

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 765**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2000** **E 15155275 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2907389**

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

30 Prioridad:

08.10.1999 CA 2285727

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**MCGILL UNIVERSITY (100.0%)
Office of Technology Transfer, 3550 University
Street
Montreal, Quebec H3A 2A7, CA**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 623 765 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

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

Campo de la divulgación

- 5 La presente divulgación se refiere a agricultura. Más particularmente, la divulgación se refiere a un procedimiento de aumento de la fotosíntesis de una planta y más particularmente de una planta de cultivo. Además, la divulgación se refiere a un procedimiento de aumento de la fotosíntesis y/o al crecimiento y/o al rendimiento en plantas de cultivo, que comprende una exposición de las mismas a lipo-quitooligosacáridos, y a composiciones de los mismos.

Antecedentes

- 10 Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, conocidas colectivamente como rizobios, forman órganos especializados en las raíces denominados nódulos, y a veces tallos, de legumbres y fijan el nitrógeno atmosférico en estas estructuras. La formación de nódulos es un proceso altamente especializado que está modulado por moléculas de señalización. En general, esta fase de la interacción es un proceso de dos etapas. Inicialmente, las moléculas de señalización de plantas a bacterias, habitualmente flavonoides o isoflavonoides específicos, se liberan por las raíces de las plantas hospedadoras. En respuesta a las señales de plantas a bacterias, el microsimbionte libera moléculas de señalización de bacterias a plantas, que son lipo-quitooligosacáridos (LCO), los llamados genes de factores Nod (también *nol* y *noe*) muy rápidamente (solamente unos pocos minutos después de la exposición) y a concentraciones muy bajas (10^{-7} a 10^{-8} M) (Peters y col., 1986). Generalmente, esto a través de una interacción con *nodD*, que activa los genes *nod* comunes, aunque la situación puede ser más compleja, como es el caso de *B. japonicum*, donde *nodD₁*, *nodD₂* y *nodVW* están implicados (Gillette y Elkan 1996; Stacey 1995). Los genes Nod se han identificado en los rizobios que forman relaciones de fijación de oxígeno con varios de la familia *Fabaceae* (véase el documento 5.549.718 y referencias en el mismo). Recientemente, las moléculas de señalización de plantas a bacterias han demostrado promover la nodulación de la soja y la fijación de nitrógeno a temperaturas frías del suelo (documento CA 2.179.879) y aumentar el rendimiento del grano de soja final en un promedio del 10 % en campo y hasta un 40 % en ciertas condiciones. (Long, 1989; Kondorosi, 1991; Schenes y col., 1990; Boone y col., 1999). Entre los productos de los genes *nod* inducidos por las moléculas de señalización fenólica vegetal están diversas enzimas implicadas en la síntesis de una serie de lipo-quitooligosacáridos (LCO) (Spaink, 1995; Stacey, 1995). Estos LCO recién sintetizados actúan como señales de bacterias a plantas, induciendo la expresión de muchos de los genes tempranos de nodulina (Long, 1989).
- 30 Las moléculas de señalización LCO están compuestas de tres a cinco restos de acetilglucosamina ligados 1-4β con el grupo N-acetilo del azúcar no reductor terminal remplazado por una cadena acilo. Sin embargo, son posibles diversas modificaciones de esta estructura básica y estas, al menos en parte, determinan la especificidad por hospedador de los rizobios (Spaink y col., 1991; Schultze y col., 1992).

- 35 Se sabe que los lipo-quitooligosacáridos afectan a varios procesos fisiológicos de la planta hospedadora. Por ejemplo, inducen: deformación de los pelos de la raíz (Spaink y col., 1991), ontogénesis de estructuras nodulares competitivas (Fisher y Long, 1992; Denarie y Cullimore, 1993), división de células corticales (Sanjuan y col., 1992; Schlaman y col., 1997) y la expresión de genes de nodulina del hospedador esenciales para la formación de infección en ramas (Horvath y col., 1993; Pichon y col., 1993, Minami y col., 1996). Los LCO también han demostrado activar enzimas relacionadas con la defensa (Inui y col., 1997). Estas señales de bacterias a plantas ejercen una influencia potente sobre el genoma de la planta y, cuando se añaden en ausencia de las bacterias, pueden inducir la formación de nódulos de la raíz (Truchet y col., 1991). Por tanto, las señales de bacterias a plantas pueden inducir, sin las bacterias, toda la actividad génica para la organogénesis de los nódulos (Denarie y col., 1996; Heidstra y Bisseling, 1996). Además, las actividades mencionadas anteriormente inducidas por los LCO pueden producirse por concentraciones tan bajas como 10^{-14} M (Stokkermans y col. 1995). El intercambio mutuo de señales entre las bacterias y la planta es esencial para la interacción simbiótica. Los mutantes de rizobios incapaces de sintetizar LCO no formarán nódulos. El análisis de los genes *nod* de *B. japonicum* indica que la capacidad de inducir nodulación en soja requiere al menos 1) un factor Nod tetramérico básico que requiere solamente genes *nodABC* o 2) un LCO pentamérico (ácido graso C18:1, C16:0 o C16 y una metil-fucosa en el extremo reductor, a veces acetilada) que requiere genes *nodABCZ* (Stokkermans y col. 1995).

- 50 Cuando se añade a la legumbre apropiada, los LCO pueden causar la inducción de meristemas del nódulo (Denarie y col., 1996) y, por lo tanto, actividad de división celular. Los LCO también han demostrado inducir actividades del ciclo celular en un sistema *in vitro*: (un sistema de embriogénesis de zanahoria) a niveles tan bajos como 10^{-14} M (De Jong y col., 1993).

- 55 Una estructura química de lipo-quitooligosacáridos, también llamada "señales Nod simbióticas" o "factor Nod", se ha descrito en las patentes de Estados Unidos 5.549.718 y 5.175.149. Estos factores Nod tienen las propiedades de un ligando de lecitina o sustancias de lipo-oligosacárido que pueden purificarse de bacterias o sintetizarse o producirse por ingeniería genética.

El proceso de fijación de N₂ es energéticamente intensivo que requiere aproximadamente el 10-20 % del carbono fijado por la planta. Se ha estimado que se requiere un promedio de aproximadamente 6 mg de carbono por mg de nitrógeno fijado (Vance y Heichel, 1991). La fotosíntesis potenciada, debido a la asociación de *Bradyrhizobium*-soja se ha presentado previamente. Imsande (1989a,b) informaron de fotosíntesis neta potenciada y rendimiento de grano en soja inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* en comparación con plantas que no se inocularon pero se suplementaron adecuadamente con fertilizante N. Recientemente, Phillips y col., (1999) demostraron que el lumicromo podría actuar como molécula de señalización en la rizosfera de plantas de alfalfa, conduciendo a respiración aumentada y asimilación neta de carbono durante las fases prematuras de la simbiosis de *Sinorhizobium melilotii*-alfalfa.

5
10
15
20
25
30
35

Cocking y col., (NATO ASI Series G: Ecological Sciences, US, Plenum Press, Nueva York (1995), vol. G37:197-205) describe la interacción de rizobios con cultivos no leguminosos para la nodulación simbiótica de la fijación del nitrógeno. El documento AT406324 B (publicado por primera vez como AT203098 A) describe una solución que promueve el crecimiento de las plantas y un procedimiento para su preparación. Antoun y col. (Plant and Soil (1998), 204:57-67) describe el potencial de especies de *Rhizobium* y de *Bradyrhizobium* como rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas en no leguminosas, particularmente el efecto sobre de rábanos (*Raphanus sativus* L.). El documento DE 196.33.502 A1 describe la mejora de la actividad y/o la compatibilidad en las plantas de los fungicidas.

Los procedimientos para aumentar la acumulación de materia seca en la planta y el rendimiento son esenciales ya que se proyecta que la población mundial aumentará en 4 billones (66 %) durante los siguientes cincuenta años (United Nations, Population Division, 1998). Los últimos cincuenta años la producción mundial de cultivos aumentó en 2,5 veces, con poco aumento del área de tierra cultivada (Hoisington y col., 1999). Dado el aumento proyectado en la población mundial debemos proporcionar otro aumento de 2,5 veces durante los siguientes cincuenta años si todos debemos tener un acceso razonablemente fiable al alimento (James, 1997). Sin embargo, las causas principales de producción aumentada de alimentos durante los últimos cincuenta años (aumentos en el índice de recolección, la cantidad de tierra en riego y el uso de fertilizantes, particularmente fertilizante N) están en gran medida agotadas. Cien años de cultivo de plantas ha producido poco o ningún aumento en las tasas fotosintéticas de la mayoría de plantas de cultivo (Moss y Musgrave, 1971; Evans 1975, 1980). Por tanto, sigue existiendo una tremenda necesidad de aumentar las tasas fotosintéticas y el crecimiento de plantas de cultivo. También sigue existiendo una necesidad de aumentar la producción de plantas de cultivo.

Se han hecho esfuerzos considerables por potenciar la fotosíntesis en plantas de cultivo con el fin de aumentar la productividad de las plantas. Makela y col., (1999) informaron de fotosíntesis potenciada bajo estrés de sequía y de salinidad en tomate y nabo después de la aplicación foliar de glicina-betanina a concentraciones muy bajas. La aplicación foliar de metanol también aumentó la fotosíntesis en varias plantas (Noumora y Benson, 1991). Johnson y Stelizer (1991) informaron de fotosíntesis aumentada en pino taeda por aplicación de dosis sub-letales de hexazinona.

