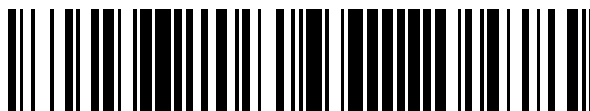


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 957**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012** **E 12769213 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2747565**

54 Título: **Métodos de tratamiento de semillas**

30 Prioridad:

08.09.2011 US 201161532234 P
08.12.2011 US 201161568435 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SMITH, R. STEWART;
HABIB, AHSAN y
KOSANKE, JOHN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 574 957 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

Métodos de tratamiento de semillas

5 Antecedentes de la invención

[0001] La simbiosis entre las bacterias de tierra gram-negativa, Rhizobiaceae y Bradyrhizobiaceae, y leguminosas tales como semilla de soja, está bien documentada.

10 La base bioquímica para estas relaciones incluye un intercambio de señalización molecular, donde los compuestos de señal planta-a-bacteria incluyen flavonas, isoflavonas y flavanonas, y los compuestos de señal bacteria-a-planta incluyen los productos de extremo de la expresión de genes Bradyrhizobial y Rizobial nod, conocidos como lipo-quitoooligosacáridos (LCO).

La simbiosis entre estas bacterias y las leguminosas permite a la legumbre fijar nitrógeno atmosférico y así crecen en suelo que tiene bajos niveles de nitrógeno asimilable, obviando así una necesidad para fertilizantes de nitrógeno.

15 Ya que fertilizantes de nitrógeno pueden significativamente aumentar el coste de plantas de cultivo y se asocian con un número de efectos contaminantes, la industria agrícola continúa sus esfuerzos para explotar esta relación biológica y desarrollar nuevos agentes y métodos para mejorar el rendimiento de plantas sin aumentar el uso de fertilizantes basados en nitrógeno.

20 [0002] WO2005/087005 divulga el uso de una o varias señales isoflavonoides compuestas que pueden estar con un portador aceptable agrícola, aplicado antes de la siembra.

25 [0003] WO2009/049747 divulga una composición biológica para aumentar el crecimiento de planta y el rendimiento de planta de cultivo, que comprende lipo-quitoooligosacárido y compuesto flavonoide incluyendo flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas o isoflavonas.

[0004] Patente US 6,979,664 enseña un método para aumentar la germinación de semilla o emergencia de semilla de una planta de cultivo, que incluye las etapas de proporcionar una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un lipo-quitoooligosacárido y un portador adecuado agrícola y aplicar la composición en la proximidad inmediata de una semilla o plantón en una cantidad eficaz para aumentar la germinación de semilla de la emergencia de plantón en comparación con una semilla no tratada o plantón.

35 [0005] Otro desarrollo en este concepto se enseña en WO 2005/062899, dirigido a combinaciones de al menos un inductor de planta, es decir un LCO, en combinación con un fungicida, insecticida, o combinación de los mismos, para mejorar una característica de planta tal como pie de planta, crecimiento, vigor y/o rendimiento.

Las composiciones y métodos se consideran aplicables a tanto leguminosas como no leguminosas, y se pueden usar para tratar una semilla (justo antes de siembra), plantón, raíz o planta.

40 [0006] De forma similar, WO 2008/085958 enseña composiciones para el aumento del crecimiento de planta y rendimiento de planta de cultivo en tanto leguminosas como no leguminosas, y que contienen LCO en combinación con otro agente activo tal como una quitina o quitosano, un compuesto flavonoide, o un herbicida, y que se pueden aplicar a semillas y/o plantas concomitantemente o consecutivamente.

Como en el caso de la publicación '899, la publicación '958 enseña tratamiento de semillas justo antes de siembra.

45 [0007] Un número de otras publicaciones describen el beneficio de LCO en los procesos de tratamiento de semilla, tal como, Kidaj et al., "Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions," Microbiol Res 25426 (2011) y Maj et al., "Pretreatment of Clover Seeds with Nod Factors Improves Growth and Nodulation of Trifolium pratense," J Chem Ecol (2009) 35:479-487.

50 [0008] Más recientemente, Halford, Smoke Signals," in Chem. Eng. News (April 12, 2010), en páginas 37-38, informa que karrikinas o butenolidas que se contienen en el humo hacen de estimulantes de crecimiento y germinación de semilla de espuela tras un fuego de bosque, y pueden tonificar semillas tales como maíz, tomates, lechuga y cebollas que han sido almacenadas.

Estas moléculas son el sujeto de la patente US 7,576,213.

55 Breve resumen de la invención

[0009] La presente invención proporciona métodos para aumentar el crecimiento de planta y producción de planta de cultivo donde el efecto beneficioso de una molécula de señal de planta (agente de aumento de crecimiento de planta) se puede obtener sin la necesidad de aplicar la molécula de señal de planta (agente de aumento de crecimiento de planta) a la semilla contemporáneamente con la siembra.

60 La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que el tratamiento de semillas con una molécula de señal de planta que es un LCO, seguido de almacenamiento prolongado antes de la siembra, produce crecimiento de planta mejorada, incluyendo superior rendimiento de planta y/o área de superficie de hoja y/o número de raíz, longitud y masa, en comparación con planta cosechada de ambas semillas no tratadas.

La presente invención también proporciona métodos para aumentar el crecimiento de planta y producción de planta de cultivo donde se pueden obtener mejoras adicionales sobre plantas de cultivo de plantas producidas de semillas tratadas justo antes o en una semana o menos de la siembra.

5 [0010] Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para aumento el crecimiento de planta, que comprende tratar la semilla al menos un mes (treinta días) antes de siembra con una cantidad eficaz de una molécula de señal de planta, donde la molécula de señal de planta es un lipoquitooligosacárido.
En formas de realización, la semilla se puede tratar conforme al presente método 2 meses antes de siembra, al menos 3 meses antes de siembra, al menos 4 meses antes de siembra, al menos 5 meses antes de siembra, al
10 menos 6 meses antes de siembra, al menos 9 meses antes de siembra, al menos 1 año antes de siembra, al menos 2 años antes de siembra y en algunas formas de realización, al menos 3 años antes de siembra.

[0011] El tratamiento se usa para producir una planta (planta de cultivo) que muestra al menos uno del rendimiento aumentado medido en cuanto a bushel/acre, número de raíz aumentado, longitud de raíz aumentada, masa de raíz aumentada, volumen de raíz aumentada y área de hoja aumentada, en comparación con planta cosechada de semilla no tratada.
En formas de realización particulares, el tratamiento se puede utilizar para producir una (planta de cultivo) planta que muestra al menos uno de rendimiento aumentado medido en cuanto a bushel/acre, número de raíz aumentado, longitud de raíz aumentada, masa de raíz aumentada, volumen de raíz aumentada y área de hoja aumentada en
15 comparación con una planta (de cultivo) cosechada de semilla tratada con la molécula de señal justo antes o a una semana o menos de la siembra.

[0012] En la presente invención, la molécula de señal de planta es un lipo-quitooligosacárido (LCO).
En algunas formas de realización, el LCO es recombinante.
25 En otras formas de realización, el LCO es sintético.
En otras formas de realización, el LCO se obtiene de un microorganismo, por ejemplo, unas especies de *Rhizobium* seleccionada de *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium sp.* y *Azorhizobium sp.* o de un hongo micorrizal arbuscular.

