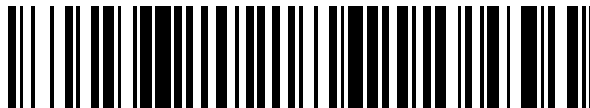


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 356**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)
A01N 57/20	(2006.01)
A01N 41/10	(2006.01)
A01N 47/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2008 PCT/US2008/000235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08085958**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2008 E 08705508 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2101583**

54 Título: **Composiciones combinadas de lipo-quitoooligosacáridos para un crecimiento y rendimiento mejorado de plantas**

30 Prioridad:

09.01.2007 US 879436 P
16.10.2007 US 980287 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES BIOLOGICALS HOLDING A/S
(100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

SMITH, RAYMOND, STEWART y
OSBURN, ROBERT, MARTIN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 602 356 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

Composiciones combinadas de lipo-quitooligosacáridos para un crecimiento y rendimiento mejorado de plantas

5 Antecedentes de la invención

[0001] La fijación de nitrógeno juega un papel vital en la producción agrícola haciendo disponible el nitrógeno atmosférico en una forma que se puede usar por las plantas.

10 En plantas de la familia Leguminosae, la interacción simbiótica entre las plantas y bacterias de fijación de nitrógeno de la familia Rhizobiaceae ("rizobios") mejora el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos.

La interacción simbiótica se inicia cuando una planta libera compuestos flavonoides que estimulan bacterias rizobiales en el suelo para producir "factores Nod." Factores Nod son compuestos de señalización que inducen las etapas tempranas de nodulación en las raíces de la planta, que conducen a la formación de nódulos de raíces que contienen las bacterias rizobiales de fijación de nitrógeno.

15 Aunque este proceso ocurre naturalmente a lo largo del tiempo en legumbres, los procedimientos agrícolas han sido desarrollados para iniciar el proceso anteriormente.

Estos procedimientos incluyen la provisión de bacterias de fijación de nitrógeno a semillas o suelo y aplicación de factores Nod directamente a semillas o suelo antes de o en la siembra.

20 [0002] Factores Nod han mostrado recientemente que también mejoran la germinación, crecimiento y rendimiento de legumbres y no legumbres a través de procesos distintos de la nodulación (US6,979,664 Prithivaraj et al., Planta 216: 437-445,2003).

25 Aunque los efectos de factores Nod en la nodulación han sido muy estudiados y revisados, por ejemplo, Ferguson y Mathesius, J. Plant Growth Regulation 22: 47-72, 2003, los mecanismos para los efectos del factor Nod independientes de la nodulación no son bien entendidos.

La aplicación de factores Nod a semillas de legumbres y no legumbres estimula la germinación, emergencia de semillas, crecimiento de plantas y rendimiento en cultivos y especies de plantas hortícolas, por ejemplo, como se describe en US6,979,664 y US5,922,316.

30 Factores Nod también han mostrado que mejoran el desarrollo de raíces (Olah, et al., The Plant Journal 44:195-207, 2005).

La aplicación foliar de factores Nod también ha demostrado que aumenta la fotosíntesis (US7,250,068), y fructificación y floración (WO 04/093,542) en los cultivos y especies de plantas hortícolas.

[0003] Factores Nod son compuestos de lipo-quitooligosacáridos (LCO).

35 Ellos consisten en una estructura oligomérica de residuos N-acetil-D-glucosamina β -1,4-enlazados ("GlcNAc") con una cadena de acilo graso N-enlazada en el extremo no reductor.

LCO difieren en el número de residuos GlcNAc en la estructura, en la longitud y grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar reductores y no reductores.

40 La estructura LCO es característica para cada especie rizobial, y cada cepa puede producir LCO múltiples con estructuras diferentes.

LCO son los determinantes primarios de especificidad de huésped en la simbiosis de legumbre (Diaz, Spaink, y Kijne, Mol. Plant-Microbe Interactions 13: 268-276,2000).

45 [0004] Síntesis de LCO se puede estimular añadiendo el flavonoide apropiado, para un género dado y especies de rhizobium durante el crecimiento de las bacterias.

Las moléculas flavonoides enlazan con el rhizobium y activan los genes bacterianos para la producción de LCO específicos que se liberan en el medio de fermentación.

En la naturaleza, las plantas leguminosas liberan el flavonoide apropiado, que se enlaza a rizobios del suelo, activando los genes para producción de LCO.

50 Estos LCO se liberan por bacterias en el suelo, se enlazan con las raíces de plantas leguminosas, e inician una cascada de expresión génica de plantas que estimula la formación de las estructuras de nódulos de fijación de nitrógeno en las raíces de las legumbres.

Alternativamente, las moléculas de LCO modificadas y sintéticas se pueden producir a través de ingeniería genética o síntesis química.

55 LCO sintéticos de la misma estructura molecular interactúan con plantas y estimulan la nodulación de la misma manera que las moléculas naturales.

[0005] Quitinas y quitosanos, que son componentes mayores de las paredes celulares de hongos y los exoesqueletos de insectos y crustáceos, están también compuestos por residuos de GlcNAc.

60 Estas composiciones han sido aplicadas a semillas, raíces, o follaje de un amplio espectro de plantas de cultivo y hortícolas.

Quitina y composiciones de quitosano mejoran la protección contra los patógenos de plantas, en parte, estimulando las plantas para producir quitinasas, enzimas que degradan la quitina (Collinge, et al., The Plant Journal 3: 31-40, 1993).

65

[0006] Flavonoides son compuestos fenólicos teniendo la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos.

Flavonoides son producidos por plantas y tienen muchas funciones, por ejemplo, como moléculas de señalización beneficiosas, y como protección contra los insectos, animales, hongos y bacterias.

5 Clases de flavonoides incluyen chalconas, antocianidinas, cumarinas, flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas, e isoflavonas. (Jain y Nainawatee, J. Plant Biochem. & biotecnol. 11: 1-10,2002; Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11: 1867-1880, 2006.)

RESUMEN DE LA INVENCION

10 [0007] La invención incluye métodos y composiciones para aumentar el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos.

Una composición ejemplar comprende al menos un lipo-quitooligosacárido y al menos un compuesto quitinoso.

15 Un método ejemplar comprende la administración de una composición según la invención a una planta o semilla en una cantidad eficaz para aumentar el crecimiento de las plantas o el rendimiento de las plantas de cultivo.

En otra forma de realización, el método comprende consecutivamente tratar una planta o una semilla con al menos un lipo-quitooligosacárido y al menos un compuesto quitinoso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 [0008] La invención proporciona composiciones y métodos para mejorar el crecimiento de las plantas y rendimiento de los cultivos, tal y como se define por reivindicaciones 1 - 20, y surge de los resultados de experimentos, proporcionados aquí, que revelan efectos mejorados de lipo-quitooligosacárido en combinación con quitina/quitosano, compuestos flavonoides, o compuestos herbicidas en el crecimiento de las plantas y rendimiento de las plantas de cultivo cuando se aplican a semillas y/o follaje.

30 [0009] Para los fines de esta invención, un "lipo-quitooligosacárido" ("LCO") es un compuesto con la estructura LCO general, es decir, una estructura oligomérica de residuos de N-acetil-D-glucosamina β -1,4-enlazados con una cadena de acilo graso N-enlazado en el extremo no reductor, como se describe en EEUU Pat n° 5,549,718; EEUU Pat n° 5,646,018; EEUU Pat n° 5,175,149; y EEUU Pat n° 5,321,011.

Esta estructura básica puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en LCO de origen natural, tales como las descritas en Spaink, Critical Reviews in Plant Sciences 54: 257-288, 2000; D'Haese and Holsters, Glycobiology 12: 79R-105R, 2002.

35 También comprendidos por la invención son compuestos de LCO sintéticos, tales como los descritos en WO2005/063784, y LCO producidos a través de ingeniería genética.

Moléculas de oligosacáridos precursoras para la construcción de LCOs también se pueden sintetizar por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como en Samain et al., Carbohydrate Research 302: 35-42, 1997.

40 [0010] LCO usados en formas de realización de la invención se pueden recuperar de *Rhizobiaceae* 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.

Estos métodos se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de EEUU Nos. 5,549,718 y 5,646,018.

