostrado, además, que las aplicaciones foliares de LQO en muchas plantas (maíz, soja, guisantes, tomates) lleva a que florezcan antes y a mayor producción. El mecanismo de estos fenómenos sigue siendo objeto de estudio.

10 La relación y la interacción de los factores de nodulación, las señales, con los LQO producidos por rizobios han sido objeto de considerable investigación. Por ejemplo, un objeto principal de la invención de la patente estadounidense número 5.141.745, "Nodulation Inducing Factors", es identificar una clase de moléculas estructuralmente relacionadas —las flavonas sustituidas— que estimulan la expresión de los genes de la nodulación y provocan un inicio más rápido de la nodulación en las legumbres. El estudio describe el aislamiento y la identificación de las flavonas sustituidas, que son factores inductores de los genes de la nodulación. La invención versa en general sobre el tema de la simbiosis legumbre-rizobio y, en particular, sobre la identificación de compuestos flavonoides que estimulan la expresión de los genes de nodulación de los rizobios y provocan velocidades mayores de nodulación de las legumbres por los rizobios. Estos compuestos son útiles en general para el control selectivo de la expresión de genes y, en particular, en composiciones inoculantes mejoradas para legumbres.

15 La patente estadounidense número 5.229.113, "Bradyrhizobium Japonicum Nodulation inducing Factor", describe la identificación de compuestos químicos que inducen la expresión de los genes de nodulación del *Bradyrhizobium japonicum*.

20 Es un objeto principal de esa invención identificar las moléculas que estimulan la expresión de los genes de nodulación en cepas de *B. japonicum*.

25 La patente canadiense número 2.179.879, "Composition for Enhancing Grain Yield and Protein Yield of Legumes Grown Under Environmental Conditions that Inhibit or Delay Nodulation", versa específicamente sobre el uso de los factores de nodulación genisteína o daidzeína más una cepa de *B. japonicum* en legumbres, específicamente soja, cultivadas en condiciones medioambientales que inhiben o retardan la nodulación, específicamente en la zona baja de la raíz, con temperaturas entre 17°C y 25°C. No enseña el uso del factor de nodulación solo ni en ningún otro medio. No enseña el uso del factor de nodulación solo ni con ningún vehículo en legumbres cultivadas en condiciones normales. No contempla el uso del factor de nodulación solo ni con un vehículo para su uso en cultivos de no leguminosas.

30 Aunque la relación de las señales con los LQO y sus efectos en las plantas han sido descritos en ciertas condiciones, requieren evaluación el efecto de las señales y sus composiciones solas en el crecimiento de no leguminosas y de leguminosas.

35 Los objetos de la presente invención incluyen la aplicación y el uso de uno o más compuestos isoflavonoides y composiciones de los mismos en una semilla no leguminosa que dé como resultado mayor producción y/o mejor germinación de las semillas, y/o un brote más precoz, y/o mayor densidad de la plantación, y/o mayor biomasa, y/o mayor vigor de las plantas, y/o mejor crecimiento de las plantas, y/o fructificación más precoz, incluyendo, sin limitación:

que la no leguminosa incluya, sin limitación, una semilla, un tubérculo, un trasplante o un corte vegetativo;

40 que la no leguminosa se cultive para su uso en agricultura, horticultura, silvicultura o jardinería;

que la no leguminosa se siembre en tierra que ha sido sembrada previamente con un cultivo leguminoso, o que tenga una población indígena de rizobios;

45 que la no leguminosa se siembre en tierra que no ha sido sembrada previamente con un cultivo leguminoso;

que se aplique un isoflavonoide al cultivo de no leguminosas hasta 365 días o más antes de la plantación;

50 que se aplique un isoflavonoide con un vehículo agrícolamente aceptable, tal como, sin limitación, agua, soluciones líquidas azucaradas, tratamientos de semillas, inoculantes, aditivos, conservantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, fertilizantes, promotores del crecimiento o sustratos hortícolas;

que la tierra que haya de plantarse del cultivo de no leguminosas haya sido pretratada con rizobios simbióticos específicos o tenga una población indígena de rizobios;

55 que la semilla haya sido tratada con uno o más rizobios simbióticos específicos.

Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, los isoflavonoides y las composiciones de los mismos son útiles según se ha dicho anteriormente, en familias de plantas no leguminosas, y en procedimientos relativos a las

mejoras y los aumentos, todos según se ha dicho anteriormente, incluyendo en condiciones que limitan el crecimiento, así como en condiciones óptimas para el crecimiento. Las composiciones y los procedimientos de la presente invención encuentran utilidad en condiciones limitantes del crecimiento, incluyendo condiciones asociadas con el estrés de pH, el estrés hídrico y las temperaturas por debajo o por encima de un intervalo óptimo, para el crecimiento, la germinación, el brote y similares de plantas o cultivos.

Según la presente invención, una "composición agrícola" y una "cantidad agrícolamente efectiva de una composición" se refieren a una cantidad suficiente de una o más señales que resulte en una potenciación, una mejora o un aumento estadísticamente significativos en relación con un control, según se ha dicho anteriormente, sin detrimento para la planta, el suelo o el cultivo. Por "brote" se quiere decir un crecimiento observable por encima de la superficie del medio radicular. Por "germinación" se quiere decir el desarrollo observable del crecimiento de la raíz a partir del embrión, y por "desarrollo en el terreno" se quiere decir el desarrollo bajo condiciones en el terreno, en contraposición con el desarrollo bajo condiciones más controladas, tal como en un invernadero.