30 [0013] En otras formas de realización, el tratamiento comprende además contacto de la semilla con al menos un otro agente agrónomicamente beneficioso, por ejemplo, diazótrofo (inoculante rizobial), hongos micorrizales, un agente de solubilización de fosfato, herbicida, insecticida o una fungicida.
En algunas formas de realización, el tratamiento implica pulverización de una composición que comprende la molécula de señal de planta sobre la semilla, y en algunas otras formas de realización, el tratamiento implica goteo
35 de la composición sobre las semillas.

[0014] El método de la presente invención es aplicable tanto a leguminosas como a no leguminosas.
En algunas formas de realización, la semilla leguminosa es semilla de haba de soja.
En algunas otras formas de realización, la semilla que es tratada es semilla no leguminosa tal como una semilla de
40 planta de cultivo de campo, por ejemplo, maíz, o una semilla de planta de cultivo vegetal.

[0015] La semilla se puede tratar conforme al presente método en cualquier sitio de un mes (treinta días) hasta 1 año, 2 años y en algunas formas de realización, incluso 3 años antes de la siembra, dependiente de propiedades de semilla particular (viabilidad tras almacenamiento) o estándares de industria.
45 Por ejemplo, las semillas de haba de soja son generalmente plantadas la estación siguiente, mientras que las semillas de maíz se pueden almacenar durante periodos mucho más largos de tiempo incluyendo hasta 3 años antes de la siembra.

[0016] Como demostrado en los ejemplos prácticos, que incluyen experimentos comparativos llevados a cabo tanto en condiciones de invernadero como de campo, los beneficios de agentes de aumento de crecimiento de moléculas/planta de señal se pueden obtener aunque las moléculas de señal se aplican a una semilla significativamente antes del tiempo de la siembra y tras un periodo de almacenamiento prolongado.

50 [0017] Como demostrado además en los ejemplos prácticos, que incluyen experimentos comparativos llevados a cabo tanto en condiciones de invernadero como de campo, formas de realización de la presente invención que supusieron tratamiento de semilla de haba de soja con un LCO de *Bradyrhizobium japonicum* mostrando rendimiento de planta aumentado, área de superficie de hoja y longitud de raíz y volumen de raíz aumentados en comparación tanto con semillas no tratadas como semillas tratadas con el LCO justo antes o a una semana de la siembra.

60 Breve descripción de los dibujos

[0018]

Las figuras 1 y 2 muestran las estructuras químicas de compuestos de lipo-quitooligosacárido útiles (LCO) en la práctica de la presente invención.
65 La fig. 3 es un gráfico de barras que muestra el área de superficie media de hojas trifoliadas de primer en planta de haba de soja de 19 días germinada de semilla tratada conforme a una forma de realización de la

presente invención (por ejemplo, 55 días antes de la siembra) en comparación con controles (es decir, semilla no tratada y semilla tratada con la molécula de señal 7 días antes de la siembra).

Descripción detallada

[0019] Para fines de la presente invención, el término "molécula de señal de planta", que se puede usar de forma intercambiable con "agente que aumenta el crecimiento de la planta", aproximadamente se refiere a cualquier agente, tanto de origen natural en plantas o microbios, como sintético (y que puede ser de origen no natural) que directa o indirectamente activa una vía bioquímica de planta, dando como resultado crecimiento de planta aumentado, medible al menos en cuanto al menos uno de rendimiento aumentado medido en cuanto a bushel/acre, número de raíz aumentada, longitud de raíz aumentada, masa de raíz aumentada, volumen de raíz aumentada y área de hoja aumentada.

Las moléculas de señal de planta que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención son compuestos de lipo-quitoligosacárido (LCO's).

[0020] La molécula de señal de planta puede ser componente aislado y/o purificado.

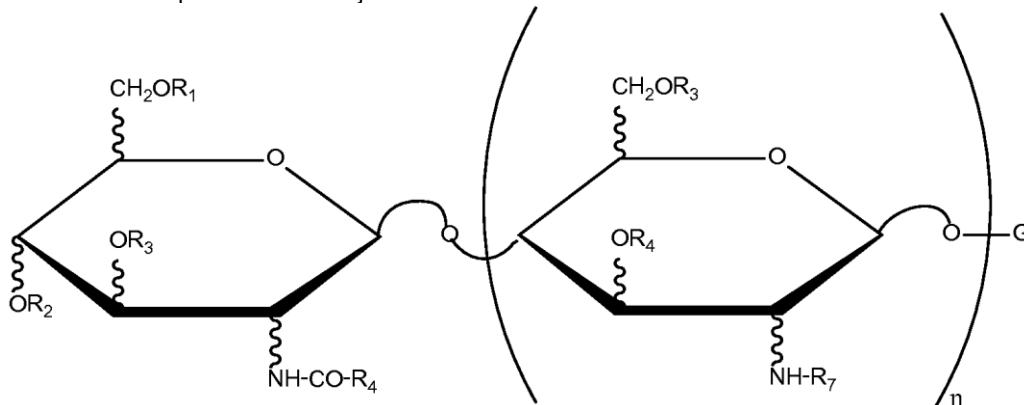
El término "aislado" significa que la molécula de señal es quitada de su estado natural y separada de otras moléculas naturalmente asociada a esta.

El término "purificado" significa que la concentración de la molécula de señal es aumentada (por un proceso de purificación) con respecto a otros componentes, por ejemplo, componentes no deseados o inferiores.

[0021] LCO, también conocidos en la técnica como señales simbióticas Nod o factores Nod, consisten en un esqueleto de oligosacárido de residuos de *N*-acetil-D-glucosamina β -1,4-enlazada ("GlcNAc") con una cadena de acilo graso N-enlazada condensada en el extremo no reductor.

LCO se diferencian en el número de residuos GlcNAc en el esqueleto, en la longitud y grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar no reductor y reductor.

Un ejemplo de un LCO es presentado debajo como fórmula I



donde:

G es una hexosamina que puede ser sustituida, por ejemplo, por un grupo acetílico en el nitrógeno, un grupo de sulfato, un grupo acetílico y/o un grupo de éter en un oxígeno,