45 Productos comerciales que contienen LCO están disponibles, tal como OPTIMIZE® (EMD Crop BioScience).

[0011] LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o con rizobios.

50 Métodos para proporcionar solo LCO incluyen sencillamente eliminar las células rizobiales de una mezcla de LCO y rizobios, o continuar aislando y purificando las moléculas LCO a través de la separación de fase de solvente de LCO seguido de cromatografía de HPLC como se describe por Lerouge, et.al (US 5,549,718).

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

Este método es aceptable para la producción de LCO de todos los géneros y especies de *Rhizobiaceae*.

55 [0012] En la familia de las legumbres, géneros y especies específicos de rizobio desarrollan una relación de fijación de nitrógeno simbiótica con un huésped de legumbre específico.

Estas combinaciones de huéspedes:rizobios de plantas están descritas en Hungría y Stacey, Soil Biol. Biochem. 29: 819-830, 1997, que también enumeran los inductores eficaces de genes Nod de flavonoides de las especies rizobiales, y las estructuras LCO específicas que se producen por las especies rizobiales diferentes.

60 Sin embargo, la especificidad de LCO solo se requiere para establecer nodulación en leguminosas.

No es necesario vincular LCO y especies de plantas para estimular el crecimiento de las plantas y/o el rendimiento de los cultivos cuando las semillas de tratamiento o follaje de una legumbre o sin legumbre con LCO.

65 [0013] Compuestos quitinosos incluyen quitina, (IUPAC: N-[5-[[[3-acetilamino-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-

is]etanamida), y quitosano, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-2(hidroximetil)oxane-3,4-diol).

Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, u obtener a partir de insectos, conchas de crustáceos, o paredes de células fúngicas.

5 Métodos para la preparación de quitina y quitosano se conocen en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EEUU

Nº 4,536,207 (preparación a partir de conchas de crustáceo), Pochanavanich y Suntornsuk, Lett. Appl. Microbiol. 35: 17-21,2002 (preparación a partir de paredes de células fúngicas), y patente de EEUU Nº 5,965,545 (preparación a partir conchas de cangrejo e hidrólisis de quitosano comercial).

10 Quitinas desacetiladas y quitosanos se pueden obtener que varían de menos de 35% a más de 90% desacetilación, y cubren un amplio espectro de pesos moleculares, por ejemplo, oligómeros de quitosano de bajo peso molecular inferior a 15kD y oligómeros de quitina de 0,5 a 2kD; quitosano de "grado práctico" con un peso molecular de aproximadamente 150kD; y quitosano de peso molecular alto de hasta 700kD.

15 Quitina y composiciones de quitosano formuladas para el tratamiento de plantas y de suelos están disponibles comercialmente también.

Productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA®-4PDB (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

[0014] LCO y quitinas/quitosanos están estructuralmente relacionados.

20 Quitina y quitosano pueden estimular la producción de quitinasas por plantas, y se ha demostrado que quitinasas de plantas pueden inactivar y degradar LCO al igual que compuestos quitinosos (Stahelin, et al., P.N.A.S. EE.UU 91: 2196-2200,1994; Ferguson y Mathesius, J. Plant Growth Regulation 22: 47-72, 2003)).

Además, formulaciones de quitosano disponibles comercialmente frecuentemente contienen metales pesados que son tóxicos para las bacterias rizobiales y así previenen la producción de LCO.

25 Por estas razones, el uso de bacterias rizobiales en combinación con quitinas/quitosanos fue contraindicado previamente.

Sin embargo, como se muestra en los ejemplos a continuación, está ahora demostrado que la aplicación de un compuesto de LCO y quitina/quitosano, bien consecutivamente o simultáneamente, a una planta o semilla induce respuestas beneficiosas en el crecimiento y rendimiento de la planta.

30 Mientras el mecanismo para este efecto no está demostrado, una hipótesis es que los compuestos de LCO enlazan con receptores específicos en la planta o semilla e inician estas respuestas beneficiosas antes de que la degradación de LCO por quitinasas pueda ocurrir.

Además, este método de tratamiento nuevo evita los efectos de metales pesados en la producción de LCO por bacterias rizobiales.

35 [0015] En una forma de realización de la invención, la composición se puede preparar mediante la mezcla de quitosano, y uno o varios LCO en un solvente apropiado agrícola.

En una segunda forma de realización, la composición también puede contener quitina.

La concentración de quitosano puede variar de 0,1 a 15% p/v, preferiblemente de 3 a 12%.

40 La quitina se puede incluir a de 0 a 4% p/v.

La concentración de LCO puede variar de 10^{-5} M a 10^{-14} M, preferiblemente de 10^{-6} M a 10^{-10} M.

El componente de LCO puede consistir en LCO purificado o parcialmente purificado, o una mezcla de LCO y los rizobios que produjo el LCO.

El solvente apropiado agrícola es preferiblemente un solvente acuoso, tal como agua.

45 [0016] El término "planta" como se utiliza en este caso incluye tubérculos, raíces, tallos, hojas, flores, y frutas.

La composición se puede aplicar directamente para semillas o plantas o se puede colocar en el suelo en la proximidad de una semilla o planta antes de o durante la siembra.

En una forma de realización preferida, la composición se pulveriza en semillas, tubérculos, o follaje.

50 Semillas, al igual que plantas más maduras, pueden ser tratadas.

Flores y frutas también se pueden tratar por pulverización.

Raíces de trasplantes se pueden pulverizar o sumergir en la composición antes de la plantación.

55 [0017] Una "cantidad" eficaz de la composición es una cantidad que aumenta el crecimiento de la planta o el rendimiento del cultivo cuando se compara con el crecimiento o rendimiento del cultivo de plantas o semillas que no han sido tratadas con la composición.

[0018] La composición se puede aplicar a plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, y a legumbres y sin legumbres.

60 En una forma de realización, la composición se aplica a plantas crecidas en el campo.

En otra forma de realización, la composición se aplica a plantas crecidas en invernadero.

Por ejemplo, la composición se puede aplicar a semillas o follaje de leguminosas, tales como semillas de soja, guisantes, garbanzos, alubias secas, cacahuetes, trébol, alfalfa, y de sin legumbres tales como maíz, algodón, arroz, tomates, canola, trigo, cebada, remolacha azucarera, y hierba.

65 En general, para el tratamiento de semilla, la composición se aplica a semillas en una aplicación única, y las semillas se pueden plantar inmediatamente o almacenar antes de la siembra.

La composición se puede aplicar al follaje.

La aplicación foliar generalmente consiste en pulverización de la composición en el follaje de planta una o más veces durante el periodo de crecimiento.

5 **EJEMPLOS**

1. Tratamiento foliar de semilla de soja (Northrup King S24-k4) con LCO + quitina/quitosano

10 [0019] Un ensayo de campo de semilla de soja fue conducido para evaluar los efectos de un LCO y dos productos de quitosano comercial en el rendimiento granular cuando se aplican al follaje solo o en combinación.

Los dos productos de quitosano comercial utilizados en el ensayo fueron BEYOND™ (Agri-House Inc., 307 Welch Ave, Berthoud, CO), and ELEXA®-4PDB (Plant Defense Boosters, 235 Harrison St, Syracuse, NY).

15 La concentración de quitina/quitosano exacta en BEYOND™ es desconocida, pero se estima que está en la gama de 6-12% p/v de quitosano y 0-3% p/v de quitina, basado en la Patente de EEUU N° 6,193,988. La concentración de quitosano en ELEXA®-4PDB es 4% p/v.

ELEXA®-4PDB no contiene quitina.

La concentración de quitosano en ELEXA®-4PDB es 4% p/v.

20 El producto LCO fue producido por Rhizobium leguminosarum bv viceae y contenía aproximadamente 1×10^{-8} M LCO.

El ensayo de campo fue situado cerca de Whitewater, WI en un sitio caracterizado por suelos lodosos, arcillosos y limosos de Milford.

El suelo tenía un pH de 6.6, un contenido de materia orgánica de 4.8%, y contenido de fósforo y de potasio de 41 ppm y 131 ppm, respectivamente.

25 [0020] La semilla de soja usada en el estudio fue de la variedad Northrup King S24-K4.

