

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 701**

51 Int. Cl.:

A01P 21/00 (2006.01)

A01N 45/00 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2014 PCT/US2014/013766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2014 E 14746850 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2950633**

54 Título: **Métodos para inducir tolerancia a la sequía en cultivos**

30 Prioridad:

31.01.2013 US 201361759063 P

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**VALENT BIOSCIENCES LLC (100.0%)
870 Technology Way
Liberty, IL 60048, US**

72 Inventor/es:

**KAISER, ROGER;
OTT, ERIC;
SILVERMAN, PAUL;
WARGO, JIM;
BADENHOP, NEIL y
CHALIVENDRA, SUBBAIAH**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 705 701 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para inducir tolerancia a la sequía en cultivos

5

Campo de la invención

La presente invención se dirige de manera general a métodos para mejorar la tolerancia al estrés por sequía del maíz que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de giberelina 3 al maíz durante una etapa de crecimiento vegetativo temprana.

10

Antecedentes de la invención

La sequía es un estrés abiótico común que limita la productividad de todos los cultivos principales. Alrededor del 80% de las tierras agrícolas en los Estados Unidos experimentaron sequía en el año 2012, que impactó el 70-75% de la superficie de maíz y soja (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Económica, 2012). De acuerdo con las Naciones Unidas, la intensidad de la sequía es cada vez mayor a nivel mundial (Centro de Noticias de las Naciones Unidas, 2012). Incluso la sequía estacional leve o moderada en etapas de crecimiento críticas puede reducir el rendimiento en un 10-20% en granjas de secano o aquellas con irrigación limitada. De acuerdo con el Centro Nacional de Datos Climáticos, tanto la sequía moderada como la sequía severa a extrema se están volviendo más comunes. Junto con el agotamiento en aumento de los recursos hídricos, existe una necesidad de nuevos productos y soluciones para enfrentar el estrés por sequía. Se están usando varios enfoques con varios niveles de éxito para abordar este problema, entre los que se incluyen tratamientos agronómicos, técnicas tradicionales de cultivo de plantas, ingeniería genética y tratamientos químicos. Cada una de estas estrategias tiene beneficios potenciales, pero también limitaciones significativas.

15

20

25

Existe un número de prácticas culturales en la producción de cultivos que se diseñan para ayudar a evitar los efectos de la sequía. Un "escape de la sequía" puede emplearse mediante variedades de plantación adecuadas a comienzos de la estación de manera tal que maduren antes del comienzo de la sequía al final del verano. Una estrategia de "evasión de la sequía" puede usarse al seleccionar variedades vegetales con un sistema de raíz profunda, área de hoja reducida y/o cierre rápido de estoma. Estas estrategias pueden tener consecuencias no convenientes. El escape de la sequía comprende una estación de crecimiento desplazada o acortada, mientras que los mecanismos de evasión de la sequía pueden desviar carbono en sumideros que no se pueden cosechar. Los obtentores vegetales incorporan características de tolerancia a la sequía a los cultivos como una parte de programas regulares de mejora del rendimiento. Sin embargo, el proceso de cultivo es lento y laborioso incluso cuando se asiste mediante marcadores moleculares. Esfuerzos de cultivo recientes mediante la semilla han dado como resultado híbridos selectos con rendimiento mayor del 10-15% bajo sequía moderada.

30

35

La ingeniería genética ofrece herramientas precisas para alterar características vegetales. Desde finales de la década de 1990, la expresión transgénica de genes de "tolerancia a la sequía" se ha perseguido como un método para impulsar el rendimiento de cultivos bajo sequía. Por ejemplo, el maíz híbrido Monsanto Company's Genuity® DroughtGard™ se aprobó por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos para cultivo comercial. Este híbrido ha demostrado un aumento del rendimiento de ~6% bajo sequía moderada.