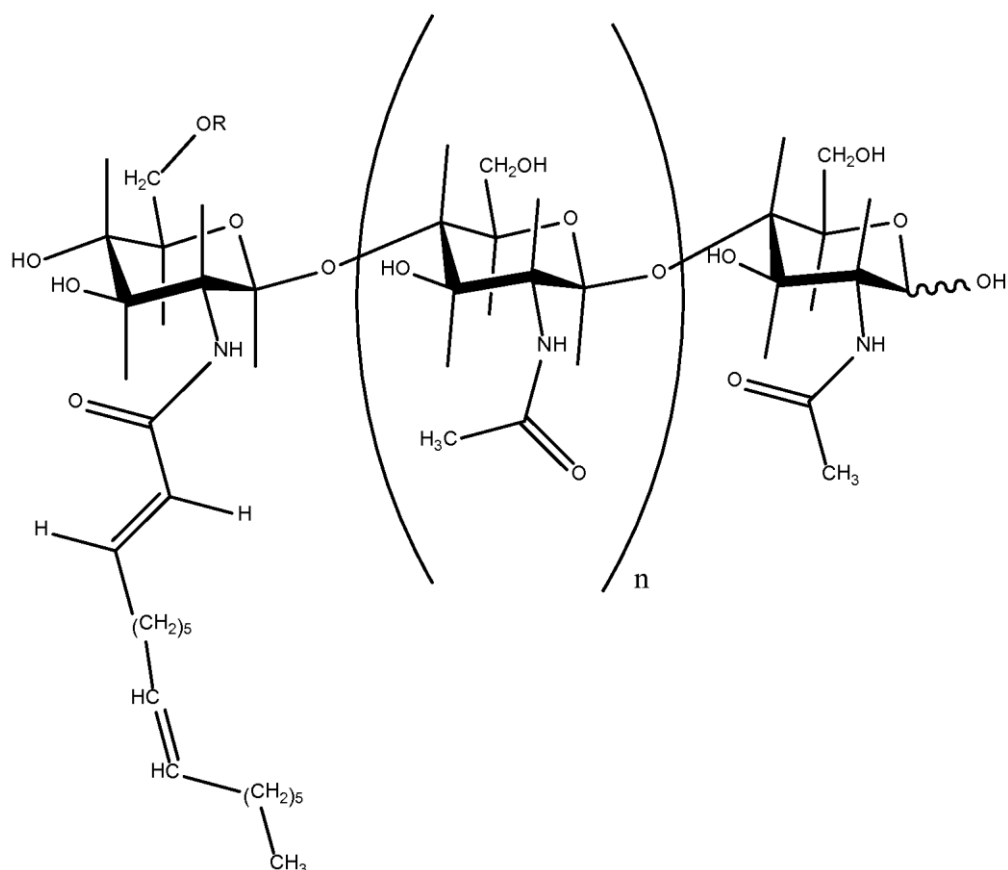
R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ y R₇, que puede ser idéntico o diferente, representan H, CH₃ CO--, C_x H_y CO-- donde x es un número entero entre 0 y 17, e y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo de acilo tal como por ejemplo un carbamilo,

R₄ representa una cadena alifática mono-, di-, o triinsaturada y tetrainsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4.

[0022] LCO se pueden obtener (por ejemplo, aislado y/o purificado) de bacterias tales como *Rhizobia*, por ejemplo, *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Sinorhizobium sp.* y *Azorhizobium sp.*

Estructura LCO es característica para cada una de esas especies bacterianas, y cada cepa puede producir múltiples LCO con estructuras diferentes.

Por ejemplo, LCO específicos de *S. meliloti* han sido también descritos en patente US 5,549,718 con la fórmula II:



donde R representa H o $\text{CH}_3 \text{ CO--}$ y n es igual a 2 o 3.

5 [0023] LCO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1; NodRM-3. Cuando acetilado (el $\text{R}=\text{CH}_3 \text{ CO--}$), se vuelven AcNodRM-1, y AcNodRM-3, respectivamente (patente US 5,545,718).

10 [0024] LCO de *Bradyrhizobium japonicum* son descritos en patentes US 5,175,149 y 5,321,011. Aproximadamente, son pentasacárido fitohormonas que comprenden metilfucosa. Un número de estos LCO derivados de *B. japonicum* son descritos: BjNod-V ($\text{C}_{18:1}$); BjNod-V (Ac; $\text{C}_{18:1}$), BjNod-V ($\text{C}_{16:1}$); y BjNod-V (Ac; $\text{C}_{16:0}$), con "V" indicando la presencia de cinco N-acetilglucosaminas; "Ac" una acetilación; el número después de "C" indicando el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después de ":" el número de enlaces doble.

15 [0025] LCO usados en formas de realización de la invención se pueden recuperar de cepas bacterianas que producen LCO, tales como cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (incluyendo *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (incluyendo *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (incluyendo *S. meliloti*), y cepas bacterianas genéticamente modificadas para producir LCO.

20 [0026] LCO son los determinantes primarios de especificidad de huésped en la simbiosis de legumbre (Diaz, et al., Mol. Plant-Microbe Interactions 13:268-276 (2000)). Así, en la familia de legumbre, géneros y especies de rhizobia específicos desarrollan una relación de fijación de nitrógeno simbiótica con un huésped de legumbre específica. Estas combinaciones de plant-host/bacteria son descritas en Hungria, et al., Soil Biol. Biochem. 29:819-830 (1997). Ejemplos de estas asociaciones simbióticas de bacterias/legumbre incluyen *S. meliloti*/alfalfa y trébol oloroso; *R. leguminosarum biovar viciae*/guisantes y lentejas; *R. leguminosarum biovar phaseoli*/habas; *Bradyrhizobium japonicum*/habas de soja; y *R. leguminosarum biovar trifolii*/trébol rojo.

25 Hungria también enumera los inductores de gen flavonoide eficaz Nod de las especies rizobiales, y las estructuras LCO específicas que se producen por las especies rizobiales diferentes.

30 Sin embargo, especificidad LCO solo se requiere para establecer nodulación en leguminosas. En la práctica de la presente invención, uso de un LCO dado no está limitado al tratamiento de semilla de su legumbre simbiótica asociada, para conseguir rendimiento de planta aumentado medido en cuanto a bushel/acre, número de raíz aumentada, longitud de raíz aumentada, masa de raíz aumentada, volumen de raíz aumentado y área de hoja aumentada, en comparación con planta cosechado de semilla no tratada, o en comparación con planta cosechado de semilla tratada con la molécula de señal justo antes o a una semana o menos de la siembra.

Así, por medio de ejemplo, un LCO obtenido de *B. japonicum* se puede utilizar para tratar semilla leguminosa además del haba de soja y semilla no leguminosa tal como maíz.

Como otro ejemplo, el guisante LCO obtenible de *R. leguminosarum* ilustrado en la Fig. 1 (designado V LCO (C18:1); SP104) puede utilizarse para tratar semilla leguminosa diferente del guisante y no leguminoso también.

[0027] También incluido en la presente invención es el uso de LCO obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de hongos micorrizales arbusculares, tales como hongos del grupo Glomeromycota, por ejemplo, *Glomus intradicus*. Las estructuras de LCO representativas obtenidas de estos hongos son descritos en WO 2010/049751 y WO 2010/049751 (los LCO descritos en estos también referidos como "factores Myc").

[0028] También incluido en la presente invención es el uso de compuestos LCO sintéticos, tales como los descritos en WO2005/063784, y LCO recombinante producido mediante ingeniería genética.

La estructura básicas de origen natural de LCO puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en el LCO de origen natural, tales como los descritos en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000) y D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002). Moléculas de oligosacárido precursor (CO, que como se describe abajo, son también útiles como moléculas de señal de planta en la presente invención) para la construcción de LCO también se puede sintetizar por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como en Samain, et al., Carb. Res. 302:35-42 (1997).

[0029] LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solo o en forma de un cultivo de bacterias productoras de LCO u hongos.

Por ejemplo, OPTIMIZE® (disponible comercialmente de Novozymes BioAg Limited) contiene un cultivo de *B. japonicum* que produce un LCO (LCO-V(C18:1 MeFuc), MOR116) que se ilustra en la Fig. 2.

Métodos para proporcionar LCO sustancialmente puros incluyen sencillamente eliminar las células microbianas de una mezcla de LCO y el microbio, o continuar aislando y purificando las moléculas LCO a través de separación de fase de solvente LCO seguida de cromatografía de HPLC como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. 5,549,718.

Purificación se puede mejorar por HPLC repetida, y las moléculas LCO purificadas se pueden liofilizar para almacenamiento a largo plazo.