El tratamiento de LCO se aplicó pulverizando sobre el follaje en la fase de crecimiento V4 (ver Soybean Growth and Development, Iowa State University Extension Bulletin PM 1945, Mayo 2004), a razón de 1 cuarto de galón/acre en 25 galones de agua. (= 2,34 l/ha en 94,6 litros).

BEYOND™ fue diluido a una concentración de 0,132% p/v y ELEXA®-4PDB a 2,5% p/v en el agua.

30 Cada producto se aplicó pulverizando sobre follaje a razón de 1 cuarto de galón/acre en 25 galones de agua.

Cuando la combinación de LCO-quitina/quitosano fue aplicada, las mismas concentraciones de LCO y productos de quitina/quitosano fueron usados como cuando cada producto fue aplicado solo.

35 [0021] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies, y un espaciado de filas de 30 pulgadas.

Cuatro replicaciones fueron realizadas.

Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada y un índice de siembra de 175.000 semillas por acre utilizando un taladro granular John Deere 750 NT.

40 [0022] Resultados de este estudio se muestran en la tabla 1.

Los productos LCO BEYOND™, y ELEXA®-4PDB cada uno aumentaron el rendimiento de grano significativamente por 3,5, 6,6, y 5,0 bu/acre, respectivamente, cuando se aplican al follaje como tratamientos autónomos ($p = 0,1$). (para semilla de soja 1 bu/acre es equivalente con 67,3 kg/ha.)

45 [0023] La aplicación de ELEXA®-4PDB en combinación con LCO aumentó estadísticamente el rendimiento por 6,2 bu/acre sobre LCO solo y 4.7 bu/acre sobre ELEXA®-4PDB solo.

La aplicación de BEYOND™ en combinación con LCO aumentó estadísticamente el rendimiento por 5,3 bu/acre sobre solo LCO, y aumentó numéricamente el rendimiento por 2,2 bu/acre sobre BEYOND™ solo.

50 [0024] Tratamiento con LCO + ELEXA®-4PDB rendimiento aumentado en comparación con el control por 9,7 bu/acre, mostrando un efecto sinérgico inesperado de la combinación comparado con LCO o tratamiento de ELEXA®-4PDB solo.

TABLA 1

(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	56,2
LCO	59,7
BEYOND™	62,8
ELEXA®-4PDB4 PDB	61,2
LCO + BEYOND™	65,0
LCO + ELEXA®-4PDB	65,9
Probabilidad%	<0,1
LSD 10%	2,6
CV%	3,5

55

2. Tratamiento foliar de semilla de soja (Dairyland DSR 2300SR) con LCO + quitosano

[0025] Un ensayo en campo de semillas de soja fue conducido para evaluar los efectos de un LCO y un producto de quitosano comercial en el rendimiento granular cuando se aplica al follaje solo o en combinación.

El producto LCO fue el mismo que el que se usó en el Ejemplo 1.

5 El producto de quitosano comercial utilizado en el ensayo fue ELEXA®-4PDB.

El ensayo de campo fue situado cerca de Whitewater, WI en un sitio caracterizado por el suelo lodoso, arcilloso y limoso de Milford.

El suelo tuvo un pH de 6.8, un contenido de materia orgánica de 4,8%, y fósforo y contenido de potasio de 46 ppm y 144 ppm, respectivamente.

10 [0026] La semilla de soja usada en el estudio fue de la variedad Dairyland DSR 2300RR.

El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies (= 3 m por 15,2 m) y un espaciado de filas de 15 pulgadas (= 76 cm).

Cuatro repeticiones fueron realizadas.

15 Semillas fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada (= 2,5 cm) a un índice de siembra de 185.000 semillas por acre (= 462.500 semillas/HA), utilizando un taladro granular John Deere 750 NT.

[0027] Ambos tratamientos de LCO y ELEXA®-4PDB fueron aplicados pulverizando sobre follaje en la fase de crecimiento V4 (ver Soybean Growth and Development, Iowa State University Extension Bulletin PM 1945, Mayo 2004), a razón de 1 cuarto de galón/acre en 25 galones de agua (= 2,34 l/ha en 94,6 litro) utilizando un pulverizador de terreno de International Harvester Cub a una velocidad respecto al suelo de 2,5 mph. (= 4 kmh).

Cuando la combinación de LCO-quitosano se aplicó, las mismas concentraciones de LCO y productos de quitosano fueron usadas como cuando cada producto fue aplicado solo.

25 [0028] Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 2.

El LCO y productos de ELEXA®-4PDB aumentaron numéricamente la producción de granos por 1,7 y 0,6 bu/acre, respectivamente, cuando se aplicaron a follaje como tratamientos autónomos (p = 0,1). La aplicación de ELEXA®-4PDB en combinación con LCO aumentó numéricamente la producción por 0,8 bu/acre sobre LCO solo y 1.9 bu/acre sobre ELEXA®-4PDB solo.

30 El aumento de 2,5 bu/acre con el LCO y ELEXA®-4PDB combinado excedió el beneficio combinado de los productos individuales solo, mostrando un efecto sinérgico inesperado de la combinación.

TABLA 2

Tratamiento	Tratamiento
(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)	
Control - no tratado	63,2
LCO	64,9
ELEXA®-4PDB4 PDB	63,8
LCO + ELEXA®-4PDB	65,7
Probabilidad%	<0,1
LSD 10%	3,9
CV%	5,3

3. Tratamiento de semillas de soja (Dairyland DSR 234RR) con LCO + quitina/quitosano

35 [0029] Un ensayo en campo de semillas de soja fue conducido para evaluar el efecto de un LCO y dos productos de quitina/quitosano comerciales diferentes en el rendimiento granular cuando se aplicaron en la semilla bien solo o en combinación.

El sitio de ensayo en el campo fue situado cerca de Whitewater, WI y caracterizado por el suelo lodoso, arcilloso y limoso de Milford.

40 Sondeo del terreno mostró un pH de suelo de 6.8, un contenido de materia orgánica de 5,1%, y contenido de fósforo y de potasio de 37 ppm y 136 ppm, respectivamente.

[0030] El producto de LCO usado en el ensayo (OPTIMIZE®, EMD Crop BioScience) fue producido por Bradyrhizobium japonicum y contenía aproximadamente 1×10^{-9} M LCO.

Los dos productos de quitosano comercial utilizados en el ensayo fueron iguales que aquellos usados en el Ejemplo 1.

La semilla de soja usada en el estudio fue Dairyland variedad DSR 234RR.

El producto LCO fue pulverizado sobre semillas sin dilución a razón de 4,25 fl oz/cwt. (= 125 ml/cwt).

50 [0031] BEYOND™ fue diluido hasta 0,132% p/v y ELEXA®-4PDB hasta 2,5% p/v con agua. Cada uno se aplicó en la semilla a razón de 4,25 fl oz/cwt. (= 125 ml/cwt). (1 Fl oz/cwt siendo equivalente con 29,4 ml/cwt).

Cuando la combinación de LCO-quitina/quitosano fue aplicada, las mismas concentraciones de LCO y productos de quitina/quitosano fueron usadas como cuando cada producto fue aplicado solo.

55 La composición combinada fue aplicada a 4,25 fl oz/cwt. (= 125 ml/cwt).

[0032] 25 El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies, (= 3 m por 15,2 m) espaciado de filas de 7,5 pulgadas (= 19 cm).

Cuatro replicaciones fueron conducidas.

5 Semillas fueron tratadas justo antes de la plantación y fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada y un índice de siembra de 225.000 semillas por acre (= 562.500 semillas por ha) utilizando un taladro granular John Deere 750 NT.

[0033] Los resultados del estudio se muestran en la tabla 3, a continuación.

10 El tratamiento de LCO aumentó numéricamente el rendimiento de grano por 2,0 bu/acre respecto al grupo de control no tratado ($p = 0,1$). Los productos de quitosano, BEYOND™ y ELEXA®-4PDB, cada uno proporcionó aumentos estadísticamente significativos de 2.5 y 3.4 bu/acre, respectivamente, sobre el grupo de control no tratado.

La combinación de LCO y BEYOND™ aumentó significativamente el rendimiento por 2,3 bu/acre respecto al tratamiento de LCO solo, y aumentó numéricamente el rendimiento por 1,8 bu/acre en comparación con el tratamiento de BEYOND™ solo.

