(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 741 968**

(51) Int. CI.:

A01N 43/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2012 PCT/US2012/056885**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13044214**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2012 E 12769846 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2747568**

(54) Título: **Combinaciones de lipo-quitooligosacáridos y métodos para usar en el aumento del crecimiento de plantas**

(30) Prioridad:

23.09.2011 US 201161538325 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2020

(73) Titular/es:

NOVOZYMES BIOAG A/S (50.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd , DK y
NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

SMITH, R. STEWART y
HABIB, AHSAN

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

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

Combinaciones de lipo-quitooligosacáridos y métodos para usar en el aumento del crecimiento de plantas

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] La simbiosis entre las bacterias del suelo gramnegativas, Rhizobiaceae y Bradyrhizobiaceae, y leguminosas tales como la soja, está bien documentada. La base bioquímica para estas relaciones incluye un intercambio de señalización molecular, donde los compuestos de señalización de planta a bacteria incluyen flavonas, isoflavonas y flavanonas, y los compuestos de señalización de bacteria a planta, que incluyen los productos finales de la expresión de los genes *Nod* de bradirrizobios y rizobios, conocidos como lipo-quitooligosacáridos (LCO). La simbiosis entre estas bacterias y las leguminosas permite que la leguminosa fije nitrógeno atmosférico para el crecimiento de plantas, obviando así la necesidad de fertilizantes de nitrógeno. Ya que los fertilizantes de nitrógeno pueden aumentar significativamente el coste de las plantas de cultivo y están asociados con varios efectos contaminantes, la industria agrícola continúa sus esfuerzos para explotar esta relación biológica y desarrollar nuevos agentes y métodos para aumentar el rendimiento de las plantas sin aumentar el uso de fertilizantes a base de nitrógeno.

[0002] La patente de EE.UU. 6,979,664 muestra un método para aumentar la germinación de semillas o la emergencia de plántulas de un cultivo vegetal, que comprende los pasos de proporcionar una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un lipo-quitooligosacárido y un portador agrícola adecuado y aplicar la composición en la proximidad inmediata de una semilla o plántula en una cantidad eficaz para aumentar la germinación de semillas o la emergencia de plántulas en comparación con una semilla o plántula no tratada.

[0003] Se muestra el desarrollo adicional sobre este concepto en WO 2005/062899, dirigida a combinaciones de al menos un inductor vegetal, es decir un LCO, en combinación con un fungicida, insecticida o combinación de los mismos, para aumentar una característica de planta tal como el área cultivada, el crecimiento, el vigor y/o el rendimiento. Se muestra que las composiciones y los métodos son aplicables tanto a leguminosas como a no leguminosas y se pueden usar para tratar una semilla (justo antes de la siembra), plántula, raíz o planta.

[0004] De forma similar, WO 2008/085958 muestra composiciones para aumentar el crecimiento de plantas y el rendimiento de cultivo tanto en leguminosas como en no leguminosas, y que contienen LCO en combinación con otro agente activo tal como una quitina o un quitosano, un compuesto flavonoide o un herbicida, y que se pueden aplicar a semillas y/o plantas concomitante o secuencialmente. Como en el caso de la publicación '899, la publicación '958 muestra el tratamiento de semillas justo antes de la siembra.

[0005] Más recientemente, Halford, "Smoke Signals", en Chem. Eng. News (12 de abril de 2010), en las páginas 37-38, informa de que las karrikinas o butenolidas que están contenidas en el humo actúan como estimulantes del crecimiento y estimulan la germinación de semillas después de un fuego forestal, y pueden estimular semillas tales como de maíz, tomates, lechuga y cebollas que habían sido almacenadas. Estas moléculas son el tema de la patente de EE.UU. 7,576,213.

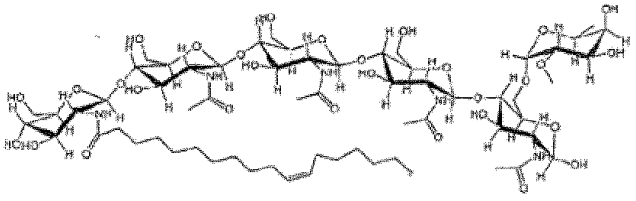
[0006] WO0126465 divulga el uso de LCO para aumentar la fotosíntesis en plantas. WO00/04778 divulga el uso de un LCO aislado a partir de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* para estimular la germinación de semillas y la emergencia. WO2005/062899 divulga tratamientos de combinación que comprenden factores Nod y un fungicida o insecticida. WO 2008/085958 divulga LCO en combinación con quitina/quitosanos o flavonoides o herbicidas. WO 2009/049747 divulga LCO en combinación con flavonoides.

[0007] Sin embargo, todavía hay una necesidad de sistemas para mejorar o aumentar el crecimiento de plantas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

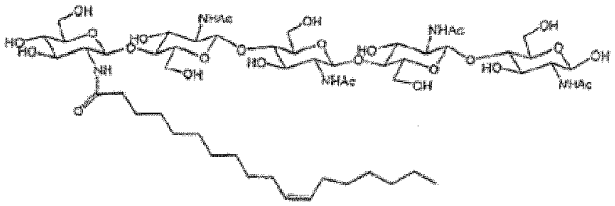
[0008] Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para aumentar el crecimiento de plantas, donde al cosechar la planta muestra al menos uno de entre un mayor rendimiento de las plantas medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas, donde dicho método comprende tratar una semilla de planta y/o la planta que germina a partir de la semilla con una cantidad eficaz de al menos dos lipo-quitooligosacáridos (LCO) distintos, donde los al menos dos LCO comprenden:

a.



[Fig. 1a]

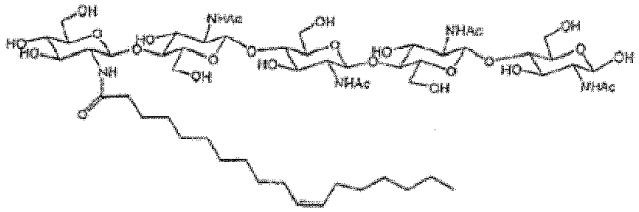
y



[Fig. 2a];

o

b.