[0030] Las semillas se pueden tratar con la molécula de señal de planta en diferentes vías pero preferiblemente vía pulverización o goteo.

Tratamiento de pulverización y goteo se puede realizar por la formulación de una cantidad eficaz de la molécula de señal de planta en un portador aceptable agrícola, típicamente acuoso en la naturaleza, y pulverización o goteo de la composición sobre semilla vía un sistema de tratamiento continuo (que se calibra para aplicar tratamiento a un índice predefinido al flujo continuo de semilla), tal como un tipo tambor de tratador.

Estos métodos ventajosamente emplean volúmenes relativamente pequeños de portador para permitir secado relativamente rápido de la semilla tratada.

En esta forma, volúmenes grandes de semilla pueden ser eficazmente tratados.

Sistemas de lote, donde un tamaño de lote predeterminado de semilla y composiciones de molécula de señal se entregan en un mezclador, también pueden ser empleados.

Sistemas y aparatos para realizar estos procesos son disponibles comercialmente de proveedores numerosos, por ejemplo, Bayer CropScience (Gustafson).

[0031] En otra forma de realización, el tratamiento implica recubrir semillas.

Un tal proceso implica recubrir la pared interna de un contenedor redondo con la composición, añadir semillas, luego rotar el contenedor para hacer que las semillas entren en contacto con la pared y la composición, un proceso conocido en la técnica como "revestimiento de contenedor".

Semillas se pueden recubrir por combinaciones de métodos de recubrimiento.

Remojo implica típicamente uso de una solución acuosa que contiene el intensificador de crecimiento de planta.

Por ejemplo, semillas se pueden empapar de durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, durante al menos 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas).

Algunos tipos de semillas (por ejemplo, semillas de haba de soja) tienden a ser sensibles a la humedad.

Así, remojar tales semillas durante un periodo de tiempo extendido no puede ser deseable, en cuyo caso el remojo es típicamente realizado de durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos.

[0032] Sin pretensión a ser limitado por cualquier teoría particular de operación, los solicitantes creen que incluso en la medida en que el tratamiento no pueden causar que la molécula de señal de planta permanezca en contacto con la superficie de semilla después del tratamiento y durante cualquier parte de almacenamiento, la molécula de señal puede conseguir los efectos esperados por un fenómeno conocido como memoria de semilla o percepción de semilla.

Ver, Macchiavelli y Brelles-Marino, J. Exp. Rezo. 55(408):2635-40 (2004). Solicitantes también creen que tras el tratamiento la molécula de señal, el LCO difunde hacia la raicilla de desarrollo joven y activa genes simbióticos y desarrollables que producen un cambio en la arquitectura de raíz de la planta.

Sin embargo, las composiciones con la molécula de señal de planta pueden contener además una agente adherente o de recubrimiento para asistir en la adherencia de la molécula de señal a la semilla.

Para uso estético, las composiciones puede contener además un polímero de recubrimiento y/o un colorante.

[0033] La cantidad eficaz de la molécula de señal de planta usada para tratar la semilla, expresada en unidades de concentración, generalmente varía de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-14} M, y en algunas formas de realización, de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-11} M, y en algunas otras formas de realización de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-8} M.

Expresada en unidades de peso, la cantidad eficaz generalmente varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 µg/cien peso (ctw) semilla, y en algunas formas de realización de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 µg/ctw, y en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3.0 µg/ctw semilla.

La cantidad eficaz de la molécula de señal de planta, sin embargo, puede ser obtenido por un ensayo de respuesta de dosificación adecuada, preferiblemente, en un estudio de invernadero y/o campo.

[0034] El tratamiento también puede implicar poner en contacto la semilla, previamente, simultáneamente o consecutivamente al contacto con la molécula de señal de planta, con un agente agrícola/agronómicamente beneficioso.

Como se utiliza en este caso y en la técnica, el término "agrícola/agronómicamente beneficioso" se refiere a agentes que cuando aplicados a semillas suponen aumento (que pueden ser estadísticamente significativo) de características de planta tal como pie de planta, crecimiento, vigor o rendimiento en comparación con semillas no tratadas.

Ejemplos representativos de tales agentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no es limitado a, diazotrofos, hongos micorrizales, herbicidas, fungicidas, insecticidas, y agentes de solubilización de fosfato.

[0035] Herbicidas adecuados incluyen bentazona, acifluorfen, chlorimurón, lactofen, clomazone, fluazifop, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafen, flumiclorac, imazaquin, y cletodim.

Productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos son fácilmente disponibles.

Concentración herbicida en la composición generalmente corresponderá al índice de uso marcado para un herbicida particular.

[0036] Un "fungicida" como se utiliza en este caso y en la técnica, es un agente que mata o inhibe crecimiento fúngico.

Como se utiliza en este caso, una fungicida "muestra actividad contra" unas especies particulares de hongos si el tratamiento con el fungicida produce matanza o inhibición de crecimiento de una población fúngica (por ejemplo, en la tierra) con respecto a una población no tratada.

Fungicidas eficaces conforme a la invención mostrarán adecuadamente actividad contra una gama ancha de patógenos, incluyendo pero no limitado a *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* o *Sclerotinia* y *Phakopsora* y combinaciones de los mismos.

[0037] Fungicidas comerciales pueden ser adecuados para su uso en la presente invención.

Fungicidas disponibles comercialmente adecuados incluyen PROTEGE, RIVAL o ALLEGIANCE FL o LS (Gustafson, Plano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA or RFC, MAXIM 4FS o XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontario) y PROTREAT (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina).

Ingredientes activos en estos y otros fungicidas comerciales incluyen, pero de forma no limitativa, fludioxonil, mefenoxam, azoxistrobin y metalaxil.

Fungicidas comerciales son más adecuadamente usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

[0038] Como se utiliza en este caso, un insecticida "muestra actividad contra" unas especies particulares de insecto si el tratamiento con el insecticida produce matanza o inhibición de una población de insecto con respecto a una población no tratada.

Insecticidas eficaces conforme a la invención mostrarán adecuadamente actividad contra una gama ancha de insectos incluyendo, pero no limitado a, gusanos alambre, gusano cortador, larvas, gusano de la raíz de maíz, larvas de maíz de semilla, escarabajos de pulga, bichos de chinche, pulgones, escarabajos de hoja, y chinches.

[0039] Insecticidas comerciales se pueden adecuar para usar en la presente invención.

Insecticidas disponibles comercialmente adecuados incluyen CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO y PONCHO (Gustafson, Plano, TX).

Ingredientes activos en estos y otros insecticidas comerciales incluyen tiametoxam, clotianidina, e imidacloprid.

Insecticidas comerciales son más adecuadamente usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

[0040] Como se utiliza en este caso, agentes de solubilización de fosfato incluyen, pero de forma no limitativa, microorganismos de solubilización de fosfato.

Como se utiliza en este caso, "microorganismo de solubilización de fosfato" es un microorganismo que es capaz de aumentar la cantidad de fósforo disponible para una planta.

Microorganismos de solubilización de fosfato incluyen cepas bacterianas y fúngicas.

En la forma de realización, el microorganismo de solubilización de fosfato es un microorganismo que forma espora.

[0041] Ejemplos no limitativos de microorganismos de solubilización de fosfato incluyen especies de un género seleccionado del grupo consistente en *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathanian*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *vibrio*, *Xanthobacter*, y *Xanthomonas*.