15 El tratamiento con una combinación de LCO y ELEXA®-4PDB aumentó significativamente el rendimiento por 2.3 bu/acre en comparación con el tratamiento de LCO solo y aumentó numéricamente el rendimiento por 0,9 bu/acre con respecto al tratamiento de ELEXA®-4PDB solo.

Tabla 3

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)	
Control - no tratado	55,5
LCO	57,5
BEYOND™	58,0
ELEXA®-4PDB4 PDB	58,9
LCO + BEYOND™	59,8
LCO + ELEXA®-4PDB	59,8
Probabilidad%	9,6
LSD 10%	2,3
CV%	3,3

20

4. Tratamiento de semillas de maíz (Shur Grow SG-686-RR) con LCO + quitina/quitosano

[0034] Un ensayo en campo de maíz fue conducido para evaluar los efectos de un producto de quitosano comercial y LCO en el rendimiento granular cuando se aplicó en la semilla bien solo o en combinación.

25 El sitio de ensayo en campo fue situado cerca de Marysville, OH y caracterizado por el suelo areno-limoso Blount.

La evaluación del terreno mostró un pH del suelo de 6.2 y un contenido de materia orgánica de 2,7%. El campo fue cultivado en discos en la primavera antes de la plantación.

[0035] El producto de LCO usado en el ensayo fue el mismo que aquel usado en ejemplo 1.

30 El producto de quitosano comercial utilizado en el ensayo fue ELEXA®-4PDB.

[0036] La semilla de maíz usada en el estudio fue híbrido Shur Grow SG-686-RR.

La semilla fue comercialmente tratada con una combinación de Maxim XL (0,167 fl oz/cwt, Apron XL (0,32 fl oz/cwt) y Actellic (0,03 fl oz/cwt).

35 Cuando se usa solo, el producto LCO fue pulverizado en la semilla sin dilución a razón de 15 fl oz/cwt.

El índice de uso para el producto de quitosano fue 0,375 fl oz/cwt.

El producto fue diluido con agua y aplicado en la semilla a un índice de lodo de 15 fl oz/cwt.

Cuando se aplicó en combinación, el LCO se aplicó a 1/10th índice de 1,5 fl oz/cwt y el quitosano a razón de 0,375 fl oz/cwt.

40 Los productos combinados fueron diluidos con agua y aplicados en la semilla a un índice de lodo de 15 fl oz/cwt.

[0037] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con cuatro replicaciones y un tamaño de terreno de 10 pies por 20 (= 3 M. por 6,1 M.) y espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm.).

45 Las semillas fueron tratadas justo antes de la plantación y plantadas a una profundidad de 1,5 pulgadas (4 cm.) y un índice de siembra de 28,000 semillas por acre (= 70,000 semillas/HA).

[0038] Los resultados del estudio se muestran en la tabla 4.

50 Los tratamientos de LCO y quitosano aumentaron significativamente el rendimiento 18,6 y 16,9 bu/acre, respectivamente, respecto al grupo de control no tratado ($p = 0,1$). (para maíz 1 bu/acre es equivalente con 62,8 kg/ha.)

[0039] En cambio, el tratamiento combinado LCO + quitosano aumentó significativamente el rendimiento por 40.0 bu/acre.

55 Este aumento en el rendimiento fue significativamente mayor que los tratamientos individuales, y excedió el beneficio combinado de los tratamientos de LCO y de quitosano individuales.

Tabla 4

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	116,9
LCO	135,5
ELEXA®-4PDB4 PDB	133,8
LCO + ELEXA®-4PDB	156,9
Probabilidad%	0,0001
LSD 10%	9,3
CV%	5,3

5. Tratamiento de semilla de maíz (Dairyland DSR-8194) con LCO + quitina/quitosano

- 5 [0040] Un ensayo en campo de maíz fue conducido para evaluar los efectos del LCO con base en *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* y el dos productos de quitosano referenciados en el ejemplo 1 en el rendimiento granular cuando se aplicó en la semilla de maíz solo o en combinación.
El ensayo en campo fue conducido en una ubicación cerca de Whitewater, WI, caracterizado por suelo lodoso, arcilloso y modoso Milford.
- 10 El suelo tuvo un pH de 6.5, un contenido de materia orgánica de 4,5%, y contenido de fósforo y de potasio de 40 y 142 ppm, respectivamente.

[0041] Semilla de maíz YGPL Dairyland variedad DSR 8194 fue usada en el estudio.

El producto LCO se aplicó sin dilución en la semilla a razón de 15,3 fl oz/cwt.

- 15 BEYOND™ fue diluido a una concentración de 0,132% p/v y ELEXA®-4PDB 2,5% p/v con agua.

Cada uno se aplicó pulverizando en la semilla a razón de 15,3 fl oz/cwt.

Cuando la combinación de LCO-quitina/quitosano fue aplicada, las mismas concentraciones de LCO y productos de quitina/quitosano fueron usadas como cuando cada uno de estos productos fue aplicado solo.

- 20 [0042] El estudio fue conducido en un diseño de bloques completos aleatorizados, con un tamaño de terreno de 15 pies por 50 pies (= 4,6 m por 15,2 m) espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm).

Cuatro replicaciones fueron realizadas.

Semillas fueron tratadas justo antes de plantación y fueron plantadas a una profundidad de 2" (= 5 cm) a un índice de siembra de 33.000 semillas por acre (= 82.500 semillas/ha).

- 25 [0043] Semillas fueron plantadas con un plantador de maíz de 6 filas John Deere Max Emerge II NT.

Un fertilizante iniciador (7-21-7) se aplicó a razón de 200 lb/acre, (= 224 kg/ha) con una aplicación posterior de 160 unidades de nitrógeno como 28% de nitrógeno.

- 30 [0044] Los resultados se muestran en la tabla 5.

El tratamiento de LCO aumentó significativamente el rendimiento de grano por 4,6 bu/acre respecto al grupo de control no tratado ($p = 0,1$). Semillas tratadas con el producto de BEYOND™ solo mostraron un aumento de rendimiento numérico de 3,7 bu/acre, mientras tratamiento de semilla con ELEXA®-4PDB no mostró ningún efecto en el rendimiento granular.

- 35 Tratamiento combinado con LCO y BEYOND™ aumentó numéricamente el rendimiento de grano aume por 2,1 bu/acre sobre LCO solo y 3,0 bu/acre sobre BEYOND™ solo.

[0045] Tratamiento combinado con LCO y ELEXA®-4PDB aumentó significativamente el rendimiento de grano por 8,4 bu/acre comparado con el tratamiento de ELEXA®-4PDB solo, y aumentó el rendimiento de grano numéricamente por 3,7 bu/acre comparado con el tratamiento LCO solo.

- 40 La combinación de LCO y ELEXA®-4PDB aumentó el rendimiento a una extensión superior que los efectos aditivos del tratamiento de LCO o ELEXA®-4PDB solo, mostrando un efecto sinérgico del tratamiento combinado.

Tabla 5

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	162.1
LCO	166.7
BEYOND™	165.8
ELEXA®-4PDB4 PDB	162.0
LCO + BEYOND™	168.8
LCO + ELEXA®-4PDB	170.4
Probabilidad%	<0.1
LSD 10%	3.9
CV%	2.0

45

6. Tratamiento foliar de aíz (Jung 6573RR/YGPL) con LCO + quitina/quitosano

[0046] Un ensayo en campo de maíz fue conducido evaluando el efecto de LCO con base en *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* y los dos productos de quitosano descritos en Ejemplo 1 en el rendimiento granular cuando se aplicaron como una aplicación foliar sola o en combinación.

El ensayo en campo fue situado cerca de Whitewater, WI en un sitio con suelo lodoso, arcilloso y limoso Milford.

5 El suelo tuvo un pH de 6.5, y los resultados de la prueba de suelo mostró un contenido de materia orgánica de 4.5%, y contenido de fósforo y potasio de 40 y 142 ppm, respectivamente.

[0047] La semilla de maíz usada en el estudio fue variedad Jung 6573RR/YGPL.

10 El producto LCO se aplicó en el follaje en la fase de crecimiento V4 a razón de 1 cuarto de galón/acre en 25 galones de agua (= 2,34 l/ha en 94,6 litro).