[Fig. 2a]

y

[Fig. 5];

[0009] Como queda claro en contexto, los dos LCO son diferentes entre sí. En algunas formas de realización, el tratamiento de la semilla incluye la aplicación directa de los al menos dos LCO sobre la semilla, que puede entonces plantarse o almacenarse durante un periodo de tiempo antes de la siembra. El tratamiento de la semilla también puede incluir el tratamiento indirecto tal como mediante la introducción de los al menos dos LCO en el suelo (conocido en la técnica como aplicación en surco). En otras formas de realización, los al menos dos LCO se pueden aplicar a la planta que germina a partir de la semilla, por ejemplo, mediante pulverización foliar. Los métodos pueden incluir además el uso de otros agentes agronómicamente beneficiosos, tales como micronutrientes, moléculas de señalización de plantas (tales como lipo-quitooligosacáridos, compuestos quitinosos (por ejemplo, los CO), flavonoides, ácido jasmónico, ácido linoleico y ácido linolénico y sus derivados, y karrikinas), herbicidas, fungicidas e insecticidas, microorganismos de solubilización de fosfato, diazótrofos (inoculantes de rizobios) y/u hongos micorrícicos.

[0010] Los métodos de la presente invención son aplicables a leguminosas y no leguminosas por igual. En algunas formas de realización, la semilla leguminosa es semilla de soja. En algunas otras formas de realización, la semilla que se trata es una semilla no leguminosa tal como una semilla de planta de cultivo extensivo, por ejemplo, un cereal tal como el maíz, o una semilla de hortaliza tal como la patata.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

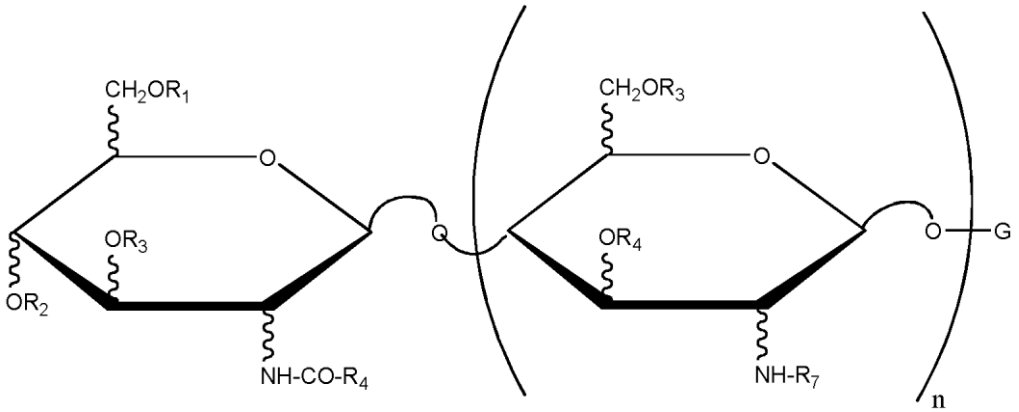
[0011]

Las figuras 1a y 2a muestran las estructuras químicas de dos compuestos lipo-quitooligosacáridos útiles en la práctica de la presente invención.
Las figuras 1b y 2b muestran las estructuras químicas de los compuestos quitooligosacáridos (CO) correspondientes que corresponden a los LCO de las figuras 1a y 2a, y que son también útiles en la práctica de la presente invención.

Las figuras 3a y 4a muestran las estructuras químicas de otros LCO (factores Myc).
Las figuras 3b y 4b muestran las estructuras químicas de los CO Myc correspondientes.
La figura 5 muestra la estructura química de un lipo-quitooligosacárido útil en la práctica de la presente invención.
La figura 6 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de las combinaciones de LCO de la invención tratados en semillas de *Macroptilium atropurpureum*, en comparación con un control, expresado en términos de longitud de plántula (raíz más brote en mm).
Las figuras 7 y 8 son gráficos de barras que ilustran el efecto de una combinación de LCO, en comparación con un LCO único y un control, tratado en plantas *Macroptilium atropurpureum*, expresado en términos de verdor de las hojas.
La figura 9 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una combinación de LCO, en comparación con un LCO único y un control, tratado en plantas *Macroptilium atropurpureum*, expresado en términos de número total de flores por tratamiento.
La figura 10 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una combinación de LCO, en comparación con un LCO único y un control, tratado en plantas *Macroptilium atropurpureum*, expresado en términos de número total de frutos por tratamiento.
La figura 11 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una combinación de LCO, en comparación con un LCO único y un control, tratado en plantas *Macroptilium atropurpureum*, expresado en términos de número medio de frutos por planta.
La figura 12 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una combinación de LCO, en comparación con un LCO único y un control, tratado en plantas *Macroptilium atropurpureum*, expresado en términos de número total de rendimiento medio (en gramos) por planta.
La figura 13 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de varias combinaciones de LCO de la invención, en comparación con LCO únicos y un control (agua), tratado en semillas de tomate, expresado en términos de longitud media de las raíces.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0012] Compuestos lipo-quitooligosacáridos (LCO), también conocidos en la técnica como señales Nod simbióticas o factores Nod, consisten en una estructura de oligosacárido de residuos *N*-acetil-D-glucosamina ("GlcNAc") con enlace β-1,4 con una cadena de acilo graso enlazada a N condensada en el extremo no reductor. Los LCO difieren en el número de residuos GlcNAc de la estructura, en la longitud y el grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar reductores y no reductores. Véase, por ejemplo, Denarie, et al., Ann. Rev. Biochem. 65: 503-35 (1996), Hamel, et al., Planta 232: 787-806 (2010) (por ejemplo, la figura 1 en el mismo que muestra estructuras de quitina, quitosano, CO y factores Nod correspondientes (LCO)); Prome, et al., Pure & Appl. Chem. 70(1): 55-60 (1998). A continuación, se presenta un ejemplo de un LCO como la fórmula I

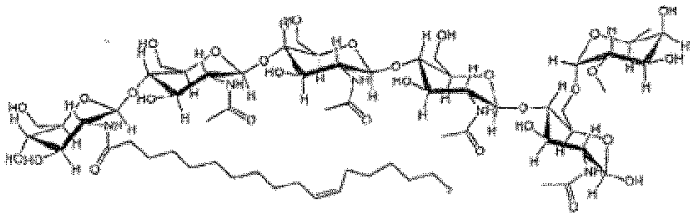


donde:

G es una hexosamina que puede sustituirse, por ejemplo, con un grupo acetilo en el nitrógeno, un grupo sulfato, un grupo acetilo y/o un grupo éter en un oxígeno,
R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 y R_7, que pueden ser idénticos o diferentes, representan H, CH_3 CO--, C_x H_y CO-- donde x es un número entero entre 0 y 17, e y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo acilo tal como, por ejemplo, un carbamoilo,
R_4 representa una cadena alifática mono-, di- o triinsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4.