40

45

Los químicos que se han promocionado y usado comercialmente para aliviar los efectos de la sequía incluyen ácido abscísico, antitranspirantes, e inhibidores de crecimiento de triazol (por ejemplo, uniconazol). Por ejemplo, los antitranspirantes reduce el intercambio de gas y, de este modo, inhiben la pérdida de agua. Sin embargo, la reducción de intercambio de gas inhibe la fotosíntesis, y, de este modo, retarda el crecimiento vegetal. A pesar de que estos químicos pueden resultar efectivos para combatir la sequía, pueden no aceptarse para uso en los cultivos debido a efectos negativos en cuanto a rendimiento, coste, efectos laterales adversos, o duración de efecto breve.

50

Chunrong Wang et al., "Influence of water stress on Endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings", *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 50, nro. 4, páginas 427-434 (2008) divulgan un método para mejorar la longitud vegetal de plántulas de maíz mediante aplicación de giberelina 3. Cengiz Kaya et al., "Gibberellic acid improves water deficit tolerance in maize plants", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 28, capítulo 4, páginas 331-337 (2006) divulga que el ácido giberélico mejora la tolerancia a la deficiencia de agua en las plantas de maíz. El documento CN 102 674 944 divulga un método para promover la resistencia a la sequía en maíz. Akter Nurunnaher, "Improving drought tolerance in maize by exogenous application of gibberellic acid and cytokinin", Tesis de Maestría, Bangubandhu Sheikh Mujibar Universidad de Rahman (2010), M.A.K. Shaddad et al., "Interactive effects of drought stress and phytohormones or polyamines on growth and yield of two M (Zea maize) genotypes", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 2, nro. 6, páginas 790-807 (2011), y AM Ahmed et al., "Effects of phytohormones on carbohydrate and nitrogen metabolism of some drought stressed crop plants", *Journal of Islamic Academy of Sciences, Botany*, vol. 2, nro. 2, páginas 93-99 (1989) divulgan la aplicación de GA3 en maíz.

55

60

65

De acuerdo con esto, existe una necesidad de nuevos métodos para mejorar la respuesta de cultivos con respecto al estrés por sequía.

Resumen de la invención

5 La presente invención se dirige a métodos para mejorar la tolerancia al estrés por sequía del maíz que comprende la aplicación de 0,9 a 33 gramos por hectárea de giberelina 3 al maíz durante la etapa de crecimiento V2-V6 según se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

10 De manera inesperada, los solicitantes encontraron que cuando se aplica giberelina 3 (“ácido giberélico” o “GA3”) a plantas de maíz mediante aplicaciones en aerosol foliares durante el desarrollo vegetal entre las hojas segunda y sexta (etapas de crecimiento V2-V6) las plantas se vuelven más resistentes con respecto al estrés por sequía posterior. Esto resultó inesperado ya que una persona capacitada en el estado de la técnica pronosticaría que la aplicación de GA3 aumentaría la susceptibilidad de las plantas con respecto a la sequía. Las razones por las que este resultado resultó inesperado se explican a continuación.

15 Las giberelinas son hormonas vegetales de origen natural que se involucran en la mayoría de las fases de crecimiento y desarrollo vegetal incluyendo la germinación, proliferación celular, alargamiento celular, brotación, floración, determinación sexual, cuaje de frutos, desarrollo de semilla y senescencia (revisado en Olszewski et al., *Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways*, *The Plant Cell*, S61-S80, Suplemento 2002). El GA3 se conoce bien por su promoción del crecimiento vegetal y se ha usado en agricultura desde comienzos de la década de 1960. Los principales usos comerciales de las giberelinas incluyen la acción de rebajar y dimensionar las uvas de mesa sin semilla, mejora del tamaño del fruto y firmeza, estimulación de crecimiento y rendimiento aumentado de las hierbas de pasto, y desarrollo de floración en cultivos hortícolas (Sponsel, *A Companion to Plant Physiology*, Quinta Edición de Lincoln Taiz y Eduardo Zeiger, disponible en <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=0&id=372>, 2010).