[0048] BEYOND™ y ELEXA®-4PDB fueron diluidos en concentraciones de 0,132% p/v y 2,5%p/v, respectivamente, en agua y aplicados en el follaje a razón de 25 galones/acre. (= 233,8 l/ha).

15 [0049] Cuando la combinación de LCO-quitina/quitosano fue aplicada, las mismas concentraciones de LCO y productos de quitina/quitosano fueron usadas como cuando cada uno de estos productos fue aplicado solo.

[0050] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado con un tamaño de terreno de 15 pies por 50 pies (= 4,6 m por 15,2 m), espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm.) .

20 Cuatro replicaciones fueron realizadas.

Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm.) y un índice de siembra de 33.000 semillas por (= 82.500 semillas/ha) utilizando un plantador de maíz de 6 filas John Deere Max Emerge II NT.

El fertilizante iniciador (7-21-7) se aplicó a razón de 200 lb/acre, (= 224 kg/ha), con una aplicación posterior de 160 unidades de nitrógeno como 28% de nitrógeno.

25 [0051] Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 6.

Los productos LCO, BEYOND™, y ELEXA®-4PDB aumentaron significativamente el rendimiento de grano sobre el grupo de control no tratado por 11,3, 8,8, y 7,4 bu/acre, respectivamente, cuando se aplicaron al follaje como tratamientos autónomos (p = 0,1). Solicitud de ELEXA®-4PDB en combinación con LCO además aumentaron el rendimiento por 1.1 bu/acre comparado con ELEXA®-4PDB solo, y 5,0 bu/acre comparado con solo LCO.

30 Aplicación de BEYOND™ en combinación con LCO además aumentaron el rendimiento por 2,3 bu/acre comparado con LCO solo, y 4,8 bu/acre comparado con BEYOND™ solo.

Tabla 6

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	162,6
LCO	173,9
BEYOND™	171,4
ELEXA®-4PDB4 PDB	170,0
LCO + BEYOND™	176,2
LCO + ELEXA®-4PDB	175,0
Probabilidad%	0,3
LSD 10%	6,5
CV%	3,2

35 7. (No parte de las reivindicaciones)

Semilla de maíz (Pioneer 38H52) tratamiento con LCO + flavonoide

40 [0052] Un ensayo en campo de maíz fue conducido evaluando el efecto de formulaciones líquidas de LCO y flavonoide en el rendimiento granular cuando se aplica solo o en combinación en la semilla.

El ensayo en campo fue conducido en un sitio cerca de Whitewater, WI en un suelo lodoso, arcilloso y limoso Plano.

El suelo tuvo un pH de 6.5 y resultados de la prueba del suelo mostraron un contenido de materia orgánica de 4,4% y fósforo y contenido de potasio de 42 y 146 ppm, respectivamente.

45 El campo fue previamente plantado de semillas de soja.

Se realizó un arado de cincel y el campo se cultivó en la primavera antes de la plantación.

[0053] El producto de LCO usado en el ensayo fue el mismo que aquel usado en ejemplo 1.

50 El producto flavonoide usado (ReVV®, EMD Crop BioScience) tuvo una concentración flavonoide total de 10 mM que comprende genisteína y daidzeína.

[0054] La semilla de maíz usada en el ensayo fue Pioneer variedad 38H52.

El índice de uso para los productos de LCO y flavonoide fueron 1,5 y 0,184 fl oz/cwt, respectivamente.

Los productos fueron cada uno diluido con agua y aplicados en la semilla a un índice de lodo de 15,3 fl oz/cwt.

55 La combinación de LCO/flavonoide fue aplicada en la misma concentración e índice de lodo como cuando se aplican solos.

El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies (= 4,6 m por 15,2 m), con espaciado de filas de 30 pulgada (= 76 cm) y cuatro replicaciones por tratamiento. Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 33.000 semillas por acre. (= 82.500 semillas/ha)

5 [0055] La plantación se efectuó utilizando un plantador de vacío de precisión de cuatro filas. Ciento cuarenta unidades de nitrógeno fueron aplicadas como urea antes del plantado, y un iniciador fertilizante adicional 150 lb de 7-21-7 se aplicó a la plantación.

10 [0056] Resultados del estudio se muestran en la tabla 7. El tratamiento de flavonoide aumentó estadísticamente el rendimiento de grano por 5,3 bu/acre, mientras que el tratamiento de LCO aumentó numéricamente el rendimiento de grano por 3,3 bu/acre. La aplicación de los dos productos en combinación resultó en un aumento estadísticamente significativo en el rendimiento sobre cada uno de los dos productos administrados solos.

15 El aumento observado con el tratamiento de combinación de 19,2 bu/acre excedió de forma imprevista el efecto combinado de los productos individuales solos (8,6 bu/acre) por más del doble, lo que demuestra un efecto sinérgico del tratamiento de combinación.

Tabla 7

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)		
Tratamiento	Aplicación	Rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	142.5
LCO	Semilla	145.8
Flavonoide	Semilla	147.8
Flavonoide + LCO	Semilla	161.7
Probabilidad%		<0.1
LSD 10%		4.2
CV%		4.4

20 8. (No parte de las reivindicaciones)

Semilla de maíz (DynaGro 51K74) tratamiento con LCO + flavonoide

25 [0057] Un segundo ensayo de maíz fue conducido como se describe en el Ejemplo 7 a una ubicación cerca de Fergus Falls, MN, en un suelo limoso rico en nutrientes previamente plantado de semillas de soja. Los productos de LCO y flavonoide fueron aplicados solos o en combinación en semilla de maíz DynaGro variedad 51K74.

30 El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 20 pies (= 3 m por 6,1 m) con espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm), y cuatro replicaciones por tratamiento.

[0058] Resultados del estudio se muestran en la tabla 8. Los tratamientos de semilla de LCO y flavonoide aumentaron numéricamente el rendimiento de grano en comparación con el control no tratado por 7,3 y 15,3 bu/acre, respectivamente.

35 La aplicación de los dos productos en combinación aumentó estadísticamente el rendimiento en comparación con el control por 24,0 bu/acre, y por 17,1 bu/acre en comparación con el tratamiento de LCO. El aumento en el rendimiento observado con el tratamiento combinado ha excedido el aumento combinado en el rendimiento de los productos individuales solos.

Tabla 8

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)		
Tratamiento	Aplicación	Rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	141,2
LCO	Semilla	148,5
Flavonoide	Semilla	156,5
Flavonoide + LCO	Semilla	165,2
Probabilidad%		<0,1
LSD 5%		13,9
CV%		6,3

9. (No parte de las reivindicaciones)

Semilla de maíz (Dairyland DSR 4497), surco, y tratamiento de follaje con LCO + flavonoide

45 [0059] Un ensayo en campo de maíz fue conducido en el mismo sitio anteriormente descrito en el ejemplo 7 para evaluar el efecto de tratamiento de semilla flavonoide en el rendimiento granular en comparación con la aplicación de LCO bien en el surco de semilla para la plantación o aplicado por pulverización como una aplicación foliar.

Estos tratamientos de producto individuales fueron adicionalmente comparados con el tratamiento de semilla flavonoide combinado con la aplicación de LCO de surco y tratamiento de semillas flavonoides combinado con la aplicación de LCO foliar.

Los productos de LCO y flavonoide fueron iguales a aquellos usados en los ejemplos anteriores.

5 [0060] La semilla de maíz usada en el ensayo fue Dairyland variedad DSR 4497.
El producto flavonoide se aplicó en la semilla en el mismo índice de uso de 0,184 fl oz/cwt e índice de lodo en el agua de 15,3 fl oz/cwt como en ejemplos previos.

10 El producto LCO se aplicó a la plantación en el surco de semilla a razón de 1 pinta/acre (= 1,2 l/ha) en 5 galones (= 18,9 litro) de agua, o aplicado por pulverización en las superficies foliares a razón de 1 qt/acre (= 2,34 l/ha) en 25 galones (= 94,6 litro) de agua en la fase V4 de desarrollo de maíz.

La semilla/surco y aplicaciones semilla/foliares estuvieron en los mismos índices para la combinación como cuando se aplicaron solos.