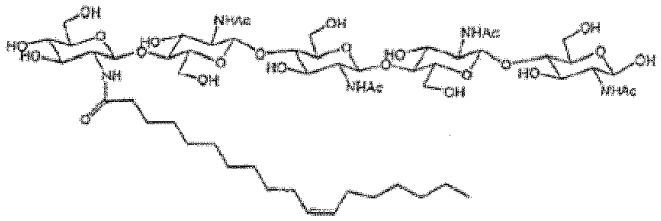
[0013] El método de la invención es un método para aumentar el crecimiento de plantas, donde al cosechar la planta muestra al menos uno de entre un mayor rendimiento de las plantas medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas, donde dicho método comprende tratar una semilla de planta y/o la planta que germina a partir de la semilla con una cantidad eficaz de al menos dos lipo-quitooligosacáridos (LCO) distintos, donde los al menos dos LCO comprenden:

a.



[Fig. 1a]

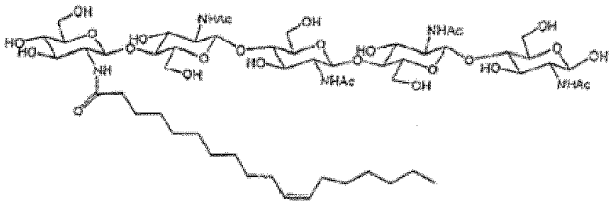
y



[Fig. 2a];

o

b.

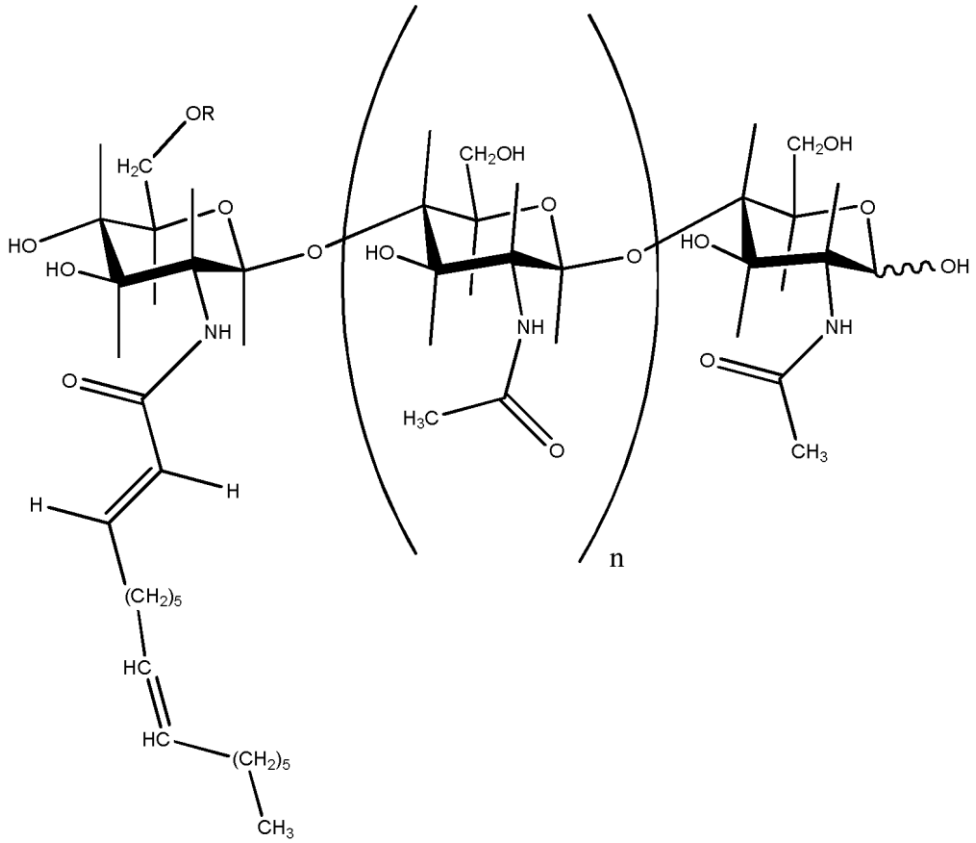


[Fig. 2a]

y

[Fig. 5];

[0014] Pueden obtenerse (aislarse y/o purificarse) LCO adicionales a partir de bacterias tales como rizobios, por ejemplo, *Rhizobium sp*., *Bradyrhizobium sp*., *Sinorhizobium sp*. y *Azorhizobium sp*. Las estructuras de los LCO son características para cada una de dichas especies bacterianas, y cada cepa puede producir múltiples LCO con estructuras diferentes. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5,549,718 también se ha descrito que LCO específicos de *S. meliloti* tienen la fórmula II:



donde R representa H o CH_3 CO-- y n es igual a 2 o 3.

[0015] Otros LCO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Cuando se acetilan (el R=CH_3 CO--), se convierten en AcNodRM-1 y AcNodRM-3, respectivamente (patente de EE.UU. 5,545,718).

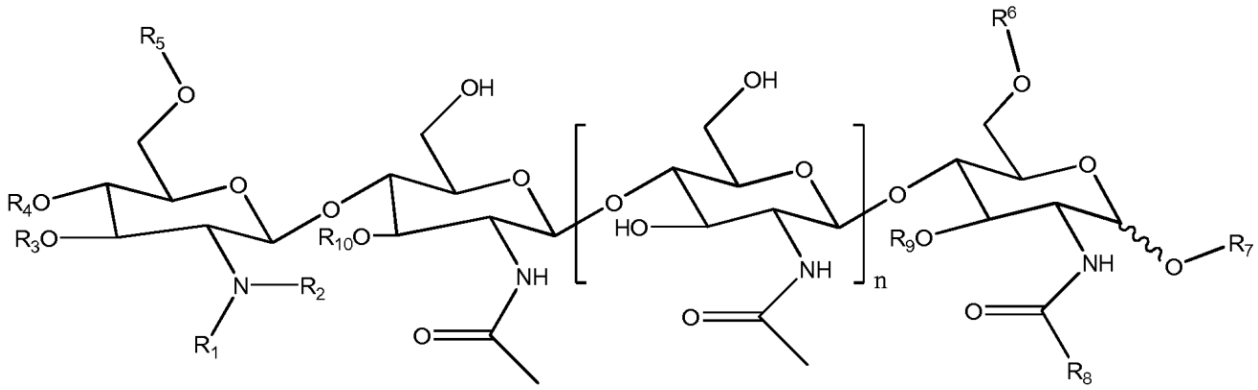
[0016] Se describen LCO adicionales de *Bradyrhizobium japonicum* en las patentes de EE.UU. 5,175,149 y 5,321,011. En términos generales, son fitohormonas pentasacáridas que comprenden metilfucosa. Se describen varios de estos LCO derivados de *B. japonicum*: BjNod-V ($C_{18:1}$); BjNod-V (Ac, $C_{18:1}$), BjNod-V ($C_{16:1}$); y BjNod-V (Ac, $C_{16:0}$), donde "V" indica la presencia de cinco *N*-acetilglucosaminas; "Ac", una acetilación; el número después de la "C" indica el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después de ":", el número de enlaces dobles.