[0042] Ejemplos no limitativos de microorganismos de solubilización de fosfato son seleccionados del grupo que consiste en *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathanian salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, y *Xanthomonas campestris*.

[0043] Preferiblemente, el microorganismo de solubilización de fosfato es una cepa del hongo *Penicillium*.

Cepas del hongo *Penicillium* que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen *P. bilaiae* (fautermente conocido como *P. bilaii*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gastrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variabile*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus*, y *P. expansum*.

[0044] Más preferiblemente, la especie de microorganismo *Penicillium* de solubilización de fosfato es *P. bilaiae*, *P. gastrivorus*, y/o una combinación de los mismos.

De la forma más preferible, las cepas *P. bilaiae* son seleccionadas del grupo consistente en ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin, et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36-43) y la cepa *P. gastrivorus* es NRRL 50170 (ver, Wakelin, supra.).

[0045] Según la invención, está previsto que más de un microorganismo de solubilización de fosfato pueda ser utilizado, tal como, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, incluyendo cualquier combinación de *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathanian*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, and *Xanthomonas*, including one species selected from the following group: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathanian salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, y *Xanthomonas campestris*.

[0046] Diazotrofos son bacterias y arqueas que fijan gas nitrógeno atmosférico en una forma más utilizable tal como amoníaco.

Ejemplos de diazotrofos incluyen bacterias de los géneros *Rhizobium* spp. (por ejemplo, *R. cellulosilicicum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola*, y/o *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium* spp. (por ejemplo, *B. betae*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamiae*, *B. liaoningense*, *B. pachirhizi*, y/o *B. yuanmingense*), *Azorhizobium* spp. (por ejemplo, *A. caulinodans* y/o *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium* spp. (por ejemplo, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. saheli*, *S. teranga*, y/o *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium* spp., (*M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluviarum*, *M. septentrionale*, *M. temperatum*, y/o *M. tianshanense*), y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el diazótrofo es seleccionado del grupo consistente en *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *S. meliloti*, y combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, el diazótrofo es *B. japonicum*.

En otra forma de realización, el diazótrofo es *R. leguminosarum*.

5 En otra forma de realización, el diazótrofo es *R. meliloti*.

En otra forma de realización, el diazótrofo es *S. meliloti*.

10 [0047] Hongos micorrizales forman asociaciones simbióticas con las raíces de una planta vascular, y proporcionan, por ejemplo, capacidad de absorción para agua y nutrientes minerales debido al área de superficie comparativamente grande de micelio.

Hongos micorrizales incluyen hongos endomicorrizales (también llamado arbuscular vesicular micorrizae, VAM, arbuscular micorrizae, o AM), un hongo ectomicorrizal, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, el hongo micorrizal es un endomicorrizae del filo Glomeromycota y géneros *Glomus* y *Gigaspora*.

15 En todavía otra forma de realización, el endomicorrizae es una cepa de *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum*, o *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita*, o una combinación de los mismos.

20 [0048] Ejemplos de hongos micorrizales incluyen ectomicorrizae del filo Basidiomycota, Ascomycota, y Zygomycota.

Otros ejemplos incluyen una cepa de *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma citrinum*, o una combinación de los mismos.

25 [0049] Los hongos micorrizales incluyen ecroid micorrizae, arbutoide micorrizae, o monotropoide micorrizae.

Arbuscular y ectomicorrizae forman micorriza ericoide con muchas plantas del orden Ericales, mientras algunas Ericales forman arbutoide y monotropoide micorrizae.

En una forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza ericoide, preferiblemente del filo Ascomycota, tal como *Hymenoscyphus ericae* u *Oidiodendron* sp.

30 En otra forma de realización, la micorriza también puede ser una micorriza arbutoide, preferiblemente del filo Basidiomycota.

En otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza monotripoide, preferiblemente del filo Basidiomycota.

35 En todavía otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza de orquídea, preferiblemente del género *Rhizoctonia*.

[0050] Los métodos de la presente invención son aplicables a semilla leguminosas, ejemplos representativos de las cuales incluyen haba de soja, alfalfa, cacahuete, guisante, lenteja, judía y trébol.

40 Los métodos de la presente invención son también aplicables a semillas no leguminosas, por ejemplo, Poaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae y Solonaceae.

Ejemplos representativos de semilla no leguminosa incluyen plantas de cultivo de campo tales como maíz, cereales tales como arroz, cebada y trigo, algodón y canola, y plantas de cultivo vegetales tales como patatas, tomates, pepinos, remolachas, lechuga y melón.

45 [0051] Tras el tratamiento, y para fines de almacenamiento, la semilla es luego empaquetada, por ejemplo, en bolsas de 50-lb o 100-lb, o bolsas en masa o contenedores, conforme a técnicas estándar.

La semilla se almacena durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses, e incluso más tiempo, por ejemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 meses, o tiempo largo incluso, bajo condiciones de almacenamiento apropiadas que se conocen en la técnica. Como se utilizan en este caso, el término "mes" significará 30 días.

50 Como se utiliza en este caso, un año significará 365 días.

Mientras que la semilla de haba de soja puede tener que ser plantada la estación siguiente, la semilla de maíz se puede almacenar durante periodos mucho más largos de tiempo incluyendo hasta 3 años.

55 [0052] La molécula de señal de planta se puede aplicar de cualquier manera adecuada, tal como en forma de una composición de tratamiento de semilla que comprende al menos una molécula de señal de planta y un portador aceptable agrícola.

60 [0053] Cualquier portador aceptable agrícola adecuado puede ser utilizado, por ejemplo, un soporte sólido, portador semi-sólido, un portador líquido de base acuosa, un portador líquido de base no acuosa, una suspensión, una emulsión o un concentrado emulsionable.

Portadores agrícolamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, surfactantes, adherentes, ligantes, agentes estabilizantes, y/o polímeros.

[0054] La composición de tratamiento de semilla puede incluir además uno o varios agentes beneficiosos agrícolamente/agronómicamente (además de la molécula de señal), tales como, uno o varios diazotrofos, hongos micorrizales, herbicidas, fungicidas, insecticidas, y/o agentes de solubilización de fosfato.

5 [0055] La presente invención será ahora descrito mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Resumen de ejemplos prácticos

10 [0056] Ejemplos 1 y 2 describen experimentos de campo comparativo que usan semilla de haba de soja que demuestran que la invención reivindicada consigue rendimiento de planta aumentado.
Las semillas fueron tratadas conforme a la presente invención 5 meses antes de siembra con el producto comercial Optimize® que es una combinación de inoculante *Bradyrhizobium japonicum* y V LCO (C18:1, MeFuc) (ilustrado en la Fig. 2), y solo con el LCO puro, y 4,5 meses antes de siembra con (es decir, menos puro) grados no comerciales de Optimize® y solo LCO, y para fines de comparación con estas mismas moléculas de señal de planta durante la siembra.

15 Semilla no tratada fue usada como otro control.
Los resultados, que se expresan en cuanto a la diferencia en el rendimiento granular, medido en unidades de bushel/acre, muestra que los métodos de la invención reivindicada consiguió un aumento en el rendimiento de haba de soja, con respecto a métodos no inventivos (es decir, semilla tratada a tiempo de la siembra y semilla no tratada).

20 [0057] Ejemplos 3 y 4 describen experimentos comparativos llevados a cabo en el invernadero y que demuestran que la invención reivindicada consigue aumentar otras características de crecimiento de planta.