Estimulante del crecimiento en plantas de semillero

Aplicación a semillas de señales de isoflavonoides de soja

En el cultivo intercalar, la respuesta del cultivo de no leguminosas puede explicarse como debida, de hecho, a los LQO producidos por las plantas de legumbre (alubias) que migran a las raíces de la no leguminosa e inician una respuesta de crecimiento en ese cultivo. Esta es una suposición razonable con el conocimiento actual.

En vista del conocimiento de la agricultura de la soja y las rotaciones de los cultivos de soja con maíz y de guisantes en rotación con trigo, de señales de isoflavonoides en legumbres que inducen una mayor nodulación mediante una mayor producción de LQO por parte de las células rizobianas, de la fabricación y la aplicación de inoculantes rizobianos de semillas de soja y guisante y la persistencia de los rizobios en el suelo, los presentes inventores han considerado la aplicación de señales de isoflavonoides de la soja y otras plantas en cantidades agrícolamente efectivas y útiles a semillas de maíz y a otras especies leguminosas y no leguminosas, incluyendo variedades de cultivo y hortícolas, incluyendo para el trasplante, para causar la inducción de la producción de LQO por parte de la población rizobiana indígena en el suelo, y que este LQO podría conducir a mayor crecimiento en la fase de planta de semillero cuando se están afianzando las plantas jóvenes y a otros efectos deseables, todo según se ha dicho anteriormente.

Este concepto se amplió después para que abarcara los cultivos hortícolas en los que el sustrato para siembra y macetas podía ser sembrado con un nivel de *Bradyrhizobium* (para la soja) o de otras especies rizobianas, con la condición de que fueran capaces de inducción mediante sus señales de isoflavonoides apropiadas para producir niveles significativos de LQO en las raíces de las plantas de semillero en las que pudieran actuar como estimulante del crecimiento para plantas no leguminosas para trasplantar y cultivos hortícolas.

Esto fue sometido a ensayo.

(1) Estimulación del crecimiento del maíz

Se sembró (inoculó) tierra para macetas con suficiente *Bradyrhizobium japonicum* procedente de un inoculante comercial de soja para lograr 100.000 células activas por gramo de suelo, un nivel a medio camino de la tierra conocida de rotación de maíz y alubias, en la que la población del suelo estará entre 10.000 y 1.000.000 de células bacterianas activas por gramo de suelo.

Se plantaron semillas de maíz recubiertas con diversas concentraciones del inductor isoflavonoide, la genisteína, en este suelo en macetas en el invernadero, de tal modo que pudiera determinarse la germinación, así como las diferencias de altura con respecto al control no tratado en el primer mes de cultivo. Las concentraciones sometidas a ensayo fueron 0, 50, 100, 200, 300 y 400 uM de una solución de genisteína aplicada a razón de 0,3 ml (300 ul) por cada 100 semillas de maíz, tasa de aplicación normal en agricultura.

Se almacenaron lotes adicionales de tales semillas tratadas en una habitación seca y fresca, a 22°C, durante un periodo de hasta 6 meses, retirando mensualmente muestras representativas para volver a realizar ensayos de germinación y crecimiento, determinando así la capacidad del concepto para el tratamiento previo de las semillas desde el instante de cosecha de la cosecha anterior. Estos estudios prosiguen y su metodología está mejorando a medida que avanzan.

(2) Estimulación del crecimiento de las plantas para trasplantar

Se sembró tierra para macetas con *Bradyrhizobium japonicum* a razón de 500.000 y 5.000.000 de células activas por ml de mezcla. Se sembraron semillas de 8 variedades diferentes de plantas para trasplantar en el sustrato sembrado y se aplicó inductor isoflavonoide de genisteína a los rizobios de varias maneras, desde el recubrimiento de las semillas hasta el riego con el inductor de señales.

Después, las semillas fueron evaluadas en cuanto a su germinación, ya fuera como mayor cantidad o mayor tasa. Las plantas de semillero jóvenes fueron evaluadas después en cuanto a su crecimiento, medido por su altura, durante varias semanas mientras se encontraban en las bandejas de semillero.

Crecimiento trasplantado

- 5 Plantas de semillero de tomateras de la variedad cherry (de 5 semanas) fueron trasplantadas a macetas de 13 cm sembradas con rizobios a razón de 1e6 células/ml (2 y 20 uM de SeedCoater) o sin rizobios (tratamientos de control y con LQO). Se prepararon soluciones de SeedCoater y LQO con agua y se aplicaron 50 ml/planta a cada planta después del trasplante. Se recogieron frutos maduros (anaranjados o rojos) 8 semanas después del trasplante.

- 10 Sumario: (1) El suelo con SeedCoater aplicado a los tomatitos cherry trasplantados puede mejorar el número de frutos tempranos. (2) Las señales de SeedCoater son más efectivas que la señal de LQO cuando se aplican al suelo alrededor de las raíces trasplantadas.