[0017] Los LCO usados en formas de realización de la invención pueden obtenerse (es decir, aislarse y/o purificarse) de cepas bacterianas que producen LCO, tales como cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (incluida *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (incluida *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (incluida *S. meliloti*) y cepas bacterianas genéticamente modificadas para producir LCO. Las combinaciones de dos o más LCO obtenidos a partir de estos microorganismos rizóbicos y bradirrizóbicos se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

[0018] Los LCO son los determinantes primarios de la especificidad del huésped en la simbiosis de leguminosas (Diaz, et al., Mol. Plant-Microbe Interactions 13: 268-276 (2000)). Así, en la familia de las leguminosas, géneros y especies específicos de rizobios desarrollan una relación simbiótica de fijación de nitrógeno con un huésped leguminoso específico. Estas combinaciones de plantas-huéspedes/bacterias se describen en Hungria, et al., Soil Biol. Biochem. 29: 819-830 (1997). Los ejemplos de estas asociaciones simbióticas de bacterias/leguminosas incluyen *S. meliloti*/alfalfa y trébol oloroso; *R. leguminosarum* variedad biológica *viciae*/guisantes y lentejas; *R. leguminosarum* variedad biológica *phaseoli*/judías; *Bradyrhizobium japonicum*/semillas de soja; y *R. leguminosarum* variedad biológica *trifolii*/trébol rojo. Hungria también enumera los inductores flavonoides eficaces del gen *Nod* de las especies de rizobios y las estructuras específicas de los LCO que producen las diferentes especies de rizobios. Sin embargo, la especificidad de los LCO solo se requiere para establecer la nodulación en las leguminosas. En la práctica de la presente invención, el uso de un LCO dado no está limitado al tratamiento de la semilla de su socia leguminosa simbiótica para conseguir un mayor rendimiento de las plantas medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas o en

comparación con plantas cosechadas a partir de semillas tratadas con la molécula de señalización justo antes o en una semana o menos de la siembra.

[0019] Así, mediante ejemplos adicionales, otros LCO y derivados de origen no natural de los mismos que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención se representan mediante la fórmula siguiente:



donde R_1 representa C14:0, 3OH-C14:0, iso-C15:0, C16:0, 3-OH-C16:0, iso-C15:0, C16:1, C16:2, C16:3, iso-C17:0, iso-C17:1, C18:0, 3OH-C18:0, C18:0/3-OH, C18:1, OH-C18:1, C18:2, C18:3, C18:4, C19:1 carbamoilo, C20:0, C20:1, 3-OH-C20:1, C20:1/3-OH, C20:2, C20:3, C22:1 y C18-26(ω-1)-OH (que según D'Haeze, et al., Glycobiology 12: 79R-105R (2002), incluye especies hidroxiladas C18, C20, C22, C24 y C26 y C16:1Δ9, C16:2 (Δ2,9) y C16:3 (Δ2,4,9)); R_2 representa hidrógeno o metilo; R_3 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_4 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_5 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_6 representa hidrógeno, arabinosilo, fucosilo, acetilo, éster de sulfato, 3-*0*-S-2-*0*-MeFuc, 2-*0*-MeFuc y 4-*0*-AcFuc; R_7 representa hidrógeno, manosilo o glicerol; R_8 representa hidrógeno, metilo o $-CH_2OH$; R_9 representa hidrógeno, arabinosilo o fucosilo; R_{10} representa hidrógeno, acetilo o fucosilo; y n representa 0, 1, 2 o 3. Las estructuras de los LCO de rizobios de origen natural abarcados por esta estructura se describen en D'Haeze, *et al.*, *supra*.

[0020] Mediante aún más ejemplos adicionales, un LCO obtenido de *B. japonicum*, ilustrado en la figura 1a, se puede usar para tratar semillas leguminosas distintas a la soja y semillas no leguminosas tales como el maíz. Como otro ejemplo, el LCO obtenible a partir de *Rhizobium leguminosarum* variedad biológica *viciae* ilustrado en la figura 2a (designado LCO-V (C18:1), SP104) se puede usar para tratar semillas leguminosas distintas del guisante y también no leguminosas. Así, en algunas formas de realización, la combinación de los dos LCO ilustrados en las figuras 1a y 2a se usan en los métodos de la presente invención.

[0021] En algunas otras formas de realización, uno de los dos LCO usados en los métodos de la presente invención se obtiene a partir de *S. meliloti* y se ilustra en la figura 5. Así, en la presente invención, los LCO incluyen al menos dos de los LCO ilustrados en las figuras 1a, 2a y 5.

[0022] La presente invención abarca además el uso de compuestos de LCO sintéticos, tales como los descritos en WO 2005/063784, y LCO recombinantes producidos a través de ingeniería genética. La estructura básica de origen natural de los LCO puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en los LCO de origen natural, tales como los descritos en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54: 257-288 (2000) y D'Haeze, *supra*. Moléculas oligosacáridas precursoras (CO, que, como se describe a continuación, son también útiles como moléculas de señalización de plantas en la presente invención) para la construcción de LCO también se pueden sintetizar por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como se describe en Samain, et al., Carbohydrate Res. 302: 35-42 (1997); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4): 311-7 (2005) y Samain, et al., J. Biotechnol. 72: 33-47 (1999) (por ejemplo, la figura 1 en el mismo que muestra estructuras de los CO que se pueden producir de manera recombinante en *E. coli* con diferentes combinaciones de genes *nodBCHL*). Así, en las formas de realización de la invención, las combinaciones de al menos dos LCO incluyen combinaciones de los LCO seleccionados de los LCO ilustrados en las figuras 1a, 2a y 5.