Ejemplo 3 describe un experimento que implicó tratamiento de semilla de haba de soja con puro V LCO (C18:1 MeFuc) un mes y un año antes siembra.

25 Las plantas de haba de soja (incluyendo raíces) fueron cosechadas diez días después de la siembra.
Resultados, que son descritos en términos de diferencias en la longitud de raíz y volumen, muestran que los métodos de la presente invención consiguen espectaculares aumentos en estas propiedades.

30 Finalmente, ejemplo 4 describe experimentos llevados a cabo con semilla de haba de soja tratada con Optimize® 55 días antes de siembra y para fines de comparación, semilla de haba de soja tratada 7 días antes de siembra y semilla no tratada.

Los resultados, expresados en unidades de área de superficie media de primeras hojas trifoliadas, muestran que la invención reivindicada mejora crecimiento de planta en este aspecto también.

Ejemplo 1

35 [0058] Una prueba de campo fue llevada a cabo para evaluar formas de realización de la presente invención en el rendimiento granular cuando aplicado en la semilla de haba de soja.

El sitio de prueba de campo fue situado cerca de Whitewater, WI y caracterizado por tierra arcillo-limosa Milford.

40 Sondeo del terreno, conducido seis meses antes de siembra, mostró un pH de tierra de 6.8, un contenido de materia orgánica de 5,3%, y fósforo y contenido de potasio de 39 ppm y 139 ppm, respectivamente.

[0059] Las moléculas de señal de planta usadas en la prueba fueron Optimize®, un grado no comercial de Optimize® (NI-50S-1), puro V LCO (C18:1 MeFuc)(NI-50GREN-1) y un grado no comercial de V LCO (C18:1, MeFuc) (NI-50S-2CF).

45 La semilla de haba de soja usada en el estudio fue Stine S2118.

Las moléculas de señal de planta fueron pulverizadas sobre semillas con/sin dilución a razón de 4,8 fl oz/cwt.

[0060] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de gráfico de 10 pies por 50 pies (0,011 acres), con espaciado de fila de 7,5 pulgadas.

50 Cuatro replicaciones fueron llevadas a cabo.

Las semilla fueron tratadas con las moléculas de señal de planta 4,5 o 5 meses antes de la siembra y justo antes de siembra, y fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada y a un índice de semilla de 225,000 semillas por acre usando un taladro granular John Deere 750 NT.

55 Los pesticidas Extreme® y AMPS® fueron ambos aplicado 11 (pre-emergencia) días antes de la siembra a índices de 3,0 pt y 2,5 lb, respectivamente.

Assure II®, Roundup WeatherMax® y AMPS® fueron todos aplicados 46 días post-siembra (post-emergencia), a índices de 6,0 oz, 21 oz y 2,5 lb, respectivamente.

Las plantas fueron cosechadas 4 meses y 20 días después de la siembra.

60 [0061] La semilla de control fue tratada con una cantidad (en peso) de agua, que corresponde con la cantidad (en peso) de la composición de molécula de señal experimental (molécula de señal + portador).

La semilla de control fue almacenada bajo las mismas condiciones que la semilla experimental antes de siembra y plantado a la vez que la semilla experimental en la misma tierra.

65 [0062] Resultados del estudio se muestran en la tabla 1 por debajo.

Tabla 1

	GRUPO DE TRATAMIENTO	RENDIMIENTO DE GRANO @ 13%
1	Control - no inoculado	62,5
2	Optimize - en la siembra	64,2
3	Optimize - 5 mes	65,7
4	NI-50GREN-1 - en la siembra	62,2
5	NI-50GREN-1 - 5 mes	70,5
6	NI-50S-1 - 4,5 mes	67,2
7	NI-50S-2CF - 4,5 mes	69,6

[0063] Como reflejado por la comparación entre grupo (no inventivo) comparativo 2 y grupo inventivo 3, tratamiento de la semilla de haba de soja con el Optimize® de grado comercial 5 meses antes de la siembra resultó en un aumento en el rendimiento de haba de soja de 1,5 bushel de haba de soja.

Como reflejado por la comparación entre grupo 4 y grupo inventivo 5, tratamiento de semilla de haba de soja a 5 meses antes de la siembra con puro V LCO (C18:1 MeFuc) resultó solo en un aumento en el rendimiento de haba de soja de 8,3 bushel/acre.

Como reflejado por la comparación entre grupo 2 y grupo inventivo 6, el tratamiento de semillas de haba de soja 4,5 meses antes de siembra con la calidad no comercial de Optimize® resultó en un aumento en el rendimiento de haba de soja de 3,0 bushel/acre.

Finalmente, como se muestra por la comparación entre grupo 4 y grupo inventivo 7, tratamiento de semillas de haba de soja con grado no comercial de V LCO (C18:1 MeFuc) solo 4,5 meses antes de la siembra aumentó rendimiento de haba de soja en 7,4 bushel/acre.

Mediciones de rendimiento granular se tomaron a un 13% de nivel de humedad de semilla.

Ejemplo 2

[0064] Una prueba de haba de soja fue conducida para evaluar formas de realización de la presente invención en el rendimiento granular cuando aplicada en la semilla de haba de soja.

El sitio de prueba de campo fue situado cerca de Whitewater, WI y caracterizado por tierra arcillo-limosa Milford.

Sondeo del terreno, realizado seis meses antes de siembra, mostró un pH de tierra de 6.6, un contenido de materia orgánica de 4.8%, y fósforo y contenido de potasio de 41 ppm y 131 ppm, respectivamente.

[0065] Las moléculas de señal de planta usadas en la prueba fueron las mismas que en el ejemplo 1.

La semilla de haba de soja usada en el estudio fue Stine S2118.

Las moléculas de señal de planta fueron pulverizadas sobre semillas con/sin dilución a razón de 4.8 fl oz/cwt.

[0066] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de gráfico de 10 pies por 50 pies (0,011 acres), con 7,5 pulgadas de espaciado de fila.

Cuatro replicaciones fueron llevadas a cabo.

Las semilla fueron tratadas con las moléculas de señal de planta 4,5 o 5 meses antes de siembra y justo antes de siembra, y fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada y a un índice de semilla de 225.000 semillas por acre usando un taladro granular John Deere 750 NT.

Los pesticidas Extreme® y AMPS® fueron ambos aplicados 10 días antes (pre-emergencia) de siembra a índices de 3,0 pt y 2,5 lb, respectivamente.

Assure II®, Roundup WeatherMax® y AMPS® fueron todos aplicados 45 días post-siembra (post-emergencia), a índices de 6,0 oz, 21 oz y 2,5 lb, respectivamente.

Las planta fueron cosechadas 4 meses y 21 días después de la siembra.

[0067] La semilla de control fue tratada con una cantidad (en peso) de agua, que corresponde con la cantidad (en peso) de la composición de molécula de señal experimental (molécula de señal + portador).

La semilla de control fue almacenada bajo las mismas condiciones que la semilla experimental antes de siembra y plantada a la vez que la semilla experimental en la misma tierra.

[0068] Resultados del estudio se muestran en la tabla 2 por debajo.