Aunque los efectos de las moléculas de señalización de plantas a bacterias (es decir, isoflavonas) sobre la nodulación, la fijación del nitrógeno, el crecimiento y la producción de proteínas de las legumbres, tales como soja, y sobre las moléculas de señalización de bacterias a plantas (LCO) sobre la nodulación y la fijación del nitrógeno en legumbres se han descrito en ciertas condiciones, el efecto de las moléculas de señalización de bacterias a plantas sobre el crecimiento de plantas no leguminosas es desconocido. De hecho, la función de dichas moléculas de señalización de bacterias a plantas sobre plantas no leguminosas aún tiene que presentarse. Además, el efecto de los LCO sobre procesos diferentes de la nodulación de las legumbres aún tiene que describirse. Además, aunque los LCO se han asociado con un efecto promotor del crecimiento en las fases prematuras del inicio de la relación simbiótica entre plantas y bacterias, aún se tiene que determinar si los LCO pueden tener un efecto sobre las plantas en fases posteriores en su ciclo vital.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de evaluar el efecto de los LCO sobre el crecimiento de las plantas y especialmente sobre fases posteriores de las mismas. Además, sigue existiendo la necesidad de evaluar si composiciones que comprenden LCO pueden tener un efecto sobre la tasa sintética y/o el crecimiento de las plantas en general y especialmente de plantas no leguminosas.

También existe la necesidad de entender mejor los funcionamientos del complejo sistema homeostático que está implicado en la regulación de la fotosíntesis. Además, sigue existiendo la necesidad de evaluar la función de los LCO sobre la fotosíntesis de las plantas.

La presente divulgación busca cumplir estas y otras necesidades.

Sumario

La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

La divulgación se refiere a una composición para potenciar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de una planta y especialmente de una planta de cultivo. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a

una composición que comprende un LCO que puede aumentar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de una legumbre, además de actuar como desencadenante para iniciar la fijación simbiótica de nitrógeno en legumbres. Más particularmente, la divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para potenciar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de una planta y especialmente de una planta de cultivo cultivada en condiciones de campo. En ciertos casos, la planta es una planta no leguminosa. En casos adicionales, la divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para aumentar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de una legumbre, más particularmente soja, y especialmente una legumbre cultivada en condiciones de campo.

Sorprendentemente, las composiciones de la presente divulgación actúan no solamente en una legumbre tal como soja, sino en plantas en general, como se ejemplifica con varios cultivos no leguminosos. Más específicamente, estos cultivos no leguminosos se ejemplifican con cultivos diversificados y evolutivamente divergentes tales como maíz, arroz (*Poaceae*); melón (*Cucurbitaceae*); colza (*Brassicaceae*); manzana (*Rosaceae*); y uva (*Vitaceae*). La presente divulgación, por tanto, también se refiere a composiciones para potenciar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de plantas no leguminosas. Más particularmente, la divulgación se refiere a composiciones que comprenden un LCO para potenciar la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento de plantas no leguminosas. Ejemplos no limitantes de dichas plantas no leguminosas incluyen algodón, maíz, arroz, colza, patata, pepino, cantalupo, melón, lechuga, manzana, uva y remolacha.

Ampliamente, por lo tanto, la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden un LCO para promover el crecimiento de un cultivo. Ejemplos no limitantes de cultivos vegetales incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas, miembros de la familia de las gramíneas (que contiene los cereales) y legumbres.

Más específicamente, por lo tanto, la presente divulgación se refiere a la demostración de que una administración de LCO a una planta aumenta significativamente la tasa fotosintética de la misma. Más particularmente, la presente divulgación demuestra que pulverizar LCO sobre las hojas de una planta (por ejemplo, una aplicación foliar) aumenta significativamente la tasa fotosintética de la misma. La presente divulgación, por lo tanto, se refiere a composiciones para aumentar la tasa fotosintética de plantas en general. Además, la presente divulgación se refiere a procedimientos de aumento de la tasa fotosintética de plantas evolutivamente divergentes, que comprende una aplicación de una dosis agrícolamente eficaz de LCO. En un caso particularmente preferido, la divulgación se refiere a una aplicación aguda de LCO por una pulverización de las hojas de las plantas y a su efecto sobre el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas y especialmente de plantas cultivadas en campo.

En un conjunto particular de experimentos, una composición de la presente divulgación, que comprende un LCO, demostró potenciar significativamente la tasa fotosintética de plantas evolutivamente divergentes tales como soja (*Fabaceae*), maíz, arroz (*Poaceae*), melón (*Cucurbitaceae*), colza (*Brassicaceae*), manzana (*Rosaceae*) y uva (*Vitaceae*), en condiciones de invernadero.

En otro conjunto de experimento en campo, una composición de la presente divulgación que comprende un LCO demostró potenciar significativamente la tasa fotosintética de soja, maíz, manzana y uva.

Aunque la presente divulgación se ha demostrado usando plantas evolutivamente divergentes, la divulgación no debe estar limitada de ese modo. De hecho, quedará claro para un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación, que basándose en la distancia evolutiva entre los tipos de plantas ensayadas y su respuesta similar a una aplicación de LCO, que se espera que otros tipos de plantas respondan de forma similar a la aplicación de LCO, presentando un aumento en la tasa fotosintética y/o en el rendimiento de los mismos. Cabe observar que el grupo de Smith y col., (el grupo del que procede la presente divulgación) también ha demostrado que los LCO pueden potenciar significativamente la germinación de las semillas y/o la germinación y/o el crecimiento de plántulas, y/o la rotura del periodo de inactividad de numerosos tipos de familias de plantas no leguminosas, incluyendo *Poaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae* y *Solonaceae*. Más específicamente, los cultivos no leguminosos usados incluyen maíz, algodón, cantalupo, lechuga, patata y remolacha. Por tanto, también se ha demostrado la actividad biológica de los LCO en fases prematuras de plantas en general.

Basándose en (1) la divergencia evolutiva de los cultivos ensayados, que presentan una tasa fotosintética aumentada después de tratamiento con LCO; y (2) el efecto de LCO sobre la germinación y el crecimiento de plántulas (y de la rotura del periodo del periodo de inactividad de tubérculos de patata) de plantas evolutivamente divergentes, se espera que las tasas fotosintéticas y los efectos de aumento de producción demostrados por los procedimientos y las composiciones de la presente divulgación puedan aplicarse a plantas en general. Más particularmente, se refiere a composiciones y a procedimientos para diferentes familias de plantas incluyen, aunque sin limitación, *Poaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Fabaceae* y *Solonaceae*. Más específicamente, los cultivos dentro del alcance de la presente divulgación incluyen, sin limitación, maíz, algodón, cantalupo, melón, pepino, colza, lechuga, patata, manzana, uva y remolacha. Ejemplos no limitantes de plantas de cultivo también incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas, miembros de la familia de gramíneas (que contiene los cereales) y legumbres.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a composiciones agrícolas que comprenden al menos un LCO (y procedimientos de uso de las mismas) para promover aumentos de la tasa fotosintética y/o aumentar la producción

de un cultivo. Debe estar claro para un experto en la materia que podrían añadirse otros compuestos que aumentan la tasa fotosintética y/o aumentan la producción a las composiciones de la presente divulgación.

5 El solicitante es el primero en demostrar que una composición que comprende un LCO puede tener un efecto significativo sobre la tasa fotosintética de las legumbres. Además, el solicitante es el primero en demostrar el efecto sorprendente de las moléculas de señalización implicadas en la señalización de bacterias-legumbres sobre la tasa fotosintética y el crecimiento de plantas no leguminosas.

También debe entenderse que pueden usarse plantas convencionales y plantas modificadas por ingeniería genética de acuerdo con la presente divulgación. En un caso particular y preferido de la presente divulgación, se tratan plantas no modificadas genéticamente con la composición y/o el procedimiento de la presente divulgación.

10 Aunque las capacidades de potenciación de la tasa fotosintética y/o la producción de las composiciones de la presente divulgación se demuestran en condiciones de campo con maíz, manzana, uva y soja, se espera que otros cultivos también muestren el mismo tipo de respuesta al tratamiento con LCO. Estas plantas incluyen, sin limitación, plantas significativamente divergentes en diez familias distintas: (1) maíz, la única monocotiledónea ensayada en el presente documento, en la familia de gramíneas (*Poaceae*), que también contiene los cereales; (2) pepino y cantalupo, siendo el último una planta usada de forma hortícola, y siendo lenta de germinar a baja temperatura [su temperatura base es de aproximadamente 14 °C] (*Cucurbitaceae*); (3) algodón, uno de los cultivos fibrosos más importantes en el planeta (*Malvaceae*); (4) lechuga (*Asteraceae*); (5) remolacha (*Chenopodiaceae*); (6) patata, un cultivo muy importante (*Solanaceae*, que también incluye tabaco, pimientos y tomate); y dos familias de legumbre (7) colza, que representa el grupo de mostazas (*Brassicaceae*) y (8) soja (representativa de cultivo de semillas oleaginosas), alubia (representativa de un cultivo para consumo humano) y trébol rojo y alfalfa (legumbres forrajeras) (todos de la familia *Fabaceae*); (9) manzana, que representa *Rosaceae*; y (10) uva, que representa *Vitaceae*.

25 En vista de la distancia evolutiva entre las plantas enumeradas anteriormente, y de su respuesta similar al tratamiento con LCO en condiciones de invernadero o en condiciones de campo, se predice que dichos resultados serán aplicables a plantas de cultivo en general. Se infiere que un experto en la materia puede adaptar los contenidos de la presente divulgación a otros cultivos. Ejemplos no limitantes de los mismos incluyen tabaco, tomate, trigo, cebada, arroz, girasol y plantas cultivadas para la producción de flores (margarita, clavel, pensamiento, gladiolo, lilas y similares). Se entenderá que las composiciones pueden adaptarse a cultivos específicos, para cumplir necesidades particulares.