20 Las giberelinas no se han utilizado en esfuerzos para mejorar la tolerancia a la sequía porque los efectos conocidos de las giberelinas en realidad enseñan a dejar de lado la mejora del estrés por sequía. En primer lugar, la aplicación de GA3 promueve el crecimiento de la hoja, aumentando, de este modo, la transpiración y el uso de agua, según se mostró por Larson, et al., *RyzUp® on Cotton: Report on Trials 1994-96*, Beltwide Cotton Conference, (1997). El uso aumentado de agua incrementa el potencial para estrés por sequía. En segundo lugar, la promoción de GA3 del crecimiento de la hoja puede ocurrir sin crecimiento radicular aumentado (por ejemplo, Nagel et al., *Growth rate and biomass partitioning of wildtype and low-gibberellin tomato (Solanum lycopersicum) plants growing at a high and low nitrogen supply*, *Physiologia Plantarum*, 111: 33-39. 2001). El aumento del crecimiento de hoja sin aumento de crecimiento de raíz aumenta también el potencial para el estrés por sequía en la planta debido a que la planta no tiene raíces adicionales para sostener el crecimiento vegetativo.

25 De manera adicional, debido a que las giberelinas promueven el crecimiento vegetal y las plantas de mayor tamaño tienden a usar más agua, han existido algunos intentos para reducir el estrés por sequía mediante giberelinas que se regulan negativamente. En el arroz, maíz y otros cultivos de cereales, GA3 se conoce particularmente por su efecto de alargamiento del vástago que puede conducir a fijación. Los genes ampliamente populares de la “revolución verde” (a saber, genes de enanismo) actúan al reducir los efectos de la giberelina y reducen así el crecimiento vegetal. Mientras que los genes de enanismo del trigo impiden la señalización de giberelina (Peng, et al., ‘Green Revolution’ Genes Encode Mutant Gibberellin Response Modulators, *Nature*, volumen 400, 1999), los genes *sd1* o *semi-dwarf1* en el arroz vuelven inactivas a las enzimas de biosíntesis de giberelina (Hedden, *The Genes of the Green Revolution*, *Trends in Genetics*, volumen 19, capítulo 1, 2003). A través de ya sea la inhibición genética de biosíntesis o señalización de giberelina, o químicos antigiberelina, se producen plantas más compactas. Se considera que las plantas más compactas deberían tolerar el estrés por sequía de mejor manera en comparación con las plantas de tamaño completo.

30 Además, los químicos que reducen el crecimiento vegetativo pueden minimizar la pérdida de plántula durante el transporte o después del trasplante de plántulas jóvenes mediante la reducción del tamaño de planta y la demanda de agua. Los inhibidores de crecimiento de biosíntesis de giberelina actúan en una de las cuatro etapas a lo largo de la trayectoria biosintética (Rademacher, *Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways*, Centro de Agricultura de BASF, 501-531, 2000). Los inhibidores de biosíntesis de giberelina de etapa 1 tales como el cloruro de chlormequat y cloruro de mepiquat son retardantes del crecimiento que actúan mediante la inhibición de la síntesis del precursor de giberelina *ent*-kaurene y se usan para reducir la fijación de pequeños granos y el crecimiento vegetativo en algodón, respectivamente. Por largo tiempo se ha sabido que el inhibidor de cloruro de chlormequat de etapa 1 induce la resistencia a la sequía en el maíz. (Robertson and Greenway, *Effects of CCC on Drought Resistance of Triticum aestivum, L and Zea mays, L*, *Ann. Bot.*, 929-34, 1973). Los inhibidores de biosíntesis de giberelina de etapa 2 tal como paclobutrazol o uniconazol inhiben la biosíntesis de giberelina y se usan para restringir el crecimiento de plantas ornamentales y plántulas vegetales. Los inhibidores de biosíntesis de giberelina de etapa 3 tales como prohexadiona cálcica y trinexapac-etil son inhibidores de dioxigenasa que se usan también para inhibir el crecimiento. El trinexapac-etil ha demostrado que induce la tolerancia a la sequía en cizaña perenne (Jiang and Fry, *Drought Responses of Perennial Ryegrass Treated with Plant Growth Regulators*, *HortScience*, 33(2):270-273, 1998). La tolerancia a la sequía que se imparte en cultivos y monocotiledóneas mediante los inhibidores de