Lista de datos:

Número de tabla/figura	Cosecha/parámetro	Ubicación	Momento de la plantación
Fig. 1	Maíz/germinación	Invernadero	Inmediatamente
Fig. 2	Maíz/altura	Invernadero	Inmediatamente
Fig. 3	Maíz/altura	Invernadero	Un mes después
Fig. 4	Promoción del crecimiento de los tubérculos de patata con señales	Terreno	
Fig. 5	Promoción del crecimiento de los tubérculos de patata con señales	Invernadero	
Tabla 1	Maíz/peso seco	Invernadero	Inmediatamente
Tabla 2	Maíz/peso seco	Invernadero	Un mes después
Tabla 3	Maíz/producción	Terreno	Inmediatamente
Tabla 4	Trigo/germinación	Terreno	Inmediatamente
Tabla 5	Maíz/germinación	Terrenos en 5 emplazamientos	Inmediatamente
Tabla 6	Estudios de temporización de SeedCoater en el maíz cultivado en invernadero. El tratamiento con SeedCoater incrementó la biomasa vegetal y la nodulación de la soja 4-5 semanas después de la plantación. La eficacia se mantuvo hasta 60 días después de los tratamientos.		
Tabla 7	Tratamiento de SeedCoater sobre trigo cultivado en un terreno de alubias. El SeedCoater de 400 uM como concentración universal aumentó las producciones de trigo en los ensayos sobre el terreno.		
Tabla 8	Comparación de formulaciones de SeedCoater en la producción de cereal y ensilado en el maíz. Una formulación (400 uM) de SeedCoater con dos isoflavonoides tuvo mejor rendimiento sobre la producción de maíz que un solo flavonoide en la formulación con la misma concentración cuando el maíz se plantó 30 días después del tratamiento.		
Tabla 9	Diferentes intensidades de inoculación de SeedCoater en la tierra de cultivo de maíz en la Universidad de Guelph. El tratamiento con SeedCoater dio como resultado la mejor producción de maíz con una concentración de rizobios en la tierra de 10 <sup>3</sup> células/g de tierra. El SeedCoater, a 400 uM, aumentó significativamente la producción de cereal con respecto al control.		
Tabla 10	Efecto del SeedCoater en la producción de maíz cuando se aplica un año antes de la plantación. La semilla tratada con SeedCoater no redujo el porcentaje de brotes después de 1 año en el almacenamiento de semillas a temperatura ambiente y aumento la producción de maíz en hasta un 19% con respecto al control de tratamiento de semillas.		

Número de tabla/figura	Cosecha/parámetro	Ubicación	Momento de la plantación
Tabla 11	Ensayos de campo en el maíz en múltiples emplazamientos. El SeedCoater con Cruiser aumentó la producción de maíz de 126 a 2573 kg/ha en comparación con el tratamiento con Maxim XL en la media de múltiples emplazamientos.		
Tabla 12	Señal aplicada a las raíces de plántones de tomate trasplantados a tierra inoculada con rizobios de soja. La producción precoz fue más alta que el control en el número de frutos y en el peso de todos los tratamientos.		

La Figura 1 representa el SeedCoater efectivo en el brote de la semilla de maíz.

Las Figuras 2 y 3 representan el SeedCoater efectivo en la altura de la planta de maíz.

La Figura 4 representa la promoción del crecimiento de tubérculos de patata con señales cultivados en el terreno.

5 La Figura 5 representa la promoción del crecimiento de tubérculos de patata con señales cultivados en el invernadero.

Tabla 1. Efecto de la dosis de SeedCoater en el peso seco de las plantas de maíz en estudio de invernadero (plantadas inmediatamente después del tratamiento)

Tratamiento	Peso seco (gramos)/planta	% de aumento con respecto al control
0,0 uM	0,8367	
50 uM	0,9024	7,8%
100 uM	0,8987	7,4%
200 uM	0,9501	13,5%
300 uM	0,9672	15,6%
400 uM	0,9299	11,1%

Notas:

- 10 1. *Bradyrhizobium japonicum* inoculado a razón de  $10^5$  ufc/ml en el suelo.
2. Planta en el instante 0 (Tabla 3) o 1 mes después (Tabla 4).
3. 2 plantas/maceta y 8 macetas/tratamiento.
- 15 4. Temperatura del invernadero por encima de 30°C durante unos días en abril, lo que afectó al crecimiento de las plantas en el invernadero (Tabla 4), de modo que las plantas crecieron más en comparación con las plantas de la Tabla 3.
5. Las plantas fueron cosechadas por su biomasa 31 días (Tabla 3) y 32 días (Tabla 4) tras la siembra.

20 Conclusiones:

No se vio diferencia alguna en la altura de las plantas, pero la materia seca de la planta aumentó con todos los tratamientos (7-15,6% con respecto al control) a los 31 días tras la siembra.

Tabla 2. Efecto de la dosis de SeedCoater en el peso seco de la planta de maíz en estudio de invernadero (plantadas 1 mes después del tratamiento)

Tratamiento	Peso seco (gramos)/planta	% de aumento con respecto al control
0,0 uM	3,0056	
50 uM	3,2844	8,5%
100 uM	3,0650	1,8%
200 uM	3,6975	21,1%
300 uM	3,2456	7,3%
400 uM	3,3781	11,3%

25 Conclusión:

Todos los tratamientos con SeedCoater aumentaron tanto la altura como el peso seco de las plantas a los 32 días posteriores a la siembra, pero el peso seco aumentó hasta el 21% con la concentración aplicada de 200 uM.