Tabla 2

	GRUPO DE TRATAMIENTO	RENDIMIENTO DE GRANO @ 13%
1	Control - no inoculado	62,4
2	Optimize - en la siembra	64,1
3	Optimize - 5 mes	68,6
4	NI-50GREN-1 - en la siembra	65,8
5	NI-50GREN-1 - 5 mes	64,0
6	NI-50S-1 - 4,5 mes	69,4
7	NI-50S-2CF - 4,5 mes	66,6

[0069] Como reflejado por la comparación entre grupo (no inventivo) comparativo 2 y grupo inventivo 3, el tratamiento de la semilla de haba de soja con el Optimize® de grado comercial 5 meses antes de la siembra resultó en un aumento en el rendimiento de haba de soja de 4,5 bushel de haba de soja.

Como reflejado por la comparación entre grupo 2 y grupo inventivo 6, el tratamiento de las semillas de haba de soja 4,5 meses antes de siembra con la calidad no comercial de Optimize® resultó en un aumento en el rendimiento de haba de soja de 5,3 bushel/acre.

Como se muestra por la comparación entre grupo 4 y grupo inventivo 7, el tratamiento de semillas de haba de soja con grado no comercial de V LCO (C18:1 MeFuc) solo 4,5 meses antes de la siembra aumentó el rendimiento de haba de soja en 0,8 bushel/acre.

La respuesta solo negativa como reflejada por la comparación entre grupo no inventivo 4 y grupo inventivo 5, mostró que tratamiento de semilla de haba de soja a 5 meses antes de la siembra con el LCO solo puro resultó en una reducción en 1,8 bushel/acre, un resultado atribuible para variabilidad inexplicada asociada a ensayos de campo. Mediciones de rendimiento granular se tomaron a un nivel de 13% humedad de semilla.

Experimentos de invernadero

Ejemplo 3

[0070] Semillas de haba de soja tratadas con 10^{-7} M puro V LCO (C18:1 MeFuc) y almacenadas a 15°C.

Semillas tratadas y semillas no tratadas (control) fueron plantadas 1 y 12 meses después del tratamiento en las macetas de invernadero que contienen arena:perlita (1:1 mezcla).

Plantones fueron cultivados durante 10 días tras las plantaciones de semilla, luego los plantones fueron cosechados, sus raíces limpiadas y medidas en el escáner de Winrhizo®.

La semilla de control fue tratada con una cantidad (en peso) de agua, que corresponde con la cantidad (en peso) de la composición de molécula de señal experimental (molécula de señal + portador).

La semilla de control fue almacenada bajo las mismas condiciones que la semilla experimental antes de siembra y plantada a medida que la semilla experimental en la misma tierra.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Tratamiento	1 mes después del tratamiento		1 año después del tratamiento	
	Longitud de raíz (cm)	volumen de raíz (cm ³)	longitud de raíz (cm)	volumen de raíz (cm ³)
Control	128	0,455	115,5	0,403
LCO	135*	0,468	159,3*	0,540*
% aumento	5,46	2,86	37,92	34

[0071] Los resultados conseguidos por ambas formas de realización inventivas (semilla tratada con LCO a 1 mes y 12 meses antes de siembra), y particularmente los resultados obtenidos después del pretratamiento de 1-año, son espectaculares, considerando que se conoce en la técnica que semilla de haba de soja son propensas a desmedrar durante esa longitud de tiempo.

Ejemplo 4

[0072] Semillas de haba de soja tratadas con Optimize® fueron mantenidas a 15°C en un frigorífico.

Semillas fueron plantadas 7 (7 dpp) y 55 (55dpp) días después del tratamiento en las cajas de raíz con una mezcla turba:perlita.

Su área de superficie de hoja (cm²) se tomó desde el primer trifoliado después de 19 días.

Como ilustrado en Fig. 3 y mostrado en la tabla 4, las hojas generadas de semilla tratada conforme a la presente invención tienen un 50% aumento medio superior en el área de superficie de hoja en comparación con la forma de realización no inventiva (42% contra 28%).

5

Tabla 4

	Medio	STDEV	Respuesta	Respuesta%
medio UTC	146,25	18,7539		
medio 7dpp	187,05	29,8215	40,81	28%
medio 55dpp	207,18	20,5278	60,93	42%

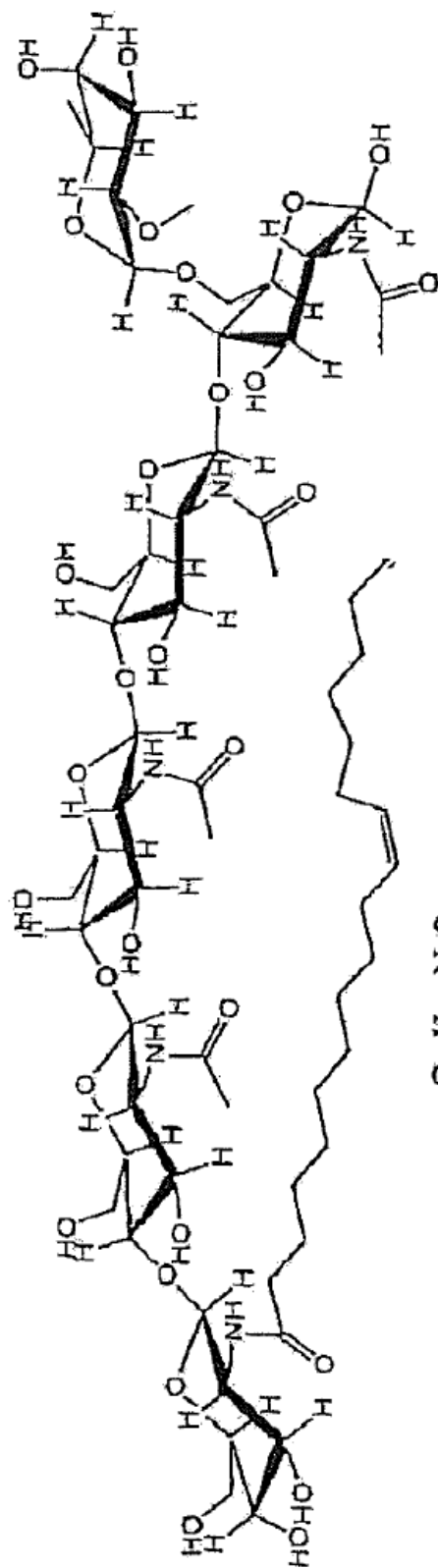
[0073] Al ser conocido que la cuenta bacteriana (*Bradyrhizobium japonicum*) de semilla disminuye a lo largo del tiempo, el aumento en el área de superficie media mostrado en plantas generadas de semilla tratada 55 días antes de siembra puede ser atribuible al LCO rizobial.