30 De acuerdo con un caso de la presente divulgación, por tanto, se proporciona una composición agrícola para potenciar la tasa fotosintética de un cultivo vegetal y/o el crecimiento del mismo que comprende una cantidad que promueve la tasa fotosintética de al menos un lipo-quitooligosacárido (LCO) junto con un vehículo agrícolamente adecuado.

35 De acuerdo con otro caso de la presente divulgación, por lo tanto, se proporciona un uso de una composición agrícola para potenciar la tasa fotosintética de un cultivo vegetal y/o el crecimiento del mismo que comprende una cantidad que promueve la tasa fotosintética de al menos un lipo-quitooligosacárido (LCO) junto con un vehículo agrícolamente adecuado.

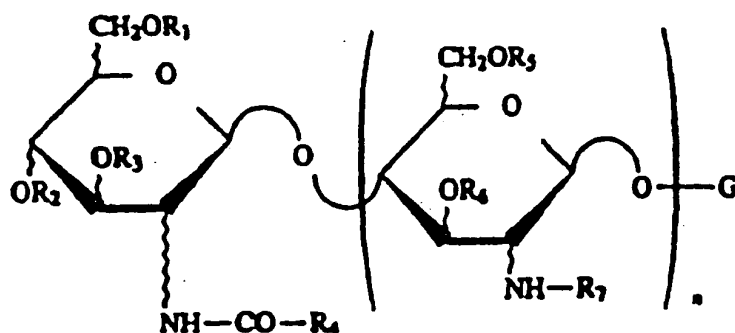
40 De acuerdo con otro caso más de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para aumentar la tasa fotosintética y/o el crecimiento de una planta, que comprende un tratamiento de las hojas de una planta con una composición que comprende una cantidad agrícolamente eficaz de un lipo-quitooligosacárido (LCO) en mezcla con un medio de vehículo agrícolamente adecuado, en el que la cantidad eficaz potencia la tasa fotosintética y/o el crecimiento de la planta en comparación con una planta no tratada.

45 Además, de acuerdo con otro caso de la presente divulgación, por lo tanto, se proporciona un procedimiento para potenciar la tasa fotosintética y/o el crecimiento de un cultivo vegetal, que comprende incubar una cepa de rizobios que expresa un lipo-quitooligosacárido (LCO) en las cercanías de una hoja de la planta de modo que el LCO potencie la tasa fotosintética y/o el crecimiento del cultivo vegetal en comparación con una planta no tratada.

Las expresiones "oligosacárido de lipoquitina" y "lipo-quitooligosacárido" se usan en el presente documento de forma intercambiable.

50 La terminología "cultivado en condiciones de campo" se entenderá que cubre las condiciones a las que se somete una planta cuando se cultiva en el campo, en oposición a cuando se cultiva en condiciones más controladas, tales como condiciones de invernadero.

55 Como se usa en el presente documento, el término "LCO" se refiere ampliamente a un factor Nod que está bajo el control de al menos un gen de nodulación (gen nod), común a rizobios. Por lo tanto, LCO se refiere a una molécula de señalización de bacterias a plantas que induce la formación de nódulos en legumbres y posibilita que las bacterias simbióticas colonicen las mismas. Ampliamente, los LCO son moléculas de señalización de lipo-quitooligosacárido, que actúan como fitohormonas, que comprenden un resto de oligosacárido que tiene un ácido graso condensado en uno de sus extremos. Un ejemplo de un LCO está representado a continuación como fórmula I.



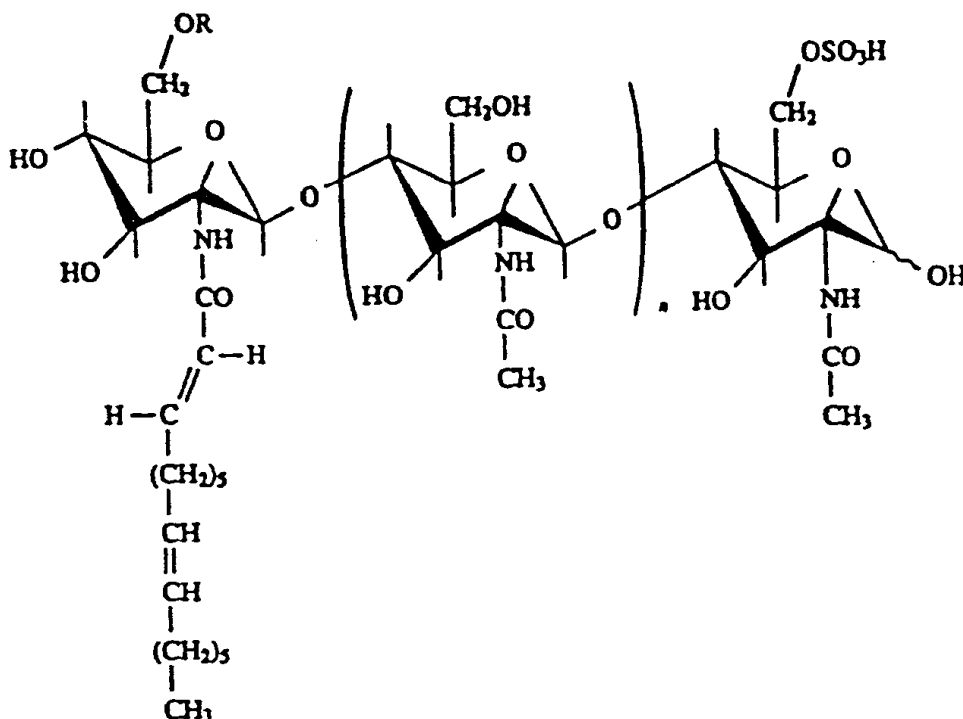
en la que:

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

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

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

10 También se describen LCO más específicos de *R. meliloti* en el documento 5.549.718 que tiene fórmula II



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

LCO incluso más específicos incluyen NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Cuando están acetilados (el R = CH₃CO-), se convierten en AcNodRM-1 y AcNodRM-3, respectivamente (documento U.S. 5.545.718).

15 También se han caracterizado los LCO de *B. japonicum* en el documento U.S. 5.175.149 y 5.321.011. Ampliamente, son fitohormonas de pentasacárido que comprenden metilfucosa. Se describen varios de estos LCO derivados de *B. japonicum*: BjNod-V (C_{18:1}); BjNod-V (Ac, C_{18:1}); BjNod-V (C_{16:1}); y BjNod-V (Ac, C_{16:0}), indicando "V" la presencia de cinco N-acetilglucosaminas; "Ac" una acetilación; indicando el número después de "C" la cantidad de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después de ":" la cantidad de dobles enlaces.

20 También debe entenderse que las composiciones que comprenden diferentes LCO están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. De hecho, aunque la presente divulgación se ejemplifica con LCO obtenidos de *B. japonicum*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, y en particular NodBj-V(C_{18:1}, MeFeu), se espera que cualquier LCO producido por un rizobio que es capaz de entrar en una relación de fijación de nitrógeno con una legumbre (es decir, un miembro de la familia *Fabaceae*) muestre las mismas propiedades que las de los LCO ejemplificados en el

presente documento. Quedará claro para los expertos en la materia que la selección de rizobios que se sabe que expresan LCO a altos niveles, o que sabe que expresan un LCO que tiene un efecto sobre un amplio espectro de legumbres (tal como NGR234) podría ser ventajoso.

5 Quedará claro también que las composiciones de LCO de la presente divulgación también podrían comprender más de una molécula de señalización. Ejemplos no limitantes de dichas composiciones incluyen composiciones agrícolas que comprenden además de un LCO: (1) al menos un LCO adicional; (2) al menos una molécula de señalización de plantas a bacterias; (3) ácido giberélico u otros agentes o compuestos que sabe que promueven el crecimiento o la salud de las plantas; y mezclas de dichas composiciones (1), (2) o (3).

10 Quedará claro que habiendo identificado nuevos usos para LCO, las bacterias podrían modificarse por ingeniería genética para que expresen genes nod y se usen para producir LCO o para administración directa a las plantas y/o a las semillas.