Tabla 3. Efecto de la dosis de SeedCoater en la producción cerealística del maíz

Tratamientos	Cereal húmedo cosechado (kg/2 hileras)	Producción de cereal húmedo (kg/ha)	Producción de cereal (kg/2 hileras)	Producción de cereal (kg/ha)
250uM	8,05 b	5963,0 b	6,53 b	4840,1 b
400uM	9,63 a	7133,3 a	7,71 a	5713,6 a
600uM	8,17 b	6051,9 b	6,50 b	4817,0 b
Control sin tratar	7,63 b	5244,4 b	6,14 b	4546,4 b
Significativo al 5%	Sí	Sí	Sí	Sí

Notas:

1. Las semillas tratadas se almacenaron a temperatura ambiente (20°C) durante un mes antes de ser plantadas.
- 5 2. El suelo fue sembrado de inoculantes a razón de 10<sup>5</sup> células/gramo de suelo antes de la plantación.
3. El porte de las plantas de semillero fue examinado 1 mes después de la plantación, y los datos (no enumerados) mostraron que el SeedCoater no afectaba al brote de la semilla cuando se aplicaba 1 mes después del tratamiento.
- 10 4. Se cosechó maíz en grano de las dos hileras centrales de cada cuadro (13,5 m<sup>2</sup>) de la granja MAC (fecha de la cosecha: 30 de octubre de 2003; siembra: 23 de mayo de 2003).
5. La producción de cereal está corregida al peso seco secando aproximadamente 500 gramos/cuadro a 60°C durante días.
- 15 Conclusiones:
  1. Todos los tratamientos con SeedCoater aumentaron la producción de maíz en grano en un 6%-25,6% con respecto al control.
  2. 400 uM aumentaron significativamente la producción de cereal tanto húmedo como seco.

20 Tabla 4. Efecto de la dosis de SeedCoater en el brote (%) de semillas de trigo de primavera en ensayo de campo

Porcentaje de semillas tratadas brotadas a las 4 semanas					
Tratamientos	Réplicas				Media
	1	2	3	4	
Control	56	64	52	36	52b
100uM	68	72	60	64	66ab
200uM	60	72	80	64	69a
400uM	60	68	68	76	68a
600uM	80	60	80	48	67ab

Notas:

1. En cada cuadro del terreno se plantaron inmediatamente 100 semillas de trigo tratadas.
- 25 2. La semilla de trigo de primavera fue recubierta de productos químicos.
3. El brote fue examinado a las 4 semanas tras la siembra en el terreno.
4. El ensayo sobre el terreno terminó porque los cuadros fueron dañados por animales. De este ensayo no se dispone de ningún dato de producción.
- 30 Conclusión:
 

El SeedCoater mejoró significativamente el brote de la semilla de trigo con una concentración de 200-400 uM.

Tabla 5. Efecto del tratamiento con SeedCoater en el brote (%) de semillas de maíz tratadas con fungicida (Maxim XL) en 5 emplazamientos en EE. UU., 2003

(% de brotes en el terreno)						
Tratamientos	Indiana	Illinois	Iowa (1)	Iowa (2)	Nebraska	Media
MaximXL	86,88	86,07	76,79	58,21	84,29	78,448b
MaximXL + SeedCoater	85,63	85	79,29	77,5	91,07	83,698a

Notas:

1. Se aplicaron 250 uM de SeedCoater (líquido) directamente a semilla de maíz (híbrido) a razón de 3ml/kg de semilla antes de la siembra.
- 5 2. Las semillas tratadas con SeedCoater fueron sembradas en 5 emplazamientos inmediatamente después del tratamiento.
3. En este ensayo se usó semilla de maíz recubierta de un producto químico (fungicida).
- 10 4. Los ensayos en terrenos contratados fallaron y el contratista no presentó ningún dato de producción.

Conclusiones:

El SeedCoater mejoró significativamente el brote de la semilla de maíz.

Tabla 6. Promoción del desarrollo precoz mediante pretratamiento con SeedCoater en semillas de maíz en invernadero

Cosechas y tratamientos	Días previos al tratamiento antes de plantar							
	Día 0		Día 10		Día 30		Día 60	
Maíz	Altura (cm)	Biomasa (mg)	Altura (cm)	Biomasa (mg)	Altura (cm)	Biomasa (mg)	Altura (cm)	Biomasa (mg)
400 uM	N/D	7,25	108,5	10,28	127,3	12,98	139,2	12,64
Control	N/D	6,71	105,0	9,25	124,3	12,03	133,4	12,48

15 Notas:

En este estudio se usaron tratamientos químicos de semillas para el maíz (Maxim XL). Un kg de semillas fue tratado con 3 ml de solución de señal, de SeedCoater, en una bolsa de plástico, y las semillas tratadas fueron almacenadas a 17°C. Se plantaron cinco semillas en una maceta de 13 cm 0, 10, 30 y 60 días después del tratamiento, en invernadero, 10 macetas cada tratamiento. Se inoculó una mezcla de Sunshine Mix® y Turfase (1:1) como sustrato para el crecimiento de las plantas con inoculante de *B. japonicum* de soja, a razón de 10<sup>9</sup> células/g. El brote y el porte de las semillas se contaron 7 días después de la siembra, y de cada maceta se entresacaron las dos mejores plantas de semillero por maceta. Las plantas fueron cosechadas en aproximadamente 30 días y se realizaron mediciones de la altura y la biomasa de las plantas.

20 Conclusiones:

- 25 1. El SeedCoater aumentó la biomasa y la altura de las plantas de maíz hasta 60 días después del tratamiento.
2. El SeedCoater no mostró ningún efecto negativo en el brote o el porte del maíz y de la soja en comparación con el control no tratado.

Tabla 7. Efecto del SeedCoater en las producciones cuando se aplica al trigo de primavera en Canadá oriental

Tratamiento	Días previos al tratamiento	Cosechas	
		Trigo de primavera	
		Producción (kg/ha)	% con respecto al control
400 uM	0	1801**	18,1
	30		
Control	N/D	1525	0

\*\* estadísticamente significativo al 5%

30 Notas:

1. Los ensayos con trigo de primavera se realizaron en la granja MAC en tierra inoculada con un inoculante de guisantes a razón de 10<sup>9</sup> células/g mezcladas en los 20 cm superiores del suelo. El trigo de primavera fue tratado en el día de su plantación.