[0023] Los LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o en forma de un cultivo de bacterias u hongos productores de LCO. Por ejemplo, OPTIMIZE® (disponible comercialmente de Novozymes BioAg Limited) contiene un cultivo de *B. japonicum* que produce un LCO (LCO-V (C18:1, MeFuc), MOR116) que se ilustra en la figura 1a. Los métodos para proporcionar LCO sustancialmente puros incluyen eliminar simplemente las células microbianas de una mezcla de LCO y el microbio, o continuar aislando y purificando las moléculas de LCO a través de la separación de la fase solvente de LCO seguida de la cromatografía HPLC como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5,549,718. La purificación se puede aumentar por HPLC repetida y las

moléculas de LCO purificadas se pueden liofilizar para el almacenamiento a largo plazo. Los quitooligosacáridos (CO), como se han descrito anteriormente, se pueden usar como materiales de partida para la producción de LCO sintéticos. A efectos de la presente invención, los LCO recombinantes adecuados para usar en la presente invención son al menos un 60% puros, por ejemplo, al menos un 60% puros, al menos un 65% puros, al menos un 70% puros, al menos un 75% puros, al menos un 80% puros, al menos un 85% puros, al menos un 90% puros, al menos un 91% puros, al menos un 92% puros, al menos un 93% puros, al menos un 94% puros, al menos un 95% puros, al menos un 96% puros, al menos un 97% puros, al menos un 98% puros, al menos un 99% puros, hasta un 100% puros.

[0024] Las semillas se pueden tratar con al menos dos LCO de varias maneras, tales como la pulverización o el goteo. El tratamiento por pulverización y por goteo se puede realizar formulando una cantidad eficaz de los al menos dos LCO en un portador agrícola aceptable, típicamente de naturaleza acuosa, y pulverizando o haciendo gotear la composición sobre semillas mediante un sistema de tratamiento continuo (que se calibra para aplicar el tratamiento con una dosis predefinida en proporción al flujo continuo de semilla), tal como un aparato de tratamiento de tipo tambor. Estos métodos emplean ventajosamente volúmenes relativamente pequeños de portador para permitir un secado relativamente rápido de la semilla tratada. De esta forma, se pueden tratar de manera eficaz volúmenes grandes de semillas. También pueden emplearse sistemas de lote, donde se suministra un tamaño de lote predeterminado de composiciones de semillas y moléculas de señalización a un mezclador. Sistemas y equipos para realizar estos procesos están disponibles comercialmente de varios proveedores, por ejemplo, Bayer CropScience (Gustafson).

[0025] En otra forma de realización, el tratamiento implica recubrir las semillas con los al menos dos LCO. Un tal proceso implica recubrir la pared interna de un recipiente redondo con la composición, añadir las semillas, girar entonces el recipiente para hacer que las semillas entren en contacto con la pared y la composición, un proceso conocido en la técnica como "recubrimiento del recipiente". Las semillas se pueden recubrir con combinaciones de métodos de recubrimiento. El remojo implica típicamente el uso de una solución acuosa que contiene el potenciador del crecimiento de plantas. Por ejemplo, las semillas se pueden remojar durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, durante al menos 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h). Algunos tipos de semillas (por ejemplo, las semillas de soja) tienden a ser sensibles a la humedad. Así, puede no ser deseable remojar tales semillas durante un largo periodo de tiempo, en cuyo caso el remojo se realiza típicamente durante de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos.

[0026] En aquellas formas de realización que implican el almacenamiento de semillas después de la aplicación de los al menos dos LCO, la adherencia de los LCO a la semilla a lo largo de cualquier fracción de tiempo del periodo de almacenamiento no es crítica. Sin pretender imponer ninguna teoría particular de operación, los solicitantes creen que incluso en la medida en que el tratamiento no cause que la molécula de señalización de planta permanezca en contacto con la superficie de las semillas después del tratamiento y durante cualquier parte del almacenamiento, los LCO pueden conseguir su efecto deseado mediante un fenómeno conocido como memoria de semilla o percepción de semilla. Véase, Macchiavelli, et al., J. Exp. Bot. 55(408): 1635-40 (2004). Los solicitantes creen también que, tras el tratamiento, los LCO difunden hacia la joven radícula en desarrollo y activa genes simbióticos y de desarrollo, lo que resulta en un cambio en la arquitectura de la raíz de la planta. Sin embargo, en la medida deseable, las composiciones que contienen los LCO pueden contener además un agente de pegado o recubrimiento. Con fines estéticos, las composiciones pueden contener además un polímero de recubrimiento y/o un colorante.

[0027] En algunas formas de realización, los al menos dos LCO se aplican a la semilla (directa o indirectamente) o a la planta mediante la misma composición (es decir, se formulan juntos). En otras formas de realización, se formulan por separado, donde ambas composiciones de LCO se aplican a la semilla o la planta, o en algunas formas de realización, uno de los LCO se aplica a la semilla y el otro se aplica a la planta.

[0028] La cantidad total de los al menos dos LCO es eficaz para aumentar el crecimiento de manera que al cosechar la planta muestra al menos uno de entre un mayor rendimiento de las plantas medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas (con cualquiera de los activos). La cantidad eficaz de los al menos dos LCO usados para tratar la semilla, expresada en unidades de concentración, varía generalmente de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-14} M (concentración molar) y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-11} M y, en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-8} M. Expresada en unidades de peso, la cantidad eficaz varía generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 µg/cien libras (cwt) de semilla y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 µg/cwt y, en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0 µg/cwt de semilla.

[0029] A efectos del tratamiento indirecto de semilla, es decir, tratamiento en surco, la cantidad eficaz de los al menos dos LCO varía generalmente de 1 µg/acre a aproximadamente 70 µg/acre y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 50 µg/acre a aproximadamente 60 µg/acre. A efectos de aplicación a las plantas, la cantidad eficaz de los LCO varía generalmente de 1 µg/acre a aproximadamente 30 µg/acre y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 11 µg/acre a aproximadamente 20 µg/acre.

[0030] La semilla se puede tratar con los al menos dos LCO justo antes o en el momento de la siembra. El tratamiento en el momento de la siembra puede incluir la aplicación directa a la semilla como se ha descrito anteriormente o, en algunas otras formas de realización, mediante la introducción de los activos en el suelo, conocida en la técnica como tratamiento en surco. En aquellas formas de realización que implican el tratamiento de semilla seguido del almacenamiento, la semilla puede empaquetarse entonces, por ejemplo, en bolsas de 50 lb o de 100 lb, o en bolsas o recipientes a granel, conforme a técnicas estándares. La semilla se puede almacenar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, e incluso más tiempo, por ejemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 meses, o incluso más tiempo, bajo condiciones de almacenamiento apropiadas que se conocen en la técnica. Mientras que la semilla de soja puede tener que plantarse en la estación siguiente, la semilla de maíz se puede almacenar durante periodos de tiempo mucho más largos, incluso más de 3 años.