15 Por tanto, aunque la presente divulgación se demuestra en particular con LCO de *Bradyrhizobium japonicum*, y en una legumbre seleccionada o en cultivos no leguminosos, la divulgación no está limitada a ello. Otros cultivos leguminosos, cultivos no leguminosos y cepas de rizobios pueden usarse los mismos principios mostrados en el presente documento. El emparejamiento preferido de rizobios con grupos de cultivo de legumbres incluye, por ejemplo:

especies de rizobios	Grupo de cultivo de legumbres
<i>R. meliloti</i> alfalfa,	meliloto
<i>R. leguminosarum</i>	guisantes, lentejas
<i>R. phaesolii</i>	alubias
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	soja
<i>R. trifolii</i>	trébol rojo

20 Como será obvio para los expertos en la materia a la que se refiere la presente divulgación, las composiciones de estimulación del crecimiento de la presente divulgación pueden aplicarse a otras plantas de cultivo y especialmente a otras plantas de cultivo adaptada a clima cálido (plantas o cultivos que han evolucionado en condiciones cálidas [es decir, zonas de temperatura tropical, subtropical o cálida] y cuyo metabolismo está optimizado para dichos climas). Debe entenderse que las composiciones que potencian la fotosíntesis de la presente divulgación deben encontrar utilidad siempre que se cultive un cultivo particular en una condición que limite su crecimiento. Por ejemplo, siempre que se cultive un cultivo vegetal particular a una temperatura (o en parámetros ambientales) que esté por debajo de su temperatura óptima para la fotosíntesis y/o su crecimiento. Dichas temperaturas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las temperaturas óptimas para la germinación del maíz, soja, arroz y algodón son 30 °C, 34-36 °C, 30-32 °C y 34 °C, respectivamente. Las temperaturas mínimas de germinación (o temperaturas base) para estos cultivos son 9 °C, 4 °C, de 8 a 10 °C y 14 °C, respectivamente, mientras que las temperaturas máximas de germinación son 40 °C, 42-44 °C, 44 °C y 37 °C, respectivamente. Las composiciones de la presente divulgación, por lo tanto, encuentran utilidad, entre otras cosas, en la potenciación de la fotosíntesis de cultivos adaptados a clima cálido cuando se cultivan a temperaturas entre su temperatura base para la fotosíntesis y/o su crecimiento. Las composiciones de la presente divulgación encuentran utilidad, en general, en la potenciación de la tasa de fotosíntesis y/o el crecimiento de plantas de cultivo cuando se cultivan en condiciones que retardan o inhiben la fotosíntesis y/o el crecimiento de las mismas. Ejemplos no limitantes de dichas condiciones inhibitorias (que se conocen a partir de su inhibición de la señalización en interacciones de bacterias-legumbres, su inhibición o retardo de la relación simbiótica de bacterias-plantas) incluyen estrés de pH, estrés térmico y escasez de agua.

No obstante, se reconocerá que las composiciones y los procedimientos de la presente divulgación también pueden potenciar el crecimiento de plantas cultivadas en condiciones óptimas.

40 Por tanto, las composiciones y los procedimientos de la presente divulgación no deben limitarse a plantas que crecen en condiciones sub-óptimas.

45 La expresión "condiciones ambientales que inhiben o retardan la relación simbiótica de bacterias-plantas" debe interpretarse en el presente documento como designando condiciones ambientales que posponen o inhiben la producción y el intercambio de moléculas de señalización entre las mismas e incluyen, sin limitación: condiciones que provocan estrés a la planta, tales como estrés térmico, escasez de agua, estrés de pH, así como concentraciones inhibitorias de nitrógeno en el suelo o de nitrógeno fijado.

50 "Una cantidad agrícola eficaz de una composición" para aumentar el crecimiento de plantas de cultivo de acuerdo con la presente divulgación se refiere a una cantidad que es suficiente para producir una potenciación estadísticamente significativa de la tasa fotosintética, del crecimiento y/o del rendimiento (por ejemplo, proteína o producción de grano) del cultivo vegetal en comparación con la tasa fotosintética y/o el crecimiento y/o el rendimiento del cultivo vegetal tratado con control. Como se observará a continuación, la actividad promotora fotosintética y/o del rendimiento de los LCO se puede observar sobre un amplio intervalo de concentraciones. De hecho, las actividades promotoras de la tasa fotosintética de LCO pueden observarse a una concentración aplicada

de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-4} M, preferentemente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} M y más preferentemente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-10} M. Como se muestra en el presente documento, sin embargo, la mejor concentración promotora de la tasa fotosintética de LCO depende de las condiciones de crecimiento (por ejemplo, controladas frente a ambientales) y de la planta tratada. Un experto en la materia será capaz de adaptar el intervalo o la concentración real de LCO en la composición para satisfacer sus necesidades.

Aunque se prefiere un procedimiento directo de inoculación con la composición de la presente divulgación, también puede emplearse un procedimiento indirecto. Durante la inoculación directa, la composición se aplica directamente a la planta y preferentemente por aplicación foliar. Esto puede conseguirse, por ejemplo, pulverizando las hojas. El procedimiento indirecto de inoculación se basaría en una aplicación de un rizobio que expresa un LCO de la presente divulgación a la planta.

Las aplicaciones foliares tales como tratamientos de pulverización de las hojas son bien conocidas en la técnica. Por supuesto, el procedimiento de administración de una composición de la presente divulgación a las hojas puede adaptarse por un experto en la materia para cumplir necesidades particulares.

El momento en que las composiciones y procedimientos de la presente divulgación son eficaces en la potenciación de la fotosíntesis y/o del crecimiento y/o del rendimiento de una planta, de acuerdo con la presente divulgación, es tan pronto como hay una hoja presente hasta la madurez fisiológica de la planta. Más particularmente, la administración de la composición debe producirse entre la fase de plántula y las fases tardías de llenado de las vainas. Por tanto, la administración puede producirse durante las fases de plántula, floración y llenado de las vainas.

El enunciado "condiciones de estación corta" se refiere ampliamente en el presente documento a temperaturas de las regiones intermedias y templadas y más cortas. Típicamente, la estación de crecimiento activo es aproximadamente 1/2 a 2/3 del año. Las condiciones de estación corta se refieren ampliamente al periodo libre de heladas de menos de la mitad del año, a menudo del orden de 100 días sin heladas.

Por "gen de nodulación inductor " o "gen nod inductor" se entiende genes bacterianos implicados en el establecimiento y la función de los nódulos.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito en líneas generales la divulgación, ahora se hará referencia a los dibujos adjuntos, que muestran a modo ilustración un caso preferido de la misma, y en los que:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otros objetivos, ventajas y características de la presente divulgación llegarán a ser más evidentes tras leer la siguiente descripción no restrictiva de los casos preferidos con referencia a los dibujos adjuntos, que es ejemplar y no debe interpretarse como limitante del alcance de la presente divulgación.

Descripción detallada

La investigación presentada en el presente documento se realizó para estudiar los efectos de aplicaciones foliares de LCO sobre las tasas fotosintéticas de una planta hospedadora (soja) y plantas no hospedadoras (arroz, melón, colza y maíz) en condiciones de invernadero. Además, se realizaron experimentos de campo para estudiar el efecto de la aplicación de LCO sobre la fotosíntesis en maíz, uva, manzana y soja. También se realizaron experimentos de campo a través del examen del rendimiento y de los componentes de producción.

Durante el curso del trabajo sobre la capacidad de los LCO para estimular la germinación de semillas de las plantas, se observó que plántulas que quedaban expuestas a una composición que comprende LCO, después de la germinación, seguían creciendo más rápido. Por tanto, se estudió anteriormente la posibilidad de que una aplicación de LCO a las hojas de las plántulas aumentara sus tasas fotosintéticas, conduciendo a tasas más rápidas de crecimiento. De ese modo, se demostró que los LCO aumentan las tasas fotosintéticas y/o el rendimiento de plantas en general, como se ejemplifica tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo con varias plantas evolutivamente divergentes.

El oligosacárido de lipoquitina (LCO) nod Bj V (C18:1, MeFeu) aislado de *Bradyrhizobium japonicum* 532C se evaluó para su efecto sobre las tasas fotosintéticas de varias plantas de cultivo que pertenecen a diversas familias botánicas: soja (*Fabaceae*), maíz, arroz (*Poaceae*), melón (*Cucurbitaceae*), colza (*Brassicaceae*), manzana (*Rosaceae*) y uva (*Vitaceae*). El LCO potenció la fotosíntesis de todas las plantas ensayadas. Sin embargo, el grado de las respuestas dependía de la especie de la planta y de la concentración de LCO usada. En condiciones de invernadero, la soja (*Fabaceae*) mostró el mayor aumento en la fotosíntesis debido a pulverización con LCO; de promedio, hubo un aumento del 50 % en la tasa fotosintética. Como la aplicación de LCO provocaba la abertura aumentada de los estomas sin ningún aumento en la concentración interna de CO₂ en las hojas, los datos indican que había un aumento en la captación de CO₂ por los cloroplastos, que conduce a abertura aumentada de los estomas. Las plantas pulverizadas con LCO tenían más área foliar y peso seco que los controles pulverizados con agua. En condiciones de campo, se ensayó la pulverización con LCO en plantas de soja, maíz, manzana y uva. En el caso de soja, la pulverización aplicada en la fase de plántula, floración y llenado de las vainas, produjo una cantidad aumentada de ramas, área foliar, cantidad de vainas, materia seca de la planta y producción de grano. La aplicación de LCO potenció la producción de grano en un 33-44 %. Los datos ilustran que los LCO pueden usarse para aumentar la productividad de un amplio intervalo de cultivos.

La presente invención se ilustra en detalle adicional por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

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

Cultivo bacteriano

Se cultivó *Bradyrhizobium japonicum* (cepa 532C) a 28 °C en medio de manitol de levadura (YEM) (manitol 10 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, NaCl 0,1 g, extracto de levadura 0,4 g y agua destilada 1000 ml), pH 6,8, se agitó a 150 rpm hasta que se alcanzó DO₆₂₀ 0,4-0,6 (4-6 días) en la oscuridad. Después de ello, se iniciaron 2 l de subcultivo bacteriano inoculando el material del primer cultivo (5 ml del primer cultivo por 250 ml de medio YEM), durante 5-7 días (DO₆₂₀ - 0,8-1,0), como anteriormente. En esta fase, se añadieron 0,25 ml de genisteína 50 µM (en metanol) a cada 250 ml de subcultivo bacteriano (concentración de genisteína de 5 µM) y el cultivo se incubó durante 48-96 horas.