15 [0061] El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies (= 3 m por 15,2 m) con espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm), y cuatro replicaciones por (= 5 cm) tratamiento.

Semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 33.000 semillas por acre. (= 82.500 semillas/ha),

20 [0062] La siembra se efectuó utilizando un plantador de vacío de precisión de cuatro filas.
Ciento cuarenta unidades de nitrógeno fueron aplicadas como urea antes de la plantación, y un iniciador fertilizante adicional 150 lb de 7-21-7 se aplicó a la plantación.

25 [0063] Los resultados del estudio se muestran en la tabla 9.
La aplicación de flavonoide en la semilla y LCO en el surco de la semilla aumentó numéricamente el rendimiento de grano por 4,3 y 2,6 bu/acre, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control.
En contraste, la aplicación combinada de los dos productos en la semilla y en el surco aumentó estadísticamente el rendimiento por 5,5 bu/acre.

30 [0064] La aplicación separada de flavonoide en la semilla y LCO como una aplicación foliar resultó en un aumento numérico en el rendimiento con tratamiento de semilla flavonoide de 4,3 bu/acre y un aumento estadísticamente significativo de 7.4 bu/acre con aplicación foliar de LCO.

35 El tratamiento de semilla flavonoide combinado y la aplicación foliar de LCO además aumentó el rendimiento por 9,2 bu/acre en comparación con el tratamiento de control.

Tabla 9

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)		
Tratamiento	Aplicación	Rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	173.6
Flavonoide	Semilla	177.9
LCO	Surco	176.0
LCO	Foliar	181.0
Flavonoide / LCO	Semilla, surco	179.1
Flavonoide / LCO	Semilla, foliar	182.8
Probabilidad%		<0.1
LSD 10%		4.9
CV%		5.3

40 10. (No parte de las reivindicaciones)

Semilla de maíz (Spangler 5775), surco, y tratamiento de follaje con LCO + flavonoide

45 [0065] Un ensayo en campo de maíz paralelo fue conducido en la misma ubicación y con los mismos tratamientos y diseño de ensayo como se describe en el ejemplo 9, pero que difiere en la variedad de maíz usada (Spangler 5775).

[0066] Resultados del estudio se muestran en la tabla 10.
La aplicación de flavonoide en la semilla aumentó estadísticamente el rendimiento de grano por 7,4 bu/acre en comparación con el control no tratado, mientras la solicitud de LCO en el surco de la semilla aumentó numéricamente el rendimiento de grano por 3,5 bu/acre.

50 Tratamiento de semilla de flavonoide combinado y la aplicación en el surco de LCO además aumentó el rendimiento por 9,7 bu/acre en comparación con el tratamiento de control.

55 [0067] La aplicación separada de flavonoide en la semilla y LCO como una solicitud foliar resultó en un aumento significativo estadísticamente en el rendimiento con tratamiento de semilla flavonoide de 7,4 bu/acre (como se declara arriba) y un aumento numérico de 1,1 bu/acre con aplicación foliar LCO.

La aplicación de los dos productos en combinación resultó en un aumento significativo estadísticamente en el rendimiento mayor que el visto para cada uno de los dos productos solos.

Además, el aumento observado con el tratamiento de combinación (16,2 bu/acre) excedió el efecto combinado de los productos individuales solos (8,5 bu/acre), mostrando un efecto sinérgico de los tratamientos de combinación.

5

Tabla 10

(1 bu/acre = 62,8 kg/ha)

Tratamiento	Aplicación	Rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	160,7
Flavonoide	Semilla	168,1
LCO	Surco	164,2
LCO	Foliar	161,8
Flavonoide / LCO	Semilla, surco	170,4
Flavonoide / LCO	Semilla, foliar	176,9
Probabilidad%		<0,1
LSD 10%		5,6
CV%		4,8

11. (No parte de las reivindicaciones)

10

Tratamiento de LCO foliar y de semilla de flavonoide de semilla de soja (Dairyland DSR 1701)

[0068] Un ensayo en campo de semilla de soja fue conducido para evaluar el efecto del tratamiento de semilla de flavonoide en el rendimiento granular en comparación con el efecto de la aplicación foliar de LCO.

15

Los tratamientos de producto individual fueron adicionalmente comparados con tratamiento de semilla flavonoide combinado con la aplicación foliar de LCO.

El producto de LCO, fue el mismo que aquel usado en ejemplo 1, y el producto flavonoide fue el mismo que aquel usado en ejemplos previos.

20

[0069] El ensayo en campo fue conducido en un sitio cerca de Whitewater, WI en un suelo lodoso, arcilloso y limoso Milford.

El suelo tuvo un pH de 6.5 y resultados de la prueba del suelo mostraron un contenido de materia orgánica de 4.7% y contenido de fósforo y potasio de 48 y 136 ppm, respectivamente.

El campo no fue labrado y fue previamente plantado con maíz.

25

[0070] La semilla de soja usada en el ensayo fue Dairyland variedad DSR 1701.

El producto flavonoide se aplicó a un índice de uso de 0,184 fl oz/cwt e índice de lodo en el agua de 4,25 fl oz/cwt.

El producto de LCO fue aplicado por pulverización en las superficies foliares a razón de 1 qt/acre en 25 galones de agua (= 2,34 l/ha en 94,6 litro) en la fase V4 de desarrollo de soja.

La aplicación de semilla/foliar combinada fue en el mismo índice como cuando se aplicaron solos.

30

El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies (= 3 m por 15,2 m) con espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm) , y cuatro replicaciones por tratamiento.

Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 1 pulgada (= 2,5 cm) a un índice de siembra de 160.000 semillas por acre. (= 400.000 semillas/ha).

La plantación se efectuó utilizando un taladro granular John Deere 750 NT.

35

[0071] Resultados del estudio se muestran en la tabla 11.

La aplicación de flavonoide en la semilla aumentó estadísticamente el rendimiento de grano por 3,2 bu/acre en comparación con el control no tratado, mientras que la aplicación foliar de LCO aumentó numéricamente el rendimiento de grano por 1,2 bu/acre.

40

La aplicación de los dos productos en combinación resultó en un aumento significativo estadísticamente sobre cada uno de los dos productos solo, con el aumento en el rendimiento (5,0 bu/acre) superando el efecto combinado de los productos individuales solos (4,4 bu/acre), mostrando un efecto sinérgico del tratamiento de combinación.

Tabla 11

(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)

Tratamiento	Aplicación	rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	47.8
Flavonoide	Semilla	51.0
LCO	Foliar	49.0
Flavonoide / LCO	Semilla/foliar	52.8
Probabilidad%		<0.1
LSD 10%		1.3
CV%		5.2

45

12. (No parte de las reivindicaciones)

Tratamiento foliar de LCO y de semilla flavonoide de semilla de soja (Dairyland DSR 2000)

[0072] Un ensayo en campo de semillas de soja paralelo fue conducido en la misma ubicación y con los mismos tratamientos y diseño de ensayo como se describe en el ejemplo 11, pero difiere en la variedad de semilla de soja usada (Dairyland variedad DSR 2000).

5 [0073] Resultados del estudio se muestran en la tabla 12.
Solicitud de flavonoide en la semilla y LCO como una aplicación foliar aumentó estadísticamente el rendimiento de grano por 2,6 y 4,5 bu/acre, respectivamente, en comparación con el control no tratado.
10 El tratamiento de semilla flavonoide combinado y la aplicación foliar de LCO además aumentó el rendimiento por 7,1 bu/acre en comparación con el tratamiento de control.

Tabla 12

(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)		
Tratamiento	Aplicación	Rendimiento granular (bu/acre)
Control	Ninguno	40,9
Flavonoide	Semilla	43,5
LCO	Foliar	45,4
Flavonoide / LCO	Semilla/foliar	48,0
Probabilidad%		<0,1
LSD 10%		1,8
CV%		4,5

13. (No parte de las reivindicaciones)

15 Tratamiento de semilla de soja (Dairyland DSR 2300RR) con LCO + flavonoide

[0074] Un ensayo en campo de soja fue conducido para evaluar el efecto de productos de LCO y flavonoide en el rendimiento granular cuando se aplica en la semilla bien solos o en combinación.