Otros agentes agronómicamente beneficiosos

[0031] La presente invención puede incluir además el tratamiento de la semilla o las plantas que germinan a partir de la semilla con al menos un agente agrícolamente/agronómicamente beneficioso. Como se utiliza en la presente y en la técnica, el término "agrícolamente o agronómicamente beneficioso" se refiere a agentes que cuando se aplican a semillas o plantas resulta en el aumento (que puede ser estadísticamente significativo) de características de planta, tales como el área cultivada, el crecimiento (por ejemplo, tal y como se define en relación con los LCO) o el vigor, en comparación con semillas o plantas no tratadas. Estos agentes se pueden formular juntos con los al menos dos LCO o aplicarse a la semilla o planta mediante una formulación por separado. Los ejemplos representativos de tales agentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen micronutrientes (por ejemplo, vitaminas y oligoelementos), moléculas de señalización de plantas (distintas a los LCO), herbicidas, fungicidas e insecticidas, microorganismos de solubilización de fosfato, diazótrofos (inoculantes de rizobios) y/u hongos micorrícicos.

Micronutrientes

[0032] Las vitaminas representativas que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen el pantotenato de calcio, el ácido fólico, la biotina y la vitamina C. Los ejemplos representativos de oligoelementos que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen el boro, el cloro, el manganeso, el hierro, el zinc, el cobre, el molibdeno, el níquel, el selenio y el sodio.

[0033] La cantidad del al menos un micronutriente usado para tratar la semilla, expresada en unidades de concentración, varía generalmente de 10 ppm a 100 ppm y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 2 ppm a aproximadamente 100 ppm. Expresada en unidades de peso, la cantidad eficaz generalmente varía, en una forma de realización, de aproximadamente 180 µg a aproximadamente 9 mg/cien libras (CWT) de semilla y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 200 µg/planta cuando se aplica en el follaje. En otras palabras, a efectos del tratamiento de semilla, la cantidad eficaz del al menos un micronutriente varía generalmente de 30 µg/acre a aproximadamente 1,5 mg/acre y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 120 mg/acre a aproximadamente 6 g/acre cuando se aplica foliarmente.

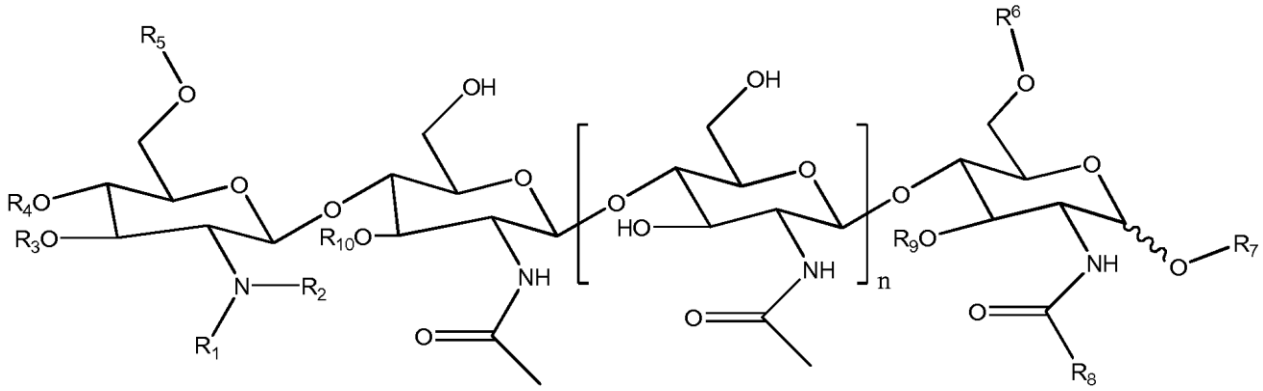
Moléculas de señalización de plantas

[0034] La presente invención también puede incluir el tratamiento de semilla o planta con una molécula de señalización de planta distinto de un LCO. A efectos de la presente invención, el término "molécula de señalización de planta", que se puede usar de forma intercambiable con " potenciador del crecimiento de plantas", en términos generales se refiere a cualquier agente, tanto de origen natural en plantas o microbios como sintético (y que puede ser de origen no natural), que activa directa o indirectamente una ruta bioquímica de planta, dando como resultado un mayor crecimiento de plantas, medible al menos en términos de al menos uno de entre un mayor rendimiento medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas. Los ejemplos representativos de moléculas de señalización de plantas que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen compuestos quitinosos, flavonoides, ácido jasmónico, ácido linoleico y ácido linolénico y sus derivados (*supra*), y karrikinas.

Quitooligosacáridos

[0035] Los CO se conocen en la técnica como estructuras de *N*-acetil glucosamina con enlace β-1-4 identificadas como oligómeros de quitina, también como *N*-acetilquitooligosacáridos. Los CO tienen decoraciones de cadena lateral únicas y diferentes que los hacen diferentes de las moléculas de quitina [$(C_8H_{13}NO_5)_n$, CAS nº 1398-61-4], y moléculas de quitosano [$(C_5H_{11}NO_4)_n$, CAS nº 9012-76-4]. Los CO de la presente invención son también relativamente hidrosolubles en comparación con la quitina y el quitosano y, en algunas formas de realización, como se describe a continuación, son pentaméricos. La bibliografía representativa que describe la estructura y la producción de los CO que pueden ser adecuados para usar en la presente invención es la siguiente: Muller, et al., Plant Physiol. 124: 733-9 (2000); Van der Holst, et al., Current Opinion in Structural Biology, 11: 608-616 (2001) (por ejemplo, la figura 1 en el mismo); Robina, et al., Tetrahedron 58: 521-530 (2002); D'Haeze, et al., Glycobiol. 12(6): 79R-105R (2002); Hamel, et al., Planta 232: 787-806 (2010) (por ejemplo, la figura 1 que muestra estructuras de quitina, quitosano, CO y los factores Nod correspondientes (LCO)); Rouge, et al. Chapter 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" en Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science; Wan, et al., Plant Cell 21: 1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000); y Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120(1):83-92 (1999).