Extracción de LCO

Dos litros de subcultivo bacteriano se repartieron en fases frente a 0,8 l de 1-butanol de calidad HPLC agitando durante una noche. La capa superior de butanol se transfirió a un matraz de evaporación de 1 l y se concentró hasta 2-3 ml de material viscoso marrón claro con un rotavapor funcionando a 80 °C (Yamota RE500, Yamato, EE. UU.). Este extracto se resuspendió en 4 ml de acetonitrilo al 18 % y se mantuvo en la oscuridad a 4 °C en un vial de vidrio sellado hasta su uso. El análisis por HPLC (Waters, MA, EE. UU.) se realizó con una columna en fase inversa Vydac C18 (Vydac, CA, EE. UU.; catálogo n.º 218TP54) con un caudal de 1,0 ml min⁻¹ y una columna de protección Vydac (catálogo n.º 218GK54). Como medida inicial se procesó acetonitrilo al 18 % (AcN/ H₂O; p/p) a través del sistema durante al menos 10 min. antes de la inyección. La muestra se cargó y se realizó elución isocrática con AcN al 18 % durante 45 min. para retirar todas las fracciones ligeras no polares. Después de ello, se realizó elución en gradiente durante 90 min. con AcN al 18-82 %. El LCO se eluyó a los 94-96 min. de tiempo de procesamiento por HPLC.

La identidad química del LCO se confirmó por análisis en espectrómetro de masas (EM-EM) como Nod Bj V (C18:1 MeFeu) (R. Carlson, Complex Carbohydrate Research Centre, University of Georgia, Athens, EE. UU.) y por ensayo de deformación de los pelos de la raíz (Prithiviraj y col., 2000).

Material vegetal

En resumen, se esterilizaron de forma superficial semillas de soja (cv AC Bravor) con hipoclorito sódico al 2 % durante 2 min. y se lavaron con al menos cuatro cambios de agua destilada estéril. Las semillas después se colocaron en agar con agua al 1,5 % (20 ml) en placas Petri de 9 cm de diámetro (dos semillas por placa). Las placas Petri se incubaron en la oscuridad a 25 °C durante 7-8 días; durante este tiempo, las semillas germinaron y desarrollaron raíces primarias y laterales en la superficie de agar. Las raíces laterales con abundantes pelos absorbentes, que podían distinguirse fácilmente por el aspecto esponjoso que conferían a las raíces laterales, se escindieron con un escalpelo estéril. Estas raíces laterales se colocaron en portaobjetos de vidrio sin engrasar estériles que contenían 40-60 µl de solución de LCO. Los portaobjetos después se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron durante 24 h a 25 °C en la oscuridad. Al final del tiempo de incubación, los portaobjetos se

retiraron y se fijaron las raíces en una solución de tinción [azul de metileno (0,02 % p/v) + glicerol (20 % v/v) + fenol (10 % p/v)]. Los portaobjetos se observaron en un microscopio óptico para la deformación de los pelos de la raíz.

Ejemplo 2

Tratamiento con LCO y recogida de datos para los experimentos en invernadero

5 Tratamiento de las plantas

Se esterilizaron superficialmente semillas de soja (cv Bayfield) con hipoclorito sódico al 2 % durante 3-4 min., se lavaron con varios cambios de agua destilada estéril y germinaron en placas de plástico que contenían vermiculita estéril. Las plántulas en la fase de dos hojas, aproximadamente siete días después de plantarlas, se trasplantaron a macetas de plástico de 15 cm que contenían Promix (Premier Brands Inc., New Rochelle, NY, EE. UU.). Las macetas se colocaron en un invernadero mantenido a 25 ± 2 °C con un ciclo de día/noche de 16/8 horas. Las plantas se regaron según lo necesario.

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

15 Tratamiento con LCO

Se prepararon concentraciones de LCO (10^{-6} M - 10^{-12} M) con agua destilada que contenía Tween 20 al 0,02 %. También se aplicó un tratamiento de control, que contenía Tween 20 al 0,02 %, pero no LCO. Como las tasas de crecimiento y de desarrollo diferían entre las especies de plantas usadas en los experimentos, se realizó tratamiento por pulverización en diferentes momentos después de la siembra. En general, la pulverización se aplicó cuando las plantas eran suficientemente grandes para permitir mediciones fáciles de las tasas fotosintéticas foliares. A continuación, se dan las edades de las plantas cuando se realizaron las pulverizaciones: soja 21 días después de la siembra (DAP), maíz 25 DAP, arroz 45 DAP, melón (35 DAP) y colza 30 DAP. Las plantas se pulverizaron con soluciones de LCO hasta empaparlas. Las pulverizaciones se aplicaron con un atomizador (Nalgene, EE. UU.). Cada planta requirió 2-3 ml de solución de pulverización. Cada tratamiento se replicó al menos cinco veces y se organizó en una bancada del invernadero en un diseño de bloque completamente aleatorio. Cada experimento (con cada especie de cultivo) se repitió al menos dos veces.

20 Recogida de datos

La fotosíntesis se registró cada 24 h usando un sistema de fotosíntesis portátil Li-Cor 6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EE. UU.) durante 6 días. En el caso de la soja, la fotosíntesis en la segunda hoja nodal de la parte superior se registró mientras en las otras especies usadas en la tasa fotosintética se midió para la hoja totalmente expandida más superior. Las plantas de soja se recogieron después de 7 días de tratamiento con LCO y se secaron a 80 °C durante 48 h. Los datos se analizaron con el sistema de análisis estadístico (SAS Inc., NC, EE. UU.). Se calculó el porcentaje de aumento en la fotosíntesis sobre el control. Se realizaron múltiples comparaciones de las medias con un ensayo LSD protegido por ANOVA, por tanto, el ensayo LSD no se realizó si el ensayo ANOVA no indicaba la presencia de diferencias debido al tratamiento.

Ejemplo 3

Experimentos de campo (año 1999)

40 Soja

El experimento con soja se realizó en el Lods Agronomy Research Centre, McGill University, Macdonald Campus, Ste-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá durante el periodo de junio a septiembre, 1999. Se siguió un diseño de bloques completamente aleatorio con tres bloques. El tamaño de maceta era de 2 x 4 m con un espaciado de una fila a otra de 25 cm y 10 cm entre las plantas dentro de una fila. Las semillas de soja (cv OAC Bayfield), tratadas con inoculante de *Bradyrhizobium japonicum* comercial (Bios Agriculture Inc., Quebec, Canadá) a la tasa de 3 g por kilogramo de semilla, se plantaron a mano.

A los 25 días después de la siembra, se marcaron de forma aleatoria veinte plantas en cada maceta y se pulverizaron hasta empaparlas con soluciones de LCO (10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} M) que contenían Tween 20 al 0,02 % con un pulverizador manual. Las plantas en cada lado, dentro de la fila, de las plantas marcadas también se pulverizaron. Se realizó una segunda pulverización en la fase de floración y una tercera pulverización en el llenado de las vainas.

50 Manzana, uva y maíz

Estos experimentos se realizaron en la instalación de investigación hortícola de McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá durante julio de 2000. Se prepararon LCO de diferentes concentraciones (10^{-8} y 10^{-10} M)

como se describe anteriormente. Las ramas de manzana (cv Empire) y uvas (cv De Chaunac) se pulverizaron con LCO y se observó la fotosíntesis cada 24 h durante cinco días con un sistema de fotosíntesis portátil Li-Cor 6400 (Li-Cor Inc., EE. UU.). Cada tratamiento se aplicó a tres ramas de la misma planta. Se tubo cuidado de asegurar que las ramas estuvieran al mismo nivel y orientación. Parte de cada rama se pulverizó con LCO y la parte restante sirvió como control. La parte de control de rama se pulverizó con agua destilada que contenía la misma cantidad de Tween 20 que la solución de tratamiento de LCO. Se tomaron observaciones sobre 15 hojas por réplica para cada tratamiento. Tanto para manzana como para uva, se repitió el procedimiento completo dos veces sobre dos plantas diferentes.

Se establecieron macetas de maíz en una única fila (Pioneer 3921) durante las estaciones de cultivo de 1999 y 2000. Las filas estaban separadas 75 cm y había un promedio de 20 cm entre las plantas. Las plantas se pulverizaron a 40 DAP. Las tasas fotosintéticas se registraron cada día durante 5 días después de la aplicación de la pulverización. Sin embargo, no fueron posibles las múltiples pulverizaciones de LCO en maíz debido a las limitaciones de los suministros de LCO, y como solamente se usó una fila de macetas no se registraron los rendimientos.

15 **Recogida de datos de campo**

Como con los experimentos en interior, las lecturas fotosintéticas se tomaron cada día durante cinco días después de la aplicación de LCO. Para la soja, se recogieron datos adicionales de desarrollo y agronómicos. La primera recolección se realizó a los 25 días después del primer tratamiento de pulverización. Se recolectaron cinco plantas de cada maceta y se analizaron las siguientes variables de crecimiento: altura de la planta, cantidad de ramas, cantidad de hojas, área foliar, cantidad de agrupaciones florales, cantidad de vainas, cantidad de nódulos, pesos secos de las hojas, de los tallos y de las raíces. La recolección final se realizó después de la madurez fisiológica de las plantas (Fehr y col., 1971); en este momento las quince plantas restantes tratadas de cada maceta se recolectaron y se recogieron los datos de la cantidad de ramas, cantidad de vainas, cantidad de semillas y producción de grano por planta.

25 **Ejemplo 4**

Efecto de los LCO sobre la tasa fotosintética de soja y de plantas no leguminosas en condiciones de invernadero

La pulverización con LCO aumentó la tasa fotosintética de soja incluso a concentraciones muy bajas (Tabla 1).