Conclusiones:

- 35 1. El SeedCoater, a 400 uM, aumentó las producciones de trigo de primavera hasta 251 kg/ha en comparación con los controles correspondientes.
2. El SeedCoater aumentó significativamente los rendimientos de la producción de trigo de primavera a un nivel estadístico del 5%.



Tabla 8. Comparación de producciones de maíz (cereal y ensilado) del uso de dos formulaciones de SeedCoater en ensayos de campo realizados en VARS y MAC

Concentración e ingrediente	Días previos al tratamiento	VARS		MAC			
		Producción de cereal (kg/ha)	% de aumento con respecto al control	Producción de ensilado (ton/ha)	% de aumento con respecto al control	Producción de cereal (kg/ha)	% de aumento con respecto al control
400 uM (G)	0					9703**	19,8
	30	9147	1,9	16,61	11,4		
400 uM (G/D)	30	9983	11,2	15,94	6,9		
Control	N/D	8975	0	14,91	0	8100	0

\*\* Estadísticamente significativo en comparación con el control relevante

Notas:

5 Las semillas de maíz fueron pretratadas con tratamiento de semillas Maxim XL, y luego tratadas con SeedCoater. Las semillas tratadas se plantaron en tierra tratada con  $10^5$  células/g de inoculante de soja mezcladas en los 20 cm superiores de suelo. En un segundo ensayo en MAC, se trataron semillas desnudas de maíz con SeedCoater y se plantaron en un campo en el que se había cultivado soja previamente, sin la adición de inoculación del suelo el día 0.

Conclusiones:

- 10 1. Una formulación (400 uM) de SeedCoater con dos isoflavonoides tuvo mejor rendimiento que un isoflavonoide en la formulación con la misma concentración en la producción de cereal cuando el maíz fue plantado 30 días después del tratamiento.
- 15 2. El SeedCoater aumentó la producción tanto de cereal como de ensilado de maíz en este estudio.
3. El tratamiento de las semillas de maíz con SeedCoater a 400 uM de genisteína y plantadas en terreno de soja sin la adición de inoculante de soja el día 0 puede aumentar significativamente la producción hasta un 19,8% con respecto al control.
- 20 4. Ambas formulaciones del SeedCoater resultaron en mayores producciones.

Tabla 9. Estudio del SeedCoater en maíz usando diferentes concentraciones de inoculación de la tierra

Factor principal (concentraciones inoculantes)	Subfactor de producción (kg/ha)	(Niveles de señal)	Producción (kg/ha)
0	4307	0	4237
$10^3$ células/g	4310	400 uM	4455
$10^4$ células/g	4366	500 uM	4430
$10^5$ células/g	4268	600 uM	4180
LSD <sub>0,05</sub>	414		206

Notas:

25 Las semillas tratadas con SeedCoater se plantaron usando cultivo tradicional cerca de Rockwood, Ontario, en un campo que no había cultivado soja anteriormente y no contenía poblaciones de *Bradyrhizobium japonicum*. El ensayo con maíz se dispuso como un diseño de cuadros divididos con 4 réplicas, factor principal (niveles de inoculante en el suelo) y subfactor (niveles de señal). Cada cuadro era de 15 m de longitud por 3 m de anchura, con 4 hileras por cuadro y 75 cm de separación entre hileras. Los cuadros fueron inoculados con *B. japonicum* a razón de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  células/g en los 20 cm superiores de suelo. Se trataron con SeedCoater semillas desnudas de maíz (Direct Seed D46 híbrido) en Agribiotics Inc. durante 30 días antes de la plantación.

Conclusiones:

- 30 1. El SeedCoater, a 400 uM, fue el mejor tratamiento y aumentó la producción de maíz en grano con respecto al control a un nivel estadístico del 5%.
- 35 2. El tratamiento con SeedCoater a 400-500 uM podría aumentar la producción de maíz en grano hasta un 5% con respecto al control cuando se plantaba en tierra sembrada en inoculante de soja.
3. El tratamiento con SeedCoater tuvo el mejor rendimiento con una tasa de inoculación de  $10^3$  células/g de suelo.

Tabla 10. Efecto del SeedCoater en producciones de maíz cuando se aplica un año antes de plantar

Tratamiento	Plantado unos días después del tratamiento*		Plantado 1 año después del tratamiento**	
	% de brote	Producción (kg/ha)	% de brote	Producción (kg/ha)
Maxim XL	78,4	14113	91,95	6277
Maxim XL+250 uM SeedCoater	83,7	15003	93,00	7488

Notas:  
 \* el porcentaje de brote fue una media de 5 emplazamientos (los mismos datos de la Tabla 11) y la producción de maíz de Nebraska, EE. UU.  
 \*\* los datos de brote y de producción proceden de 2 emplazamientos de Illinois.

Notas:

5 El experimento se llevó a cabo en terrenos en múltiples emplazamientos en EE. UU. Los datos de brote se obtuvieron de 5 emplazamientos y los datos de producción se obtuvieron del emplazamiento de Nebraska. El experimento que usó semillas de maíz pretratadas de 1 año fue dispuesto en dos emplazamientos de Illinois por The Tryon Group Inc. en 2004. En este estudio se emplearon semillas de maíz pretratadas usando Maxim XL (tratamiento químico de semillas).

Conclusiones:

- 10 1. Las semillas tratadas con SeedCoater no redujeron el porcentaje de brote después de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente.
2. Las semillas tratadas con SeedCoater resultaron en mayor producción de maíz hasta un 19% con respecto al control de tratamiento de semillas.

Tabla 11. Ensayos de campo del SeedCoater en maíz en múltiples emplazamientos de EE. UU.