10

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar el crecimiento de la planta, que comprende tratar la semilla al menos un mes antes de la siembra con una cantidad eficaz de una molécula de señal de planta, donde la molécula de señal de planta es un lipo-quitoooligosacárido (LCO).
5
2. Método según la reivindicación 1, donde el LCO se obtiene de una especie de Rhizobia seleccionada de *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Sinorhizobium sp.* y *Azorhizobium sp.*
- 10 3. Método según la reivindicación 1, donde el LCO se obtiene de *Bradyrhizobium japonicum*.
4. Método según la reivindicación 1, donde el LCO se obtiene de un hongo micorrizal arbuscular.
- 15 5. Método según la reivindicación 1, donde la molécula de señal de planta se aplica en forma de una composición de tratamiento de semilla que comprende la molécula de señal y un portador agrícola aceptable.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla es leguminosa.
- 20 7. Método según la reivindicación 6, donde la semilla leguminosa es haba de soja.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla no leguminosa es maíz.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla no leguminosa es una semilla de planta de cultivo vegetal.
25
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende la pulverización sobre la semilla de una composición que comprende la molécula de señal de planta.
- 30 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende el riego por goteo de la semilla con una composición que comprende la molécula de señal de planta.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla se trata con la molécula de señal de planta al menos 3 meses antes de la siembra.
- 35 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla se trata con la molécula de señal de planta al menos 6 meses antes de la siembra.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla se trata con la molécula de señal de planta al menos 9 meses antes de la siembra.
40
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla se trata con la molécula de señal de planta al menos 12 meses antes de la siembra.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la semilla se trata con la molécula de señal de planta al menos 2 años antes de la siembra.
45
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde como resultado del tratamiento la molécula de señal de planta permanece como una cubierta sobre la semilla.

LCO-V(C18:1, MeFuc)



$C_{63}H_{109}N_5O_{70}$

Masa exacta: 1415,72

Peso mol.: 1416,56

C, 53,42; H, 7,76; N, 4,94; O, 33,88

FIG.1

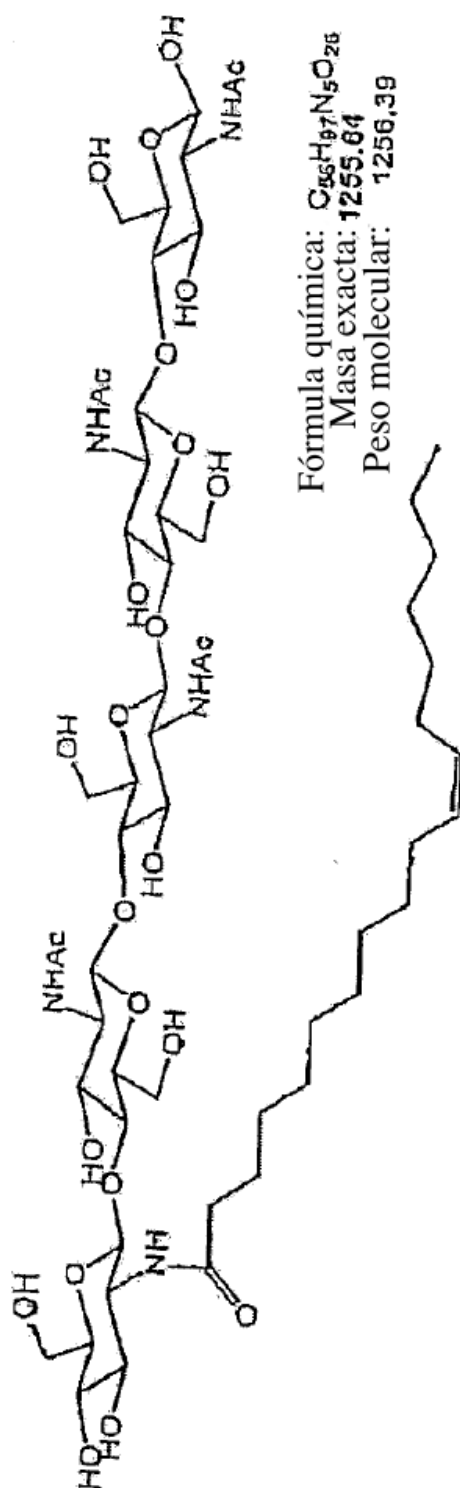


FIG. 2

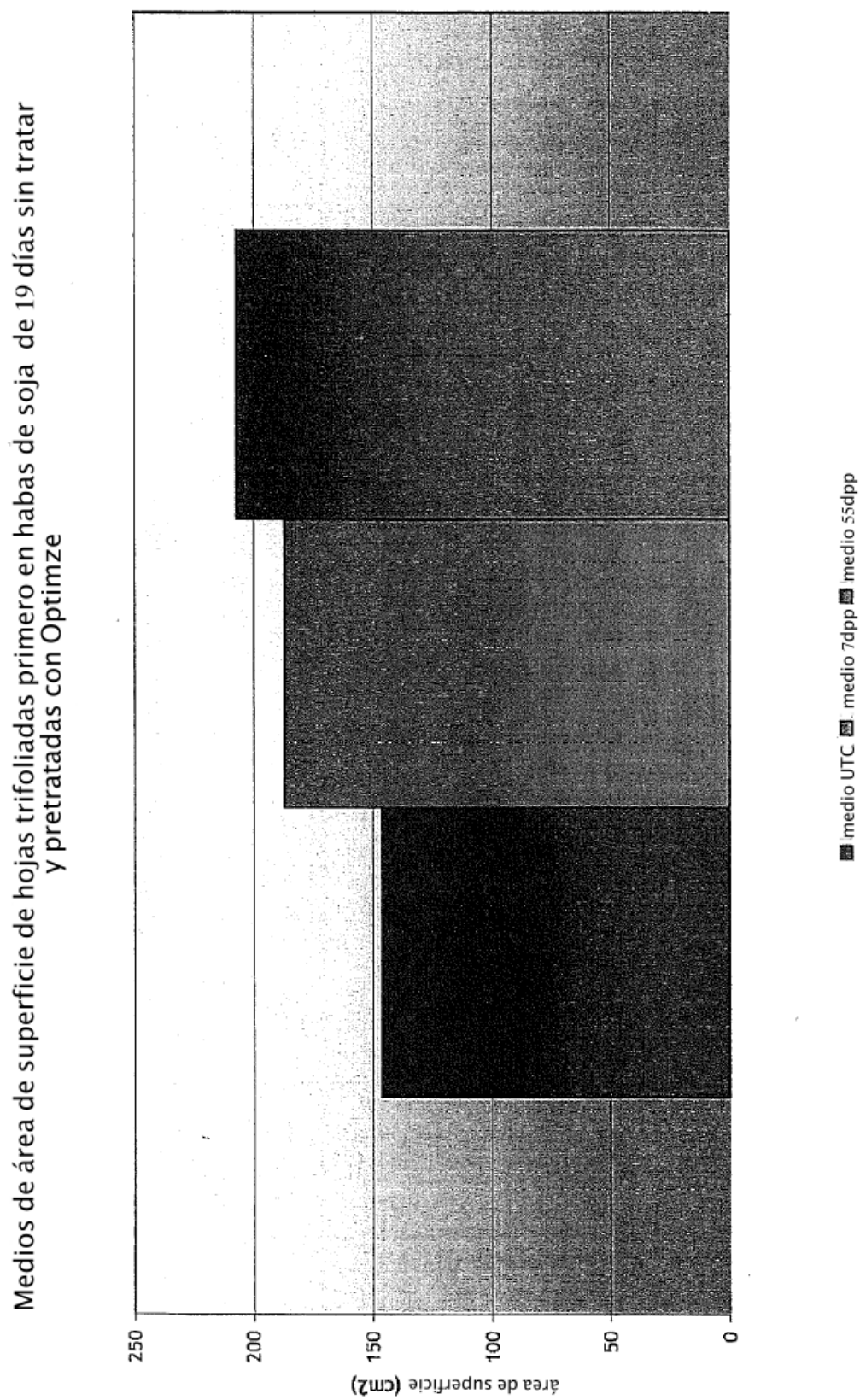


Fig.3