20 El sitio de ensayo en campo fue situado cerca de Whitewater, WI y caracterizado por suelo franco limoso Plano. La evaluación del terreno mostró un pH de suelo de 6,5, un contenido de materia orgánica de 3,9%, y contenido de fósforo y potasio de 40 ppm y 138 ppm, respectivamente.

El campo no fue labrado y fue previamente plantado con maíz.

25 [0075] El producto de LCO usado en el ensayo (OPTIMIZE®, EMD Crop BioScience) fue producido por *Bradyrhizobium japonicum* y contenía aproximadamente 1×10^{-9} M LCO.

El producto flavonoide usado (ReVV®, EMD Crop BioScience) tuvo una concentración de flavonoide total de 10 mM que comprende genisteína y daidzeína en una proporción de 8:2 p/p.

30 [0076] La semilla de soja usada en el estudio fue Dairyland variedad DSR 2300RR.

Los productos LCO y flavonoide fueron pulverizados sobre semillas solos o en la combinación a razón de 4,25 y 0,184 fl oz/cwt, respectivamente.

El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con cuatro replicaciones y un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies (= 3 m por 15,2 m) y espaciado de filas de 15 pulgadas (= 38 cm).

35 Semillas fueron tratadas justo antes de la siembra y plantadas a una profundidad de 1 (= 2,5 cm) y un índice de siembra de 185.000 semillas por acre (= 462.500 semillas/HA) utilizando un taladro granular John Deere 750 NT.

[0077] Resultados del estudio se muestran en la tabla 13.

40 Los tratamientos de LCO y flavonoide aumentaron numéricamente el rendimiento 2,9 y 4,0 bu/acre, respectivamente, respecto al grupo de control no tratado ($p = 0,1$). En contraste, el tratamiento combinado de LCO + flavonoide aumentó significativamente el rendimiento por 7,0 bu/acre.

Este aumento en el rendimiento fue mayor que el beneficio combinado de los de los tratamientos de LCO y flavonoide individuales.

Tabla 13

(1 bu/acre = 67,3 kg/ha)	
Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	54,1
LCO	57,0
Flavonoide	58,1
LCO + flavonoide	61,1
Probabilidad%	<0,1
LSD 10%	4,2
CV%	3,6

14. Tratamiento foliar de maíz (Pioneer híbrido 34A17) con LCO + flavonoide o LCO + quitosano

50 [0078] Un ensayo en campo de maíz fue conducido para evaluar los efectos de LCO/flavonoide, y productos de LCO/quitosano en el rendimiento granular cuando se aplica al follaje solo o en combinación.

El producto de LCO fue producido por *Rhizobium leguminosarum* bv viceae y contenía aproximadamente 10-8 M LCO.

El producto flavonoide usado tuvo una concentración flavonoide total de 10 mM que comprendía genisteína y daidzeína en una proporción de 8:2 p/p.

5 El producto de quitosano (ELEXA®-4PDB) fue el mismo que aquel usado en los ejemplos previos.

[0079] El ensayo en campo fue situado cerca de York, NE en un sitio caracterizado por suelo franco limoso de Hastings.

El suelo tuvo un pH de 6 y un contenido de materia orgánica de 3%.

10 El sitio fue labrado de forma convencional, y el cultivo previo fue de soja.

La semilla de maíz usada en el estudio fue Pioneer híbrido 34A17.

El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 30 pies (= 3 m por 9,1 m) y espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm).

Cuatro replicaciones fueron realizadas.

15 Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 30.200 semillas por acre. (= 75.500 semillas/ha).

[0080] Tratamientos fueron aplicados pulverizando sobre el follaje en la fase de crecimiento V5.

20 Los tratamientos de LCO y ELEXA®-4PDB fueron aplicados a razón de 1 cuarto de galón/acre (= 2,34 l / ha) en 20 galones (= 75,7 litro) de agua utilizando un pulverizador de terreno pequeño a una velocidad respecto al suelo de 2,3 (= 3,7 kmh).

El tratamiento flavonoide fue diluido inicialmente 25x en el agua, luego aplicado a razón de 1 cuarto de galón/acre en 20 galones de agua.

25 El tratamiento de combinación de LCO-quitosano se aplicó a un índice reducido de 3,2 fl oz/acre (= 234 ml/ha) de LCO y 12,8 fl oz (= 936 ml/ha) quitosano en 20 galones (= 75,7 litro) de agua.

Para la combinación flavonoide-LCO, el flavonoide fue primero diluido 25x en agua, luego aplicado de forma similar a la combinación de quitosano LCO a 3,2 + 12,8 fl oz/acre (= 234 + 936 ml/ha) diluido en 20 galones (= 75,7 litro) de agua.

30 [0081] Resultados de este estudio se muestran en la tabla 14.

Los tratamientos de LCO, flavonoide, y ELEXA®-4PDB aumentaron numéricamente el rendimiento de grano por 1,2, 3,5, y 1,5 bu/acre, respectivamente, cuando se aplicaron al follaje como tratamientos autónomos (p = 0,1). La aplicación combinada de LCO con flavonoide y LCO con ELEXA®-4PDB aumentó significativamente el rendimiento por 8,6 y 12,1 bu/acre en comparación con el tratamiento de control.

35 En cada caso, la respuesta de tratamiento combinada excedió el beneficio combinado de los productos individuales solos, demostrando un efecto sinérgico de las composiciones de combinación.

Esto ocurrió incluso aunque los productos de combinación fueron aplicados a índices reducidos en comparación con cuando solo aplicados.

Tabla 14

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	222,0
LCO	223,2
Flavonoide	225,5
ELEXA®-4PDB4 PDB	223,5
LCO + flavonoide	230,6
LCO + ELEXA®-4PDB	234,1
Probabilidad%	0,0909
LSD 10%	6,5
CV%	2,4

15. Tratamiento foliar de maíz (Midwest Seed Genetics híbrido 8463859 RR2) con LCO + flavonoide o LCO + quitosano

45 [0082] Un ensayo en campo de maíz fue conducido similar al del ejemplo 14 para evaluar los efectos de LCO/flavonoide, y productos de LCO/quitosano en el rendimiento granular cuando se aplica al follaje solo o en combinación.

El LCO, flavonoide, y productos de quitosano fueron iguales al usado en ejemplo 14.

50 [0083] El ensayo en campo fue situado cerca de Sparta, IL en un sitio caracterizado por el suelo franco limoso.

El suelo tuvo un pH de 6.5 y un contenido de materia orgánica de 2,6%. El sitio fue labrado de forma convencional, y el cultivo previo fue de soja.

La semilla de maíz usada en el estudio fue Midwest Seed Genetics híbrido 8463859 RR2.

55 El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 40 pies (= 3 m por 12,2 m) y espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm).

Cuatro replicaciones fueron realizadas.

Semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 26.100 semillas por acre. (= 65250 semillas/ha).

[0084] Tratamientos fueron aplicados pulverizando sobre follaje en la fase de crecimiento V3-V4.

5 Los tratamientos individuales y combinados fueron aplicados en los índices descritos en ejemplo 14 en 20 galones (= 75,7 litro) de agua utilizando un pulverizador de mochila a una velocidad respecto al suelo de 3 mph. (= 4,8 kmh).

[0085] Resultados de este estudio se muestran en la tabla 15.

10 Los tratamientos de LCO, flavonoide, y ELEXA®-4PDB aumentaron numéricamente el rendimiento de grano por 3,4, 7,1, y 3,3 bu/acre, respectivamente, cuando se aplicaron al follaje como tratamientos autónomos ($p = 0,1$). Solicitud combinada de LCO con flavonoide aumentó el rendimiento aumentado significativamente por 16,5, mientras que la aplicación combinada de LCO con ELEXA®-4PDB aumentó numéricamente el rendimiento por 10,5 bu/acre en comparación con el tratamiento de control.

15 En cada caso, la respuesta de tratamiento combinado excedió el beneficio combinado de los productos individuales solos, demostrando un efecto sinérgico de las composiciones de combinación.

Esto ocurrió aunque los productos de combinación fueron aplicados a un índice reducido en comparación con cuando se aplicaron solos.