Tratamientos	Momentos de plantación*			
	Precoz		Normal	
Maxim XL	11298	12302	8034	10671
	Mayor tasa de Cruiser	Menor tasa de Cruiser	Mayor tasa de Cruiser	Menor tasa de Cruiser
Maxim XL+ Cruiser+ SeedCoater	11549	12867	10608	10796

15 Notas: \*Las semillas de maíz fueron plantadas a mediados de abril como momento de plantación "precoz" y del 28 de abril al 3 de mayo como momento "normal" de plantación, y los datos de producción de maíz de la tabla están indicados en kg/ha.

Notas:

20 Los ensayos de campo se realizaron en Stanton, Hampton, Bloomington, Illinois, Iowa, Geneva, Minnesota y Wisconsin para los estudios de plantación precoz y en Stanton, dos emplazamientos de Hampton, y dos emplazamientos de Bloomington para los estudios de plantación normal.

Conclusión:

El SeedCoater con Maxim XL + Cruiser aumentó la producción de maíz de 126 a 2573 kg/ha en comparación con un tratamiento solo de Maxim XL en la media de múltiples emplazamientos en EE. UU.

25 Tabla 12. Señal aplicada a raíces de plántones de tomate trasplantados a tierra inoculada con rizobios de soja

Tratamientos	Producción temprana				Producción total			
	Frutos/cuadro	% sobre ctrl	kg/cuadro	% sobre ctrl	Frutos/cuadro	% sobre ctrl	kg/cuadro	% sobre ctrl
100 ml de agua como control/planta	58	0	10,41	0	219	0	25,60	0
100 ml de genisteína a 1 uM/planta	67,75	16,81	12,02	15,47	241,5	10,27	27,10	5,86
100 ml de genisteína a 10 uM/planta	66,25	14,22	11,64	11,82	217,75	-0,57	25,91	1,21
100 ml de genisteína a 50 uM/planta	71	22,41	12,85	23,44	198,5	-9,36	25,77	0,66

Notas:

1. Se inoculó el suelo con rizobios de soja a razón de  $10^6$  células/g mezcladas en los 20 cm superiores de suelo.
- 5 2. Se trasplantaron al campo tomateras de semillero en la fase de 6-7 hojas, 6 plantas/cuadro con un área de 4,5 m por 1,5 m y 4 réplicas cada tratamiento.
3. Se aplicaron 100 ml de solución de señal de cada concentración o agua al sistema radicular de las tomateras trasplantadas.
- 10 4. La señal inducía LQO *in situ* alrededor del sistema radicular para promover el crecimiento de las plantas.
5. Se llevaron a cabo ensayos en el MacDonald College, Universidad McGill, Montreal.

Conclusiones:

- 15 1. Todos los tratamientos aumentaron el peso de los frutos con respecto al control.
2. Los números de la producción precoz de frutos de todos los tratamientos fueron mayores y la concentración de 50  $\mu$ M fue estadísticamente mayor que el control.
- 20 3. El peso de la producción precoz de frutos de todos los tratamientos fue mayor y la concentración de 50  $\mu$ M fue estadísticamente mayor que el control.
4. Se llevó a cabo un estudio similar en tomatitos cherry en invernadero (véase la Figura 7).

Promoción de crecimiento de tubérculos de patata con señales cultivados en el terreno

Notas:

- 25 1. Se empaparon microtubérculos (cv. Bintje, tamaño de tubérculo de 0.5-0.7g) en cada solución de ensayo durante la noche a 25° C en la incubadora. La tasa de tratamiento fue de 50 ml/tratamiento, y 50 ml de agua como control.
2. Se sembró inoculante de soja en el suelo a razón de  $10^6$  células/g en los 20 cm superiores de suelo antes de la plantación.
- 30 3. Los tubérculos de patata tratados fueron plantados en tierra a 10-15 cm de profundidad, 10 tubérculos en un cuadro de 10 m<sup>2</sup> y se suministró 500 ml de agua a cada tubérculo en la tierra después de la plantación.
4. Fecha de la plantación: 20 de agosto de 2004, y fecha de la cosecha: 15 de octubre de 2004.

35 Conclusiones:

1. El tratamiento de microtubérculos de patata empapados en una solución de genisteína de 300  $\mu$ M durante la noche aumentó la producción de tubérculos de patata hasta un 17,7% con respecto al control. Véase la Fig. 4.
- 40 2. La mayor concentración de los tratamientos (300-500  $\mu$ M) resultó en un mayor tamaño de los tubérculos. Véase la Fig. 4.

Promoción de crecimiento de tubérculos de patata con señales cultivados en el invernadero

Notas:

- 45 1. Se sumergieron microtubérculos de patata (cv. Norland, tamaño de 10-15g) en cada solución de genisteína durante la noche (24 horas) a temperatura ambiente y se plantaron en macetas de 25 cm que contenían Sunshine Mix sembrada con inoculante de soja a razón de  $10^6$  células/g.
2. La temperatura del invernadero se mantuvo a 20/25°C en oscuridad/con luz.
- 50 3. Se plantó un tubérculo en cada maceta y se aleatorizaron por completo 8 réplicas de cada tratamiento en dos bancos de invernadero.
4. Se aplicó fertilizante de liberación lenta (20-20-20) a 50g/maceta.
5. Fecha de la plantación: 1 de septiembre de 2004. Fecha de la cosecha: 9 de noviembre de 2004.