- 5 biosíntesis de giberelina y los genes de la revolución verde enseña que la inhibición del crecimiento promueve la tolerancia a la sequía. Por lo tanto, se esperaría que los niveles aumentados de giberelinas en plantas, ya sea a través de cambios en la expresión genética o aplicación exógena, deberían aumentar la sensibilidad del maíz con respecto a la sequía.
- De acuerdo con esto, la capacidad potencial de giberelinas, y específicamente de GA3, para aumentar la tolerancia de los granos de cereal con respecto al estrés por sequía estacional y el rendimiento de los granos no ha sido demostrada con anterioridad.
- 10 A pesar de todas estas enseñanzas, los solicitantes han encontrado de manera inesperada que la aplicación de una giberelina en estación temprana prepara a las plántulas de maíz para tolerar mejor la sequía que ocurre más tarde en la estación de crecimiento, proporcionando una ventaja de rendimiento sustancial en ambas las variedades de maíz de grano y ensilado. Este efecto de preparación ante la sequía mediada por estimulación del crecimiento mejora el uso del agua efectivo bajo un rango de estrés por sequía, a partir de un estrés por agua suave, estacionario a una sequía severa, prolongada. Este rango de situaciones de estrés por agua se ve acompañando normalmente de estrés por calor.
- 15 En una realización, la presente invención se dirige a métodos para mejorar la tolerancia al estrés por sequía del maíz, según se reivindica en la reivindicación 1, que comprende la aplicación de 0,9 a 33 gramos por hectárea de giberelina 3 al maíz durante la etapa de crecimiento V2-V6 del maíz y cuando el crecimiento del maíz no se limita por una falta de humedad de suelo y en los que la intolerancia al estrés por sequía se mejora más tarde en la estación de crecimiento que con la aplicación de giberelina 3.
- 20 El grano de cereal de la presente invención puede modificarse genéticamente (GM) o no-GM.
- En una realización, la cantidad efectiva de giberelina 3 que se aplica es de 2,7 a 22 gramos de giberelina por hectárea. En una realización preferida, la cantidad efectiva es de 5,4 a 17,6 gramos de giberelina por hectárea. En una realización más preferida, la cantidad efectiva es de 7,2 a 17,6 gramos de giberelina por hectárea. En una realización preferida, el GA3 se aplica de 7,2 a 17,6 gramos (de 2,88 a 7,04 gramos de GA3 por acre) por hectárea.
- 30 En otra realización, la giberelina 3 se aplica con al menos un herbicida, fungicida, insecticida, fertilizante o regulador de crecimiento vegetal distinto de giberelina. En una realización preferida, la giberelina se aplica con al menos un regulador de crecimiento vegetal distinto de una giberelina.
- 35 En otra realización, los herbicidas incluyen pero sin limitación glifosato, mesotriona, halosulfuron, saflufenacil o dicamba.
- En una realización adicional, los fungicidas incluyen pero sin limitación, tetraconazol, metconazol, una estrobilurina, o un producto combinado de estrobilurina-azol.
- 40 En otra realización, los insecticidas incluyen pero sin limitación metilparatión, bifentrina, esfenvalerato, lorsban, carbaril o lannate.
- 45 En incluso otra realización, los fertilizantes foliares incluyen pero sin limitación CoRoN (disponible de Helena Chemical), un nitrógeno de liberación controlada, o BioForge (disponible de Stoller USA), que es en gran medida N,N'-difórmil urea u otros aerosoles que contienen micronutrientes.
- 50 En una realización, los reguladores de crecimiento vegetal incluyen pero sin limitación, ácido abscísico, aminoetoxivinilglicina, 6-benciladenina, ácido jasmónico, ácido naftalenacético o ácido salicílico.
- Se sospecha que los métodos de la presente invención trabajan al inducir una explosión de crecimiento mediante una sola aplicación o múltiples aplicaciones de, al menos, una sola giberelina cuando el crecimiento del cultivo no se limita mediante humedad de suelo. Esto produce una planta que se prepara para tolerar mejor el estrés por sequía más tarde en la estación de crecimiento.
- 55 El GA3 puede aplicarse mediante cualquier medio conveniente. Aquellos capacitados en el estado de la técnica se encuentran familiarizados con los modos de aplicación que incluyen aplicaciones foliares tales como aspersion, espolvoreo y aplicaciones granulares; y aplicaciones en suelo que incluyen aspersion, tratamiento en surcos, o fertilización lateral.
- 60 Las soluciones en aerosol acuosas que se utilizan en la presente invención, contienen generalmente alrededor del 0,01% al 0,5% (v/v) de un agente tensioactivo.
- 65 El agente tensioactivo comprende al menos un tensioactivo no-iónico. De manera general, el tensioactivo no iónico puede ser cualquier tensioactivo conocido en el estado de la técnica. Tensioactivos no iónicos adecuados son, de manera general, oligómeros y polímeros. Polímeros adecuados incluyen óxidos de alquileo al azar, y copolímeros en