30 **Tabla 1. Efecto de oligosacárido de lipo-quitina (Nod Bj V (C18:1, MeFeu)) sobre la fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) de soja en condiciones de invernadero**

Tratamiento	Días después del tratamiento				
	1	2	4	5	6
Control	11,2 d@	8,1 c	10,1 d	12,1 c	10,4 a
10 ⁻⁶	14,9 ab	12,1 a	16,2 a	16,7 ab	13,1 a
10 ⁻⁷	12,1 cd	9,1 bc	12,9 bcd	14,1 bc	11,1 a
10 ⁻⁸	13,8 b	8,1 bc	12,3 cd	16,4 ab	10,3 a
10 ⁻⁹	15,8 a	8,4 bc	15,7 ab	17,5 ab	11,2 a
10 ⁻¹⁰	13,6 bc	8,7 bc	14,6 abc	16,9 ab	11,2 a
10 ⁻¹¹	14,0 b	8,7 bc	17,4 a	17,9 a	12,5 a
10 ⁻¹²	15,0 ab	10,3 ab	16,9 a	17,0 ab	12,0 a
LSD (p<0,05)	1,67	2,24	3,15	3,78	2,87

@ las medias, dentro de la misma columna, seguidas por la misma letra son no significativamente diferentes (p < 0,05) por ensayo LSD protegido por ANOVA

La tasa de fotosíntesis aumentó desde el día 1 hasta el día 4 después de lo cual disminuyó y en el día 5 generalmente alcanzaba niveles no diferentes de las plantas de control. Sin embargo, el aumento máximo en la fotosíntesis se observó en el día 4 en la mayoría de los tratamientos. El porcentaje de aumento en la fotosíntesis sobre el control varió con la concentración de la pulverización de LCO (Fig. 1). El LCO a 10¹¹ M causaba el mayor aumento en la tasa fotosintética seguido por 10¹² M, produciéndose estos máximos a los cuatro días después del tratamiento, mientras que otras concentraciones causaban aumentos más sostenidos en la fotosíntesis, que permanecían más altos que el control durante periodos más prolongados de tiempo. Los tratamientos con LCO causaban un aumento en el área foliar y en el peso seco de la soja a los siete días después del tratamiento (Fig. 2 y 3). Los pesos secos de los brotes de las plantas tratadas eran estadísticamente (p<0,05) mayores que los de las plantas de control, mientras que las áreas foliares estaban solamente aumentadas numéricamente (p=0,09).

El tratamiento con LCO también potencia las tasas fotosintéticas de plantas no leguminosas: maíz (Fig. 4), arroz (Fig. 5), colza (Fig. 6) y melón (Fig. 7). Fue obvio que los días para el aumento máximo y la concentración más

eficaz de LCO diferían entre las especies. En general, era común un aumento del 10-20 % en la fotosíntesis. Para las plantas C₃ (arroz, melón, colza) las tasas fotosintéticas aumentadas estaban siempre acompañadas por un aumento concomitante en la conductancia estomática y la transpiración mientras que la concentración de CO₂ intercelular no se veía afectada por los tratamientos. Para el maíz (una planta C₄) la aplicación de LCO aumentaba la tasa fotosintética, disminuía la concentración de CO₂ interno foliar y no alteraba significativamente la abertura de los estomas. Estos datos respaldan que el aumento en la tasa fotosintética se debía a un aumento en la captación fotosintética de CO₂ dentro de las hojas que, en el caso de plantas C₃, desencadenaba un aumento en la abertura de los estomas. Si hubiera sido el caso de que la abertura aumentada de los estomas fuera la causa principal de las tasas fotosintéticas aumentadas se habría esperado aumentos en la concentración de CO₂ interno de las hojas (Morison, 1998).

Ejemplo 5

Efecto de los LCO sobre la tasa fotosintética, el crecimiento y el rendimiento de soja y de plantas no leguminosas cultivadas en condiciones de campo (año 1999)

Uva; manzana y maíz

La pulverización con LCO también causó aumentos en las tasas fotosintéticas de manzana y uva cultivadas en campo (Fig. 8 y 9). En el caso de la manzana, el aumento de la fotosíntesis conseguía su máximo a los cinco días después del tratamiento; el tratamiento con LCO 10⁻⁸ M producía una tasa fotosintética de 14,1 μmol CO₂ m⁻²s⁻¹, mientras que la tasa era de 10,8 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para el control. Como con los otros cultivos, hubo aumentos en la conductancia estomática son ningún efecto sobre el Ci. El tratamiento con LCO también aumentó la transpiración (Fig. 6) En uvas, el aumento máximo en la tasa fotosintética se producía tres días después del tratamiento con el tratamiento con LCO 10⁻⁹ M, y esto producía un aumento concomitante en la conductancia estomática. La aplicación de LCO aumentaba la tasa fotosintética de maíz cultivado en campo en un máximo de aproximadamente el 10 % (Fig. 10) a los dos días después de la aplicación del tratamiento. Aunque la aplicación de LCO causaba niveles reducidos de Ci en invernadero (p = 0,05) no hubo dicho efecto en Ci en plantas cultivadas en campo.

Soja

En general, las respuestas fotosintéticas de la soja en el campo fueron similares a las observadas en condiciones de invernadero. El tratamiento con LCO produjo aumentos en las tasas fotosintéticas desde el día uno hasta el día cuatro después de la aplicación. La concentración más eficaz fue 10⁻⁶ M, que produjo una tasa fotosintética de 24 mmol m⁻² seg⁻¹ en el día tres en comparación con 20 mmol m⁻² seg⁻¹ para el control (Fig. 10). El aumento en la tasa fotosintética estuvo acompañado por aumentos en la conductancia estomática; de nuevo el tratamiento de LCO 10⁶ M producía los mayores valores de conductancia estomática. Sin embargo, el efecto del LCO en las plantas cultivadas en campo era menos pronunciado que para las plantas cultivadas en invernadero y requería una mayor concentración para efectos mejores. La necesidad de concentraciones mayores puede deberse a diferencias anatómicas de las hojas; las plantas cultivadas en campo habitualmente tienen cutículas más gruesas que las plantas cultivadas en invernadero. También puede haber sido el caso de que los microorganismos epífitos, o las propias hojas, puedan haber producido quitinasas que degradaban el LCO. Dada la probabilidad de niveles inferiores de actividad microbiana en condiciones de invernadero, ambas podían haber contribuido a la necesidad de concentraciones de LCO en el campo mayores que en el invernadero. El menor grado de respuesta en condiciones de campo puede haberse debido a la mayor variabilidad ambiental, una probabilidad aumentada de al menos alguna otra limitación estresante, al menos en algún momento, en las condiciones de campo. Raschke y col., (1979) observaron diferencias en la sensibilidad de los estomas al nivel de CO₂ entre maíz cultivado en invernadero y en campo. Asimismo, Talbot y col. (1996) mostraron diferencias en la sensibilidad de los estomas a CO₂ entre plantas cultivadas en vitrina y en invernadero. El tratamiento con LCO produjo una transpiración aumentada, probablemente debido a una abertura aumentada de los estomas.

La pulverización con LCO produjo un crecimiento aumentado de las plantas de soja. Hubo aumentos en las siguientes variables de crecimiento: cantidad de ramas, cantidad de hojas y área foliar. Sin embargo, la altura de la planta no se vio afectada por el tratamiento con LCO. También hay aumentos en las variables de rendimiento, cantidad de racimos de vainas por planta, cantidad de vainas y cantidad total de semillas por planta. Lo último produjo aumentos en la producción de semillas que variaban del 33,7 al 44,8 % (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del oligosacárido de lipo-quitina (Nod Bj V (C18:1, MeFeu)) sobre el área foliar y el peso seco de los brotes de soja en condiciones de invernadero

Tratamiento	Área foliar (cm ²)	Peso seco de los brotes (mg)
Control	188,0 ab@	951,6 b
10 ⁻⁶	223,6 a	1065,8 ab
10 ⁻⁷	193,6 ab	1135,2 a
10 ⁻⁸	217,6 ab	1095,7 ab
10 ⁻⁹	194,3 ab	999,9 ab
10 ⁻¹⁰	195,3 b	1012,3 ab
10 ⁻¹¹	202,6 ab	931,6 b
10 ⁻¹²	230,3 a	1060,8 ab
LSD (p<0,05)	36,2	168,3

@ las medias, dentro de la misma columna, seguidas por la misma letra son no significativamente diferentes (p < 0,05) por ensayo LSD protegido por ANOVA

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

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	N.º de ramas/planta	N.º de hojas/planta	Área foliar/planta (cm ²)	N.º de nódulos/planta	Peso seco de raíces/planta (g)	Peso seco de brotes/planta (g)	N.º de racimos de vainas/planta	N.º de vainas/planta	N.º de semillas/planta	Producción de semillas/planta (g)
Control	85,2	4,4	22,1	1388,1	60,1	2,0	19,0	18,6	33,5	80,9	15,7
LCO 10-6M	78,5	4,2	29,4	2306,3	63,5	3,0	24,7	24,3	42,9	104,7	22,1
LCO 10-8M	85,8	5,1	25,4	2120,4	84,6	2,3	23,7	24,8	42,4	106,3	21
LCO 10-10M	83,5	3,4	22,2	1513,1	68,3	2,3	19,8	28,3	48,0	118,1	22,6
Contraste (p<0,05):LCO frente a control	NS	*	*	**	NS	*	*	*	*	*	*