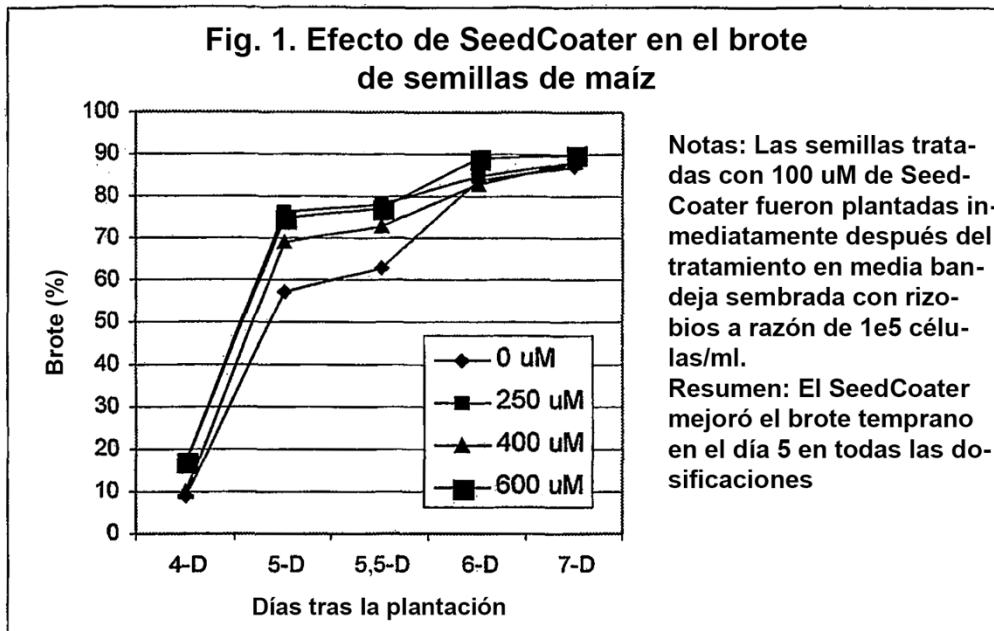
55 Conclusiones:

## ES 2 547 924 T3

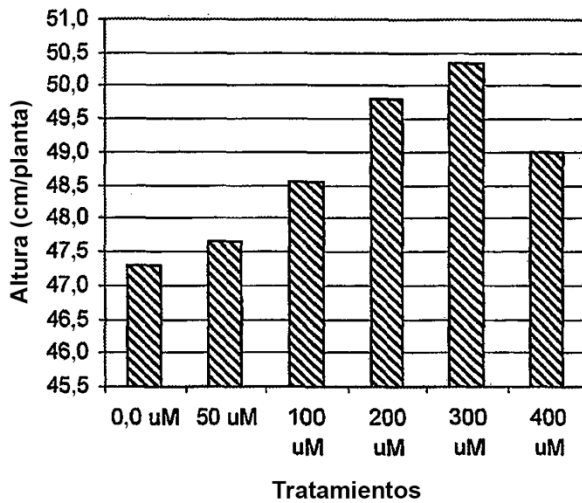
1. Todos los tratamientos aumentaron estadísticamente la producción de tubérculos de patata, y el tratamiento de 300 uM mostró la mejor promoción del crecimiento. Véase la Fig. 5.
  2. Las semillas de patata tratadas presentaron un mayor número de retoños para cada tubérculo, y empapar las semillas en una solución de 300 uM fue el mejor tratamiento para estimular el número de retoños. Véase la Fig. 5.
- 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de uno o más compuestos isoflavonoides o de una composición agrícola de los mismos para el tratamiento de semillas antes de plantar dichas semillas para aumentar la producción y/o mejorar la germinación de las semillas, y/o aumentar la densidad de la plantación, y/o para que resulte en un brote más precoz y/o para mejorar el vigor de las plantas, y/o mejorar el crecimiento de las plantas, y/o aumentar la biomasa, y/o para que resulte en una fructificación más precoz en una planta no leguminosa o en un cultivo de las mismas.
2. El uso según la Reivindicación 1 en el que la no leguminosa se cultiva para su uso en agricultura, horticultura, silvicultura o jardinería.
- 10 3. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 en el que los uno o más compuestos isoflavonoides son aplicados con un vehículo agrícolamente aceptable seleccionado del grupo constituido por agua, tratamientos de semillas, inoculantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, fertilizantes, promotores del crecimiento y sustratos hortícolas.
4. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en el que la tierra que ha de ser plantada con la no leguminosa ha sido pretratada con rizobios simbióticos específicos.
- 15 5. El uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4 en el que la no leguminosa ha sido pretratada con rizobios simbióticos específicos.
- 20 6. Un procedimiento para aumentar la producción y/o mejorar la germinación de las semillas, y/o aumentar la densidad de la plantación, y/o aumentar biomasa, y/o que resulte en un brote más precoz, y/o resulte en una fructificación más precoz, y/o mejore el vigor de las plantas, y/o mejor el crecimiento de las plantas en una planta no leguminosa o un cultivo que comprenda aplicar uno o más compuestos isoflavonoides o una composición agrícola de los mismos a semillas antes de plantar dichas semillas.
7. El procedimiento según la Reivindicación 6 en el que el compuesto isoflavonoide es aplicado con un vehículo agrícolamente aceptable seleccionado del grupo constituido por agua, tratamientos de semillas, inoculantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, fertilizantes, promotores del crecimiento y sustratos hortícolas.
- 25 8. El procedimiento según una cualquiera de las Reivindicaciones 6 o 7 en el que la tierra que ha de ser plantada con el cultivo de no leguminosas ha sido pretratada con uno o más rizobios simbióticos.
9. El procedimiento según una cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8 en el que la planta o el cultivo han sido pretratados con uno o más rizobios simbióticos.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la planta no leguminosa es el maíz.
- 30 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en el que la semilla es semilla de maíz.