5 bloque tales como copolímeros en bloque óxido de etileno-óxido de propileno (copolímeros en bloque EO/PO),
 incluyendo tanto copolímeros en bloque EO-PO-EO como PO-EO-PO; óxido de etileno-óxido de butileno al azar y
 copolímeros en bloque, aductos de alquilo C2-6 de óxido de etileno-óxido de propileno al azar y copolímeros en bloque,
 10 aductos de alquilo C2-6 óxido de etileno-óxido de butileno al azar y copolímeros en bloque, monoalquiléteres de
 polioxitileno-polioxiopropileno, tales como éter metílico, éter etílico, éter propílico, éter butílico o mezclas de estos;
 copolímeros de vinilactato/vinilpirrolidona; copolímeros de vinilpirrolidona alquilada; polivinilpirrolidona; y
 polialquilenglicol, incluyendo los glicoles de polipropileno y glicoles de polietileno. Otros agentes no iónicos son
 15 lecitinas; y agentes tensioactivos de silicona (solubles en agua o agentes tensioactivos dispersables que tienen un
 esqueleto que comprende una cadena de siloxano por ejemplo, Silwet L77.RTM.). Una mezcla adecuada en aceite
 mineral es ATPLUS 411 F.RTM.

Los solicitantes se han referido con respecto a las etapas de desarrollo del maíz a través de la solicitud como etapas
 "V". Las etapas "V" se designan numéricamente como V1, V2, V3, etc. En este sistema de identificación de V(n), (n)
 15 representa el número de hojas con collares visibles. Cada etapa de hoja se define de acuerdo con la hoja superior
 cuyo collar de hoja es visible. "VT" se refiere a etapa de crecimiento de aparición de espiga y que no se trata de una
 etapa vegetativa temprana del maíz.

Según se usa en la presente, "tolerancia al estrés por sequía" se refiere a mitigar los efectos de escasez de agua con
 20 respecto al cereal.

Según se usa en la presente, "ensilado" es un cierto tipo de forraje de almacenamiento. De manera general, el ensilado
 se produce a partir de plantas en un proceso denominado ensilaje. Durante este proceso, las plantas o partes de las
 25 plantas se someten a fermentación anaeróbica que convierte azúcares en ácidos en el material de cultivo haciendo
 que el forraje se pueda conservar. Dependiendo de las plantas que se usan, se emplean otros nombres en lugar de
 ensilado, por ejemplo, ensilado de avena para avenas o ensilado de alfalfa para alfalfa. El ensilado se usa ampliamente
 para alimentar animales que producen leche y carne tal como ganado lechero y de carne.

Según se usa en la presente, "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de la giberelina que mejorará la tolerancia al
 30 estrés por sequía o mejora el resultado. La "cantidad efectiva" variará dependiendo de la concentración de giberelina,
 el cereal(es) que se tratan, la severidad de la sequía, el resulta conveniente, y la etapa de vida del cereal(es), entre
 otros factores. De este modo, no resulta posible siempre especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, una
 "cantidad efectiva" adecuada en cualquier caso individual puede determinarse por una persona de capacidad ordinaria
 en el estado de la técnica.

Según se usa en la presente, "cereal" o "grano de cereal" se refiere a una hierba que se cultiva por los componentes
 35 comestibles de sus granos. Los cereales son miembros de la familia de monocotiledóneas Poaceae.