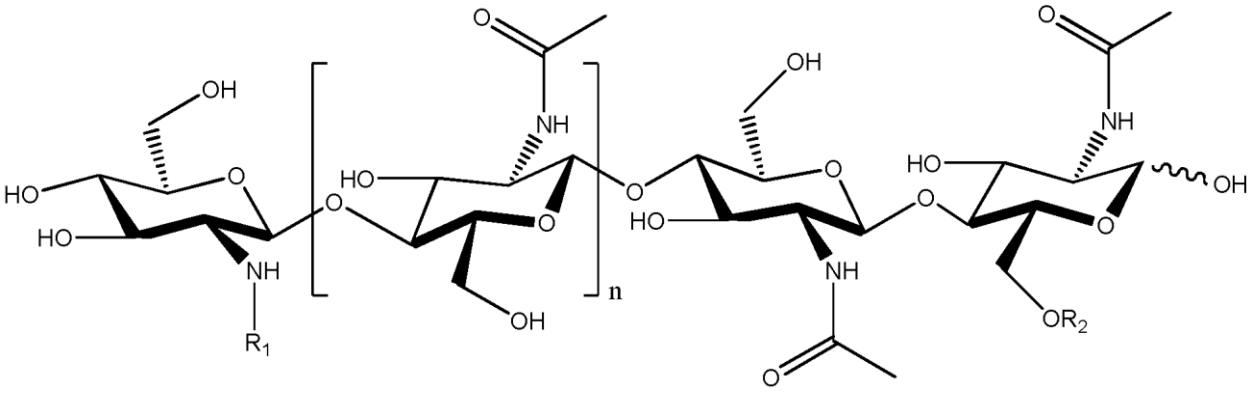
[0036] Los CO difieren de los LCO en cuanto a estructura principalmente en que carecen de la cadena de ácido graso colgante. Los CO derivados de rizobios y los derivados sintéticos de origen no natural de los mismos, que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención, se pueden representar mediante la fórmula siguiente:



donde R_1 y R_2 representa cada uno independientemente hidrógeno o metilo; R_3 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_4 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_5 representa hidrógeno, acetilo o carbamoilo; R_6 representa hidrógeno, arabinosilo, fucosilo, acetilo, éster de sulfato, 3-*0*-S-2-*0*-MeFuc, 2-*0*-MeFuc y 4-*0*-AcFuc; R_7 representa hidrógeno, manosilo o glicerol; R_8 representa hidrógeno, metilo o $-CH_2OH$; R_9 representa hidrógeno, arabinosilo o fucosilo; R_{10} representa hidrógeno, acetilo o fucosilo; y n representa 0, 1, 2 o 3. Las estructuras de los LCO de rizobios correspondientes se describen en D'Haeze, et al., *supra*.

[0037] Dos CO adecuados para usar en la presente invención se ilustran en las figuras 1b y 2b. Se corresponden a los LCO producidos por *Bradyrhizobium japonicum* y *R. leguminosarum* variedad biológica *viciae*, respectivamente, que interactúan simbióticamente con la soja y el guisante, respectivamente, pero carecen de las cadenas de ácido graso.

[0038] Las estructuras de otros CO que pueden ser adecuados para usar en la práctica de la presente invención son fácilmente derivables a partir de LCO obtenidos (es decir, aislados y/o purificados) de unos hongos micorrícicos, tales como hongos del grupo Glomerocycota, por ejemplo, *Glomus intraradices*. Véase, por ejemplo, WO 2010/049751 y Maillet, et al., Nature 469: 58-63 (2011) (también se hace referencia a los LCO descritos en el mismo como "factores Myc"). Los CO derivados de hongos micorrícicos representativos se representan mediante la estructura siguiente:



donde n = 1 o 2; R_1 representa hidrógeno o metilo; y R_2 representa hidrógeno o SO_3H. Otros dos CO adecuados para usar en la presente invención, uno de los cuales está sulfatado y el otro no está sulfatado, se ilustran en las figuras 3b y 4b respectivamente. Corresponden a los dos LCO diferentes anteriormente mencionados producidos por los hongos micorrícicos *Glomus intraradices* y que se ilustran en las figuras 3a y 4a.

[0039] Los CO pueden ser sintéticos o recombinantes. Se describen métodos para preparar CO sintéticos, por ejemplo, en Robina, *supra*. Métodos para producir CO recombinantes, por ejemplo, usando *E. coli* como huésped, se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Dumon, et al., ChemBioChem 7: 359-65 (2006), Samain, et al., Carbohydrate Res. 302: 35-42 (1997); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4): 311-7 (2005) y Samain, et al., J. Biotechnol. 72: 33-47 (1999) (por ejemplo., la figura 1 en el mismo que muestra estructuras de CO que se pueden producir de manera recombinante en *E. coli* con diferentes combinaciones de genes *nodBCHL*). A efectos de la presente invención, los CO recombinantes son al menos un 60% puros, por ejemplo, al menos un 60% puros, al menos un 65% puros, al menos un 70% puros, al menos un 75% puros, al menos un 80% puros, al menos un 85% puros, al menos un 90% puros, al menos un 91% puros, al menos un 92% puros, al menos un 93% puros, al menos un 94% puros, al menos un 95% puros, al menos un 96% puros, al menos un 97% puros, al menos un 98% puros, al menos un 99% puros, hasta un 100% puros.

[0040] Otros compuestos quitinosos incluyen quitinas y quitosanos, que son componentes principales de las paredes celulares de los hongos y los exoesqueletos de insectos y crustáceos, están también compuestos por residuos GlcNAc. Los compuestos quitinosos incluyen quitina (IUPAC: *N*-[5-[[3-acetilamino-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-is]etanamida) y quitosano (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-2(hidroximetil)oxano-3,4-diol). Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, o preparar a partir de insectos, caparazones de crustáceos o paredes de células fúngicas. Se conocen en la técnica métodos para la preparación de quitina y quitosano, y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4,536,207 (preparación a partir de caparazones de crustáceos), Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35: 17-21 (2002) (preparación a partir de paredes de células fúngicas) y la patente de EE.UU. 5,965,545 (preparación a partir de caparazones de cangrejos e hidrólisis de quitosano comercial). Véase, también, Jung, et al., Carbohydrate Polymers 67: 256-59 (2007); Khan, et al., Photosynthetica 40(4): 621-4 (2002). Se pueden obtener quitinas y quitosanos desacetilados que varían desde menos de un 35% hasta más de un 90% de desacetilación y cubren un amplio espectro de pesos moleculares, por ejemplo, oligómeros de quitosano de bajo peso molecular de menos de 15 kDa y oligómeros de quitina de 0,5 a 2 kDa; quitosano de "grado práctico" con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa; y quitosano de alto peso molecular de hasta 700 kDa. También hay disponibles comercialmente composiciones de quitina y quitosano formuladas para el tratamiento de semilla. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

[0041] Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Los flavonoides son producidos por plantas y tienen muchas funciones, por ejemplo, como moléculas de señalización beneficiosas y como protección contra insectos, animales, hongos y bacterias. Las clases de flavonoides incluyen chalconas, antocianidinas, cumarinas, flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas e isoflavonas. Véase, Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11: 1-10 (2002); Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11: 1867-80 (2006).