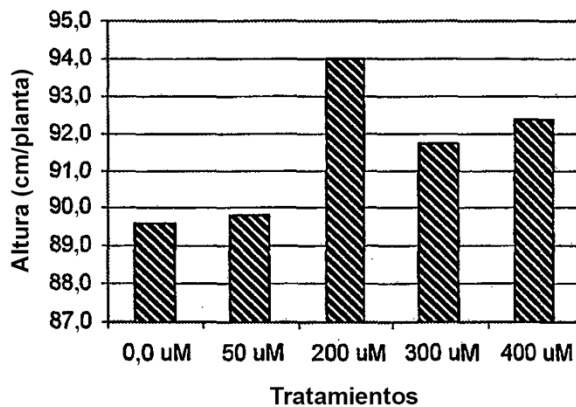
**Fig. 2. Efecto de SeedCoater en la altura de la planta de maíz**



Notas: Semillas tratadas con SeedCoater plantadas inmediatamente en tiestos sembrados con rizobios a razón de  $1e5$  células/ml, 10 semillas/tiesto y 8 tiestos/tratamiento, y reducidas a 2 plantas/tiesto tras el brote. Los datos se recopilaron el día 27.

Resumen: Se demostró una mayor altura de las plantas con todos los tratamientos, presentando el de 300 uM la mayor altura.

**Fig. 3. Efecto de SeedCoater en la altura de la planta de maíz**



Notas: Las semillas tratadas con SeedCoater fueron almacenadas a temperatura ambiente durante 1 mes y plantadas en tierra sembrada con rizobios a razón de  $1e5$  células/ml en tiestos de 12,7 cm, a 10 semillas/tiesto, 8 tiestos/tratamiento, y reducidas a 2 plantas por tiesto tras el brote. Los datos se recopilaron 32 días tras la siembra.

Resumen: El SeedCoater, a 200-400 uM, mejoró la altura de las plantas, siendo 200 uM el mejor tratamiento.

Figura 4. Promoción del crecimiento de los tubérculos de patata con señales cultivados en el terreno

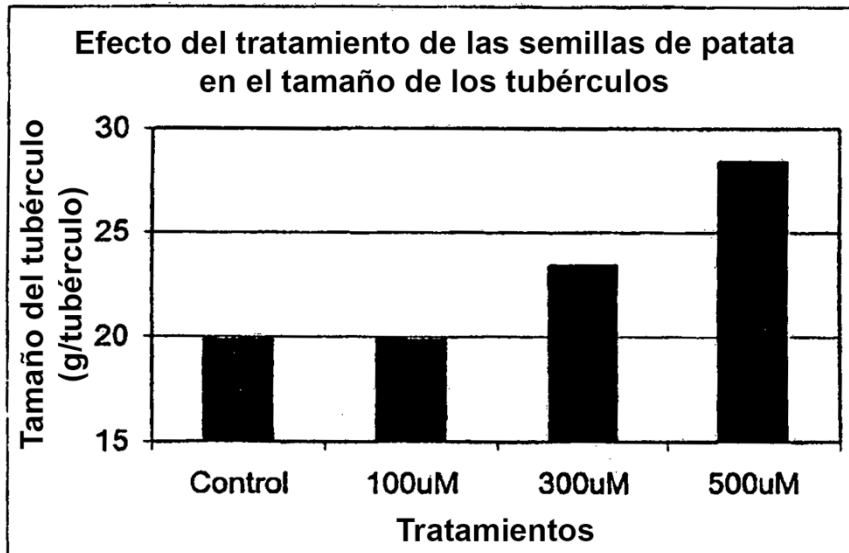
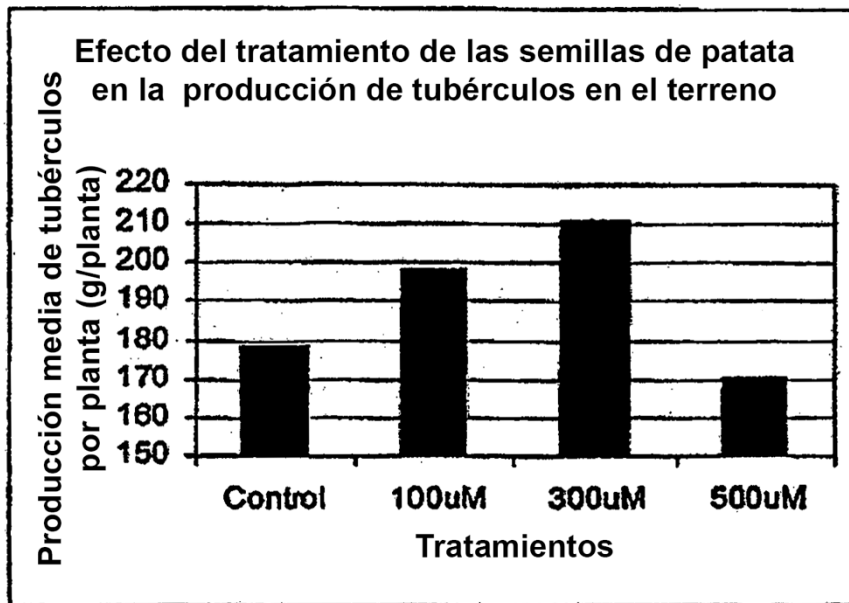




Figura 5. Promoción del crecimiento de los tubérculos de patata con señales cultivados en el invernadero, 2004