Según se usa en la presente, "etapa de crecimiento vegetativo temprana" se refiere a la etapa de crecimiento que
 40 comienza en la germinación y termina cuando la planta se encuentra en un 50% de madurez en cuanto al tamaño de
 planta.

Según se usa en la presente, "mejora" significa que el grano de cereal tiene más calidad que la que el grano de cereal
 45 hubiera tenido si no se hubiera tratado con los métodos de la presente invención.

Los artículos "un", "una" y "el" pretenden incluir el plural así como también el singular, a menos que el contexto indique
 claramente lo contrario.

Los siguientes ejemplos se dirigen a ilustrar la presente invención y a enseñar a una persona de capacidad ordinaria
 50 en el estado de la técnica como usar las formulaciones de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

55 Un estudio de ensilado del maíz repetido se llevó a cabo en 2012. El maíz se plantó el 18 de mayo de 2012, y se trató
 con dos proporciones de GA3 en ya sea la etapa de crecimiento V2 (junio 2) o V5 (junio 18), cada vez con dos
 proporciones de GA3. Los rendimientos de granos se estimaron a partir de cosechas de hileras de 6,1 m (20 pies) y
 se convirtieron en fanegas de granos por acre (1 Bu/Acre=67,25 kg/ha). Existieron 3,81 cm (1,5 pulgadas) de
 60 precipitaciones en las dos semanas antes de la plantación pero no hubo precipitaciones desde el 10 de mayo hasta el
 29 de mayo, cuando existió una precipitación de 1,78 cm (0,7 pulgadas). Durante junio existieron 7,37 (2,54 pulgadas)
 de precipitaciones en el mes. Existieron solo dos eventos de precipitaciones a partir del 1 – 25 de julio de menos de
 0,51 cm (0,2 pulgadas). El 26 de julio existieron aproximadamente 5.08 cm (2 pulgadas) de precipitaciones. La
 65 precipitación en junio, julio y agosto fue de aproximadamente un tercio por debajo del promedio de 30 años para el
 área y el maíz se encontró bajo condiciones de sequía moderadas. Las condiciones de humedad del cultivo en julio
 se describieron como "excesivamente secas" por el Centro Nacional de Datos Climáticos de NOAA.

Según puede observarse a partir de los rendimientos de ensilado de la Tabla 1, todas las proporciones y tiempos de aplicación del GA3 aumentaron la producción del maíz.

Tabla 1. Prueba de maíz		
Tratamiento (1g/acre=2,47 g/ha)	Tiempo de aplicación	Rendimiento de grano (Bu/Acre) (=67,25 kg/ha)
No tratado	N/A	124,0
3,2 gramos de GA3/acre	V2	141,2
6,4 gramos de GA3/acre	V2	141,1
3,2 gramos de GA3/acre	V5	143,0
6,4 gramos de GA3/acre	V5	156,1

5

Ejemplo 2

10

En una prueba repetida que se llevó a cabo en 2012, el cultivo de maíz experimentó sequía extrema y excepcional en julio, según se describe por el Centro Nacional de Datos Climáticos. El maíz se plantó a finales de abril y se trató con GA3 en ya sea las etapas de crecimiento V2 o V5. Treinta y dos días después de la aplicación, el maíz que se trató con GA3 mostró una altura de aproximadamente 25,4 cm (10 pulgadas) superior con respecto al no tratado en promedio. A pesar de que los rendimientos en la cosecha fueron significativamente más bajos que lo "normal" debido a la sequía, el GA3 que se aplicó en la etapa V2 a V5, varias semanas antes del comienzo de la sequía, tuvo un

15

Tabla 2. Prueba de maíz		
Tratamiento (1g/acre=2,47 g/ha)	Etapas de aplicación	Rendimiento de grano (Bu/Acre) (=67,25 kg/ha)
No tratado	N/A	88,45
3,2 gramos de GA3/acre	V2	119,70
6,4 gramos de GA3/acre	V2	119,83
3,2 gramos de GA3/acre	V5	155,65
6,4 gramos de GA3/acre	V5	121,60