Tabla 15

Tratamiento	Rendimiento granular (bu/acre)
Control - no tratado	71,7
LCO	75,1
Flavonoide	78,8
ELEXA®-4PDB4 PDB	75,0
LCO + flavonoide	88,2
LCO + ELEXA®-4PDB	82,2
Probabilidad%	0,6459
LSD 10%	13,8
CV%	14,6

20

16. (No parte de las reivindicaciones) Tratamiento foliar de maíz con LCO y herbicida

[0086] Tres ensayos de campo de maíz fueron conducidos para evaluar el efecto de la aplicación foliar de LCO en combinación con cuatro herbicidas diferentes.

25 El LCO es el mismo que aquel usado en ejemplos de la aplicación foliar anteriores.

Los herbicidas incluyeron glifosato (Roundup Original Max®, Monsanto Company, St. Louis, MO), amonio de glufosinato (Liberty®, Bayer CropScience Lp(a), parque de triángulo de investigación, NC), mesotriona (Calisto®, Syngenta Crop Protection, Inc., Greensboro, NC), y nicosulfu/rimsulfurón (Steadfast®, E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE).

30

[0087] Dos de los ensayos fueron situados cerca de Whitewater, WI en sitios caracterizados por suelo lodoso, arcilloso y limoso de Milford (campos F-5 y P-1).

El sitio F-5 fue de forma convencional labrado con un cultivo previo de maíz, y el sitio P-1 fue labrado lo mínimo con soja como cultivo previo.

35 La semilla de maíz usada para ambos estudios fue Pioneer híbrido 36B05 HXX/RR/LL.

Los estudios fueron conducidos en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 50 pies, (= 3 m por 15,2m) espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm) , y cuatro replicaciones.

Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 33.000 semillas por acre (= 82.500 semillas/ha) utilizando un plantador de terreno de precisión de vacío.

40

[0088] El tercer ensayo en campo fue situado cerca de York, NE en un sitio caracterizado por suelo franco limoso de Hastings.

El sitio fue labrado de forma convencional con soja como cultivo previo.

La semilla de maíz usada en el estudio fue Pioneer híbrido 34A17.

45 El estudio fue conducido en un diseño de bloque completo aleatorizado, con un tamaño de terreno de 10 pies por 30 pies, (= 3 m por 9,1m) espaciado de filas de 30 pulgadas (= 76 cm), y cuatro replicaciones.

Las semillas fueron plantadas a una profundidad de 2 pulgadas (= 5 cm) a un índice de siembra de 30.200 semillas por acre. (= 75.500 semillas/ha).

50 [0089] Tratamientos en los dos sitios de Whitewater, WI fueron aplicados pulverizando sobre el follaje en la fase de crecimiento V4.

El tratamiento LCO se aplicó a razón de 1 cuarto de galón/acre (= 2,34 l/ha); los productos herbicidas fueron aplicados a un índice de marcador para cada producto.

55 El herbicida y tratamientos de LCO + herbicidas fueron aplicados de foliar en 25 galones (= 94,6 litro) de agua utilizando un pulverizador de terreno pequeño a una velocidad respecto al suelo de 2,5 mph. (=4kmh)

ES 2 602 356 T3

[0090] Tratamientos en el sitio York, NE fueron aplicados en la fase de crecimiento V6 en el mismo 1 cuarto de galón/acre (= 2,34 l/ha) para el LCO e índice de marcador para los productos herbicidas en 20 galones (= 75,7 litro) de agua utilizando un pulverizador de terreno pequeño a una velocidad respecto al suelo de 2,3 mph. (=3,7 Km/h)

5 [0091] Resultados de este estudio se muestran en la tabla 16.

Con el dos ensayos de Whitewater, WI, aplicación de LCO en combinación con los cuatro herbicidas diferentes mejoraron el rendimiento granular en comparación con el herbicida solo con todas combinaciones de LCO/herbicidas en las dos ubicaciones, con la excepción de la combinación de LCO + Steadfast en el sitio P-1 .

10 En la ubicación de York, NE, solicitud de LCO en combinación con los cuatro herbicidas diferentes mejoró el rendimiento granular en comparación con el herbicida solo con cada una de las combinaciones de LCO/herbicidas, con la excepción del tratamiento de LCO + Calisto.

Tabla 16

(1 qt/acre = 2,34 l/ha)		Roundup	LCO + Round-Up 1 qt/A	Liberty	LCO + Liberty 1 qt/A	Calisto	LCO+ Calisto 1 qt/A	Steadfast Steadfast	LCO + Steadfast 1 qt/A
Ensayo	ubicación								
Whitewater. WI		157,5	161,9	152,1	156,9	156	158,8	140,6	141,2
Whitewater. WI		161,2	169,2	159,6	164,2	162,8	169,1	154,4	152,1
York, NE		195,8	204,6	201	208,9	202,8	202	194,3	201,3

[0092] Aunque las formas de realización preferidas de la invención han sido mostradas y aunque las formas de realización preferidas de la invención han sido mostradas y descritas aquí, será entendido que tales formas de realización se proporcionan a modo de ejemplo solo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para la mejora del crecimiento de planta o rendimiento del cultivo que comprende al menos un lipo-quitooligosacárido y uno o varios compuestos quitinosos seleccionados del grupo consistente en quitinas y quitosanos.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde el lipo-quitooligosacárido se produce por una bacteria de los géneros bacterianos seleccionados del grupo consistente en *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Mesorhizobium*.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, donde el lipo-quitooligosacárido se produce por síntesis química.
4. Composición según la reivindicación 1, donde el lipo-quitooligosacárido se produce, al menos en parte, por una célula u organismo modificado genéticamente.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1, donde el lipo-quitooligosacárido está presente a una concentración de entre 10^{-5} M a 10^{-14} M.
6. Composición según la reivindicación 5, donde el lipo-quitooligosacárido está presente a una concentración de entre 10^{-5} M a 10^{-10} M.
- 25 7. Composición según la reivindicación 1 que comprende además una bacteria que produce un LCO.
8. Composición según la reivindicación 1, donde uno o más compuestos quitinosos son quitinas.
- 30 9. Composición según la reivindicación 1, donde uno o más compuestos quitinosos están presentes a una concentración de entre 0,1 a 15% p/v.
10. Composición según la reivindicación 9, donde uno o más compuestos quitinosos están presentes a una concentración de entre 3 a 12% p/v.
- 35 11. Método para la mejora del crecimiento de la planta o rendimiento del cultivo que comprende la administración a una planta o semilla de la composición según la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para la mejora del crecimiento de la planta o el rendimiento del cultivo.
- 40 12. Composición según la reivindicación 1, donde uno o más compuestos quitinosos son quitosanos.
13. Método según la reivindicación 11, donde la planta es seleccionada del grupo consistente en semillas de soja, guisantes, garbanzos, judías secas, cacahuetes, trébol, alfalfa, maíz, algodón, arroz, tomates, canola, trigo, cebada, remolacha azucarera, y hierba.
- 45 14. Método según la reivindicación 11, donde la composición se administra aplicando la composición al follaje, semillas, o al suelo que está en la proximidad inmediata de la planta o semilla.
15. Método según la reivindicación 11, donde la planta o semilla es una legumbre.
- 50 16. Método según la reivindicación 11, donde el lipo-quitooligosacárido está presente a una concentración de entre 10^{-5} M a 10^{-14} M.
17. Método según la reivindicación 11, donde uno o más compuestos quitinosos están presentes a una concentración de entre 0,1 a 15% p/v.
- 55 18. Método para la mejora del crecimiento de planta o rendimiento del cultivo que comprende administrar consecutivamente a una planta o semilla, en cualquier orden, una primera composición que comprende al menos un lipo-quitooligosacárido en una cantidad eficaz para la mejora del crecimiento de la planta o rendimiento del cultivo, y una segunda composición que comprende al menos un compuesto quitinoso en una cantidad eficaz para la mejora del crecimiento de la planta o rendimiento del cultivo, donde al menos un compuesto quitinoso es seleccionado del grupo consistente en quitinas y quitosanos.
- 60 19. Método según la reivindicación 18, donde el lipo-quitooligosacárido está presente a una concentración de entre 10^{-5} M a 10^{-14} M.
20. Método según la reivindicación 18, donde uno o más compuestos quitinosos están presentes a una concentración de entre 0,1 a 15% p/v.

65