Los resultados presentados demuestran que la aplicación foliar del LCO Nod Bj (C1:18 MeFeu) causa fotosíntesis potenciada en plantas tanto hospedadoras como no hospedadoras. Para plantas C₃, el aumento de la fotosíntesis estaba siempre acompañado por aumentos en la conductancia estomática, aunque sin cambio en los valores de C_i, aunque para el maíz (una planta C₄) la abertura de los estomas no aumentaba y los valores de C_i disminuían en condiciones de invernadero. En ambos casos, los datos indican que los aumentos en la fotosíntesis debido al tratamiento con LCO se deben a una captación más eficaz de CO₂ dentro de las hojas. Para las plantas C₃, esto conduce a abertura aumentada de los estomas. Como los estomas de las plantas C₃ estaban más abiertos, hubo aumentos concomitantes en la transpiración para las hojas de plantas tratadas con LCO. Estos resultados fueron similares a los observados para la aplicación de glicina-betanina (Rajasekaran y col., 1997; Makela y col., 1999). La aplicación foliar de glicina-betanina potenciaba la fotosíntesis neta y la eficacia de uso de agua y mitigaba el estrés por sequía y salinidad. La conductancia estomática aumentada se ha correlacionado positivamente con el rendimiento en varios cultivos y ha sugerido que la selección de una conductividad estomática aumentada provocaría rendimientos potenciados (Lu y col., 1998; Morrison y col., 1999). La vinculación entre la abertura de los estomas y la tasa fotosintética parecería aplicarse en el caso de las plantas C₃ ensayadas en el presente documento, aunque está claro que, el caso de la aplicación de LCO, los estomas más abiertos serían el resultado de una mayor captación fotosintética de CO₂ por los cloroplastos, y no la causa principal de las tasas fotosintéticas aumentadas.

La fijación de dinitrógeno es un proceso muy energético. Aproximadamente el 10-20 % de los fotosintatos de una legumbre de fijación de nitrógeno se consumen en la fijación de N₂. Si esto no se compensara por un aumento en la fotosíntesis neta, conduciría a reducción en el rendimiento del cultivo en comparación con plantas que reciben fertilizante de nitrógeno, y dicha compensación fotosintética se ha demostrado (Imsade, 1983). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las plantas compensan la demanda aumentada durante estas y otras interacciones de plantas-microbios son desconocidos. Nuestro trabajo sugiere que esto podría estar controlado por las moléculas de señalización de bacterias a plantas de LCO. Varias líneas de evidencias sugieren que las plantas de soja noduladas tienen mayores tasas fotosintéticas netas que las que adquieren su nitrógeno de formas minerales disponibles en el medio de enraizamiento (Imsande, 1989a,b). Esto podría lograrse por aumento en la fotosíntesis debido a eficacia mejorada en las reacciones no dependientes de la luz o por eficacia potenciada de los fotosistemas presentados por Maury y col. (1993), o por ambas.

Recientemente, Phillips y col. (1999) aislaron lumicromo, un producto de descomposición de riboflavina, en la rizosfera de plantas de alfalfa durante la nodulación prematura y demostraron que causaba respiración y fijación de carbono fotosintético aumentados. En un experimento previo, se observó germinación potenciada y crecimiento prematuro de diversas plantas de cultivo debido al tratamiento con LCO (resultados no publicados) y esto nos condujo a formular la hipótesis de que LCO mejora el crecimiento prematuro a través de fotosíntesis aumentada. Los resultados del presente experimento apoyan la hipótesis anterior. La identificación de receptores de alta afinidad específicos para LCO sigue siendo esquiva. Sin embargo, se ha caracterizado dos clases de receptores de LCO recientemente (Stacey y col., 2000; Bono y col., 1995; Gressent y col., 1999). Esto nos condujo a formular la hipótesis de que uno de estos receptores está asociado con el proceso de nodulación y el otro con un proceso más generalizado que desencadena la maquinaria de crecimiento de las plantas cuando se exponen a quitina y a compuestos relacionados, tales como LCO. La observación de que esta estimulación se producía en dicha amplia diversidad de angiospermas (el trabajo presentado en el presente documento muestra los efectos en cinco familias de plantas, todas angiospermas: *Poaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*) sugiere que este mecanismo de respuesta a LCO es al menos tan antiguo como las angiospermas. Hay varios informes de la presencia de genes sensibles al factor nod en plantas no leguminosas tales como arroz (Kouchi y col. 1999; Reddy y col 1998). Estos pueden desempeñar una función en la detección de, y respuesta a, patógenos de plantas, muchos de los cuales contienen quitina en sus paredes celulares. Presumiblemente, el crecimiento más vigoroso es una respuesta a la presencia de un patógeno detectado. Hay varios informes de fotosíntesis potenciada debido a patógenos fúngicos (Ayers, 1979; 1981), esto podría deberse a las respuestas de estrés de la planta y podría estar mediado por fragmentos de pared celular que son oligómeros de quitina.

El fenómeno de fotosíntesis y rendimiento potenciados debido a la aplicación de LCO, como se observa en este estudio, podría explicar, al menos en parte, la productividad aumentada de sistemas de cultivos intercalados de leguminosas-no leguminosas y rotaciones de cultivo. Hungría y Stacey (1997) informaron de crecimiento y rendimiento potenciados de cultivos intercalados de maíz y alubias en comparación con los monocultivos y postularon que este aumento podría deberse a la estimulación recíproca de *A. lipoferum* y *R. tropici* en el suelo por los exudados de las raíces de maíz y de alubia. Según nuestro conocimiento, este es el primer informe de la potenciación por LCO de la fotosíntesis en plantas de leguminosas y no leguminosas. Los LCO, además de mediar los eventos prematuros de la nodulación, también actúan como señales para la fotosíntesis potenciada en varias plantas y esto abre la posibilidad del aprovechamiento de estas moléculas de señalización para mejorar la producción de cultivos y, finalmente, la producción mundial de alimentos.

Ejemplo 6

Efecto de los LCO sobre la tasa fotosintética de soja y maíz cultivados en condiciones de campo (año 2000)

Rhizobium leguminosarum (127K105) y *Sinorhizobium meliloti* (RCR 2011) se cultivaron en medio mínimo de

Bergerson modificado (Spaink y col., 1992) durante cuatro días, cuando la DO₆₂₀ del cultivo había alcanzado 0,37 para *S. meliloti* y 0,28 para *R. leguminosarum*, se añadió isoflavonoide nariginina a *R. leguminosarum* hasta una concentración final de 5 µM y se añadió luteolina 5 µM a *S. meliloti*. Los cultivos se incubaron adicionalmente durante cinco días y se extrajeron usando el procedimiento descrito para *Bradyrhizobium japonicum*. El LCO de *R. leguminosarum* eluyó a 27-31 min. del procesamiento por HPLC mientras que el de *S. meliloti* eluyó a 35-38 min.

El LCO de *R. leguminosarum* potenció la fotosíntesis de soja y fue más eficaz en comparación con el LCO de *S. meliloti*. El LCO de *S. meliloti* potenció la fotosíntesis del maíz (Tablas 4 y 5).

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

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

En la columna, los números seguidos por las mismas letras son no significativamente diferentes (p < 0,05) por ensayo LSD protegido por ANOVA.

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

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

En la columna, los números seguidos por las mismas letras son no significativamente diferentes (p < 0,05) por ensayo LSD protegido por ANOVA.

La Tabla 6 muestra el efecto de la pulverización foliar de LCO sobre el rendimiento de soja durante el año 2000. El LCO potencio todos componentes del rendimiento, LCO a 10⁻⁶ M y 10⁻¹⁰ M mostraron los efectos máximos. LCO 10⁻⁶ M mejoró el rendimiento en aproximadamente un 60 %. El aumento en el rendimiento se debía al aumento en la cantidad de vainas/planta. El peso por 100 semillas no aumentó por pulverización con LCO durante la temporada de campo del año 2000.

Tabla 6. Efecto de LCO sobre el rendimiento de soja (temporada de cultivo del año 2000)

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

En las columnas, los números seguidos por las mismas letras son no significativamente diferentes (p < 0,05) por ensayo LSD protegido por ANOVA.

Los rendimientos son al 0 % de humedad en la semilla.

Los rendimientos se calcularon muestreando 10 plantas seleccionadas aleatoriamente por maceta, determinando el rendimiento por planta y asumiendo una masa promedio de 500.000 plantas por ha.

5 Tomados en conjunto, los resultados de las Tablas 4 y 5 muestran que los efectos promotores de la tasa fotosintética observados con el LCO NodBj-V(C_{18:1}, MeFeu) de *B. japonicum* durante los experimentos del año 1999 también son observables con los LCO obtenidos de otros rizobios. Por tanto, la adición de la cepa de rizobio promiscua NGR234, que se sabe que promueve la nodulación de una amplia gama de legumbres u otras, también se espera que potencie la tasa fotosintética de plantas de forma similar a los datos presentados en el presente documento.

10 Los datos sobre el efecto de la pulverización foliar de LCO sobre el rendimiento de soja durante el año 2000 también muestran un efecto de aumento del rendimiento, similar al mostrado en el año 1999. Más específicamente, en el año 2000, la aplicación de LCO potenció las vainas por planta y la producción de semillas. Los datos sugieren que (1) el LCO a 10⁻⁶ M mostraba el efecto máximo; (2) el LCO a 10⁻⁶ M mejoraba el rendimiento en más del 100 %; y (3) el aumento en el rendimiento se debía al aumento en la cantidad de vainas por planta.

15 Cabe señalar que las temporadas de cultivo del año 1999 y 2000 fueron muy diferentes. En comparación con una temporada de cultivo promedio, 1999 fue un año caluroso y seco mientras que el 2000 fue un año frío y húmedo.