Ejemplo 3

20

En otra prueba de campo que se llevó a cabo en 2012, se realizó una cronología de aplicaciones de GA3. En esta prueba, el maíz híbrido se plantó el 24 de abril de 2012 a una densidad de 79040 plantas/ha (32000 plantas/acre). Las plantas se rociaron con GA3 en ya sea la hoja quinta (V5) o la aparición de espiga (VT) el 6 de junio o 7 de julio, respectivamente. Esta prueba se sometió a sequía extrema y excepcional en julio durante la puesta y relleno de grano. Según se muestra en la Tabla 3 a continuación, el efecto de los tratamientos de aspersión de GA3 dependió del tiempo de la aplicación GA3. Esto es, la aplicación de GA3 en el tiempo de aspersión de V5 fue superior con respecto a la aplicación de aspersión en VT para aumentar el rendimiento del grano. Este resultado es inesperado y sorprendente, ya que las aplicaciones de otros reguladores de crecimiento de planta o agroquímicos con efectos de regulación de crecimiento de planta en el maíz, tales como el fungicida, piraclostrobina muestran que los mayores rendimientos aumentan cuando las aplicaciones se realizan alrededor de la aparición de espiga (VT).

30

Tabla 3. Prueba de maíz		
-------------------------	--	--

ES 2 705 701 T3

Tratamiento (1g/acre=2,47 g/ha)	Etapa de aplicación	Rendimiento de grano (Bu/Acre) (=67,25 kg/ha)
No tratado	N/A	116
5,3 gramos de GA3/acre	V5	115
5,3 gramos de GA3/acre	VT (aparición de espiga)	131

Ejemplo 4

- 5 En esta prueba se plantó un híbrido de maíz comercial el 12 de abril, 2012. A las seis semanas después de la plantación, las plantas se encontraron en la etapa de desarrollo V5-V6 cuando se aplicaron los tratamientos de aspersión. El experimento se llevó a cabo con tres repeticiones y el GA3 se aplicó a 15,81 g/ha (6,4 g/acre) en una mezcla con el fungicida Domark® (disponible de Valent BioSciences Corporation, contiene Tebuconazole) a 6,62 g ai./ha (en 26,8 gramos/acre). El rendimiento que puede cosecharse se estimó por la recolección de espigas que pueden cosecharse el 30 de julio de 2012. El índice Palmer del Centro Nacional de Datos Climáticos caracterizó la sequía en un tiempo de aspersión (de mediados a finales de mayo) en un rango medio (menos que moderado), pero para finales de junio (5 semanas después de la aplicación) este sitio se encontró bajo sequía extrema. Los rendimientos del maíz fueron bajos en esta prueba debido a la falta de agua, pero el tratamiento con GA3 dio como resultado más fanegas/acre que el no tratado (véase Tabla 4).

15

Tabla 4. Rendimiento estimado a partir de Prueba de Campo		
Tratamiento	Tiempo	Rendimiento de grano (Bu/Acre) (=67,25 kg/ha)
UTC	-	117,1
GA3 + Domark®	V5-6	133,3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mejorar la tolerancia al estrés por sequía del maíz que comprende la aplicación de 0,9 a 33 gramos por hectárea de giberelina 3 al maíz durante la etapa de crecimiento V2-V6 del maíz y cuando el crecimiento de maíz no se limita por una falta de humedad de suelo y en el que la intolerancia al estrés por sequía se mejora más tarde en la estación de crecimiento que con la aplicación de giberelina 3.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la giberelina 3 se aplica en una cantidad de 2,7 a 22 gramos por hectárea; preferiblemente, en el que la giberelina 3 se aplica en una cantidad de 5,4 a 17,6 gramos por hectárea; o preferiblemente, en el que la giberelina 3 se aplica en una cantidad de 7,2 a 17,6 gramos por hectárea.
3. El método de la reivindicación 1 en el que la giberelina 3 se aplica con al menos un herbicida, fungicida, insecticida, fertilizante o regulador de crecimiento de planta distinto a una giberelina.