Tomados junto con los resultados del año 1999 de los efectos de la aplicación de LCO sobre la tasa fotosintética y sobre el rendimiento, los del año 2000 muestran que el efecto de LCO sobre los mismos es robusto sobre una amplia gama de condiciones ambientales.

20 También debe observarse que la aplicación de LCO en los experimentos de campo en el año 2000 fue pulverizando parcelas completas, en oposición a plantas individuales (1999). Por tanto, los efectos del LCO descritos en la presente divulgación también son observables cuando se usan procedimientos de aplicación de gran producción.

Conclusión

25 La presente divulgación demuestra que la composición de LCO puede potenciar significativamente la tasa fotosintética de plantas leguminosas y no leguminosas cultivadas en condiciones de laboratorio (por ejemplo, condiciones de invernadero). Además, estos resultados de condiciones de invernadero se validan en campo usando soja, uva, maíz y manzana. Se demuestra adicionalmente que el efecto del LCO es observable con diferentes LCO, validando de ese modo la actividad potenciadora de la tasa fotosintética de los LCO en general. Además, la presente divulgación muestra que el efecto potenciador de la tasa fotosintética de los LCO en plantas es robusto en las condiciones ambientales de campo. Los aumentos similares en las tasas fotosintéticas y el rendimiento para el cultivo ensayado (por ejemplo, soja) implica que se deben esperar aumentos en el rendimiento de la aplicación de LCO en una amplia gama de cultivos. La presente divulgación, por tanto, proporciona composiciones agrícolas y procedimientos por los que pueden usarse LCO para potenciar la tasa fotosintética, el crecimiento y el rendimiento de un cultivo en condiciones de campo controladas y diversificadas.

Referencias

- 35 Ayres, PG. 1979, En. Marcelle, R., Clijsters, H., van Poucke, M., Ed. Photosynthesis and Plant Development pág. 343-354. W. Junk, The Hague, Países Bajos.
 Ayres, PG. 1981, Journal of Phytopathology 100:312-318.
 Bono y col., 1995, Plant Journal 7:253-260.
 Boone y col., 1999, Carbohydrate Research 317:155-163.
 40 Denarie y col., 1993, Cell 74:951-954.
 Evans LT., 1975, En L.T. Evans (ed) Crop Physiology. Cambridge Univesity Press, Cambridge, pág. 327-355.
 Evans LT., 1980, American Scientist 68:388-397.
 Fay y col., 1996, New Phytologist 132:425-433.
 Fehr y col., 1971, Crop Science 2:929-930.
 45 Fisher y col., 1992, Nature 357:655-660.
 Gressent y col., 1999, Proceedings of National Academy of Sciences, EE. UU. 96:4704-4709.
 Horvath y col., 1993, Plant Journal 4:727-733.
 Hungria y col., 1997, Soil Biology and Biochemistry 29:819-830.
 Imsande, J., 1989, Journal of Experimental Botany 39:1313-1321.
 50 Imsande, J., 1989, Agronomy Journal 81:549-556.
 Inui y col., 1997, Bioscience Biotechnology Biochemistry 61:975-978.
 Kondorosi A., 1991, En: Advances in Molecular Genetics of Plant -Microbe interactions. H. Hennecke and D.P.S. Verma, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
 Long SR., 1989, Cell 56:203-214.
 55 Lu y col., 1998, Journal of Experimental Botany 49:453-460.
 Makela y col., 1999, Physiologia Plantarum 105:45-50.
 Maury y col., 1993, Plant Physiology 101:493-497.
 Minami y col., 1996, Molecular Plant-Microbe Interact 9:574-583.

- Morison, J., 1998. *Journal of Experimental Botany* 49:443-452.
- Morrison y col., 1999, *Agronomy Journal* 91:685-689.
- Moss y col., 1971, *Advances in Agronomy* 23:317-336.
- Neave y col., 1989, *Canadian Journal of Forest Research* 19:12-17.
- 5 Nonomura y col., 1992, *Proceedings of the National Academy of Science*, EE. UU. 89:9794-9798.
- Osborne, BA., 1989, *Plant, Cell and Environment* 12:941-946.
- Pichon y col., 1993, En: R. Palacios, J. Mora WE Newton eds. *New Horizons in Nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos pág. 285-290.
- Raschke, K., 1979, En: Haupt, W., Feinleib M.E. eds. *Physiology of movements*. Vol. 7 *Encyclopedia of Plant*
- 10 *Physiology*. Springer Verlag, Berlín 383-441.
- SAS Institute Inc. 1989. *SAS users guide*, Version 6, Cary, EE. UU. pág. 1673.
- Sasaki y col., 1995, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79:453-457.
- Schmidt y col., 1988, *Proceedings of National Academy of Sciences*, EE. UU. 85:8587-8582.
- Schulaman y col., 1997, *Development* 124:4887-4895.
- 15 Schultze y col., 1994, *Proceedings of National Academy of Sciences*, EE. UU. 92:2706-2709.
- Shabayev y col., 1996, *Biology and Fertility of Soils* 23:425-430.
- Spaink y col., 1991, *Nature* 354:125-130.
- Spaink y col., 1992, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:72-80.
- 20 Stacey y col., 2000, En: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol 2 pág. 120-125. Ed. P.J.G.M.de Wit, Ton Bisseling and W.J. Stietema.
- Staehelein y col., 1994, *Proceedings of National Academy of Sciences*, EE. UU. 91:2196-2200.
- Talbott y col., 1996, *Plant, Cell and Environment* 19:1188-1194.
- Thomas y col., 1983, *Crop Science* 23:453-456.
- Truchet y col., 1991, *Nature* 351:670-673.
- 25 Vance y col., 1991, *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:373-392.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende uno o más lipo-quitooligosacáridos para potenciar la tasa fotosintética de una planta.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende el uno o más lipo-quitooligosacáridos a una concentración entre aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 10^{-14} M.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende el uno o más lipo-quitooligosacáridos a una concentración entre aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende el uno o más lipo-quitooligosacáridos a una concentración entre aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente 10^{-10} M.
- 10 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición se aplica a la planta entre la fase de plántula y la fase tardía de llenado de las vainas.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es una legumbre.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es de la familia *Fabaceae*.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es soja.
- 15 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es una planta no leguminosa.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es de la familia *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malcaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Solonaceae* o *Vitaceae*.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es maíz.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es trigo.
- 20 13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es arroz.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es manzana, colza, uva o melón.
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7, 8 o 10 a 14, en el que la composición se aplica al follaje de la planta.

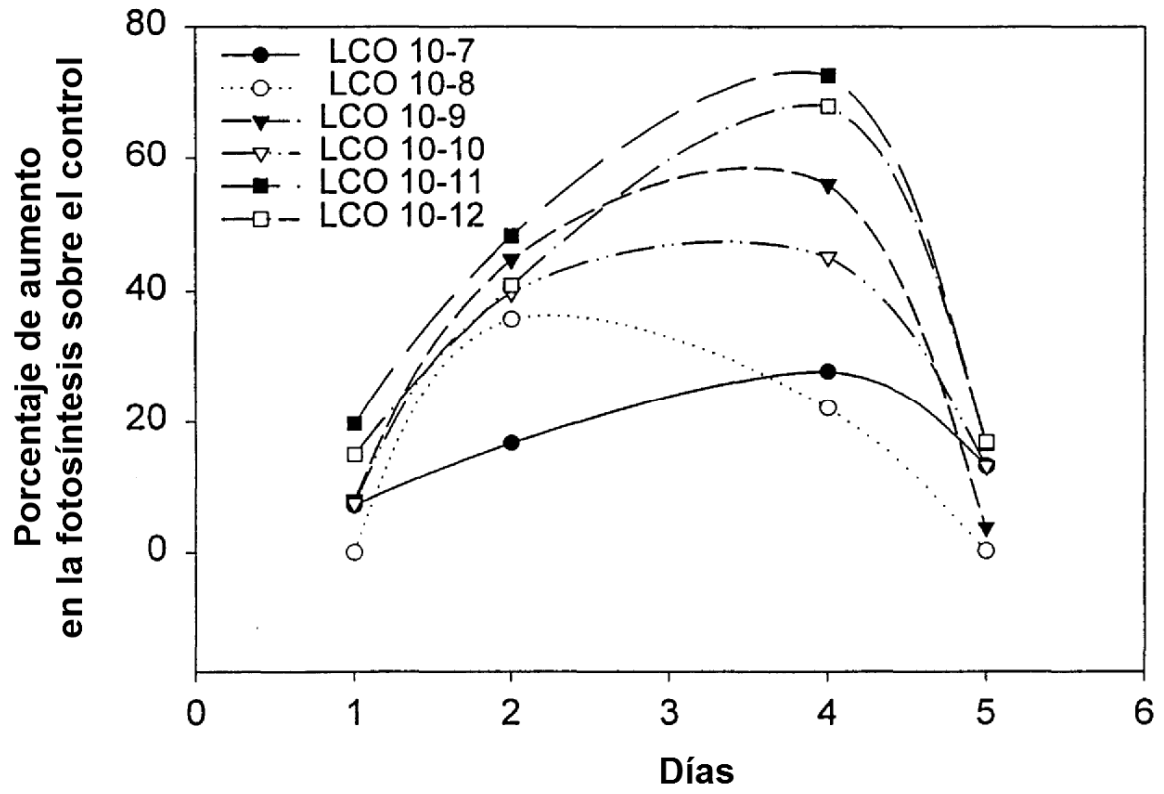


Fig. 1