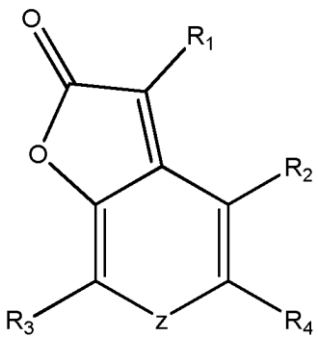
[0042] Los flavonoides representativos que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen genisteína, daidceína, formononetina, naringenina, hesperetina, luteolina y apigenina. Hay compuestos flavonoides disponibles comercialmente, por ejemplo, de Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA. Los compuestos flavonoides se pueden aislar de plantas o semillas, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. 5,702,752; 5,990,291; y 6,146,668. Los

compuestos flavonoides también pueden ser producidos por organismos genéticamente modificados, tales como levaduras, como se describe en Ralston, et al., Plant Physiology 137: 1375-88 (2005).

[0043] El ácido jasmónico (JA, ácido [1*R*-[1α,2β(*Z*)]]-3-oxo-2-(pentenil)ciclopentanoacético) y sus derivados (que incluyen el ácido linoleico y el ácido linolénico (que se han descrito anteriormente en relación con los ácidos grasos y sus derivados) se pueden usar en la práctica de la presente invención. El ácido jasmónico y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), conocidos en conjunto como jasmonatos, son compuestos basados en octadecanoides que ocurren naturalmente en plantas. El ácido jasmónico es producido por las raíces de plántulas de trigo y por microorganismos fúngicos tales como *Botryodiplodia theobromae* y *Gibbrella fujikuroi*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia coli*. El ácido linoleico y el ácido linolénico se producen en el curso de la biosíntesis del ácido jasmónico. Al igual que el ácido linoleico y el ácido linolénico, se ha informado que los jasmonatos (y sus derivados) son inductores de la expresión del gen *Nod* o la producción de LCO por rizobacterias. Véase, por ejemplo, Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*, 17 de mayo de 2001.

[0044] Los derivados útiles del ácido jasmónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen ésteres, amidas, glucósidos y sales. Los ésteres representativos son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido jasmónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico se ha sustituido por un grupo --COR, donde R es un grupo --OR^1, donde R^1 es: un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C_1-C_8 no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alquenilo, tal como un grupo alquenilo C_2-C_8 no ramificado o ramificado; un grupo alquinilo, tal como un grupo alquinilo C_2-C_8 no ramificado o ramificado; un grupo arilo con, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo con, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos del grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Las amidas representativas son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido jasmónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico se ha sustituido por un grupo --COR, donde R es un grupo NR^2R^3, donde R^2 y R^3 son independientemente: hidrógeno; un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C_1-C_8 no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alquenilo, tal como un grupo alquenilo C_2-C_8 no ramificado o ramificado; un grupo alquinilo, tal como un grupo alquinilo C_2-C_8 no ramificado o ramificado; un grupo arilo con, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo con, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos del grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Los ésteres se pueden preparar por métodos conocidos, tales como la adición nucleofílica catalizada por ácido, donde se hace reaccionar el ácido carboxílico con un alcohol en presencia de una cantidad catalítica de un ácido mineral. Las amidas también se pueden preparar por métodos conocidos, tal como haciendo reaccionar el ácido carboxílico con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento tal como la diciclohexilcarbodiimida (DCC), bajo condiciones neutras. Las sales adecuadas del ácido jasmónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico incluyen, por ejemplo, sales de adición de base. Las bases que se pueden usar como reactivos para preparar sales básicas metabólicamente aceptables de estos compuestos incluyen aquellas derivadas de cationes tales como cationes de metales alcalinos (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio). Estas sales se pueden preparar fácilmente mezclando una solución de ácido linoleico, ácido linolénico o ácido jasmónico con una solución de la base. La sal se puede precipitar de una solución y recogerse por filtración o se puede recuperar por otros medios tal como por evaporación del solvente.

[0045] Las karrikinas son 4*H*-pironas vinílogas, por ejemplo, 2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-onas incluyendo derivados y sus análogos. Ejemplos de estos compuestos se representan mediante la estructura siguiente:



donde Z es O, S o NR_5; R_1, R_2, R_3 y R_4 son cada uno independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, feniloxi, benziloxi, CN, COR_6, COOR=, halógeno, NR_6R_7 o NO_2; y R_5, R_6, y R_7 son cada uno independientemente H, alquilo o alquenilo, o una sal derivada biológicamente aceptable. Los ejemplos de sales biológicamente aceptables de estos compuestos pueden incluir sales de adición de ácido formadas con ácidos biológicamente aceptables, los ejemplos de las cuales incluyen hidrocloruro, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato de hidrógeno, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato,

tartrato, gluconato; metanosulfonato, bencenosulfonato y ácido *p*-toluenosulfónico. Las sales metálicas biológicamente aceptables adicionales pueden incluir sales de metales alcalinos, con bases, ejemplos de las cuales incluyen las sales de sodio y potasio. Los ejemplos de compuestos abarcados por la estructura y que pueden ser adecuados para usar en la presente invención incluyen los siguientes: 3-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1=CH_3, R_2, R_3, R_4=H), 2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_2, R_3, R_4=H), 7-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_2, R_4=H, R_3=CH_3), 5-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_2, R_3=H, R_4=CH_3), 3,7-dimetil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_3=CH_3, R_2, R_4=H), 3,5-dimetil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_4=CH_3, R_2, R_3=H), 3,5,7-trimetil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_3, R_4=CH_3, R_2=H), 5-metoximetil-3-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1=CH_3, R_2, R_3=H, R_4=CH2OCH_3), 4-bromo-3,7-dimetil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (donde R_1, R_3=CH_3, R_2=Br, R_4=H), 3-metilfuro[2,3-*c*]piridin-2(3*H*)-ona (donde Z=NH, R_1=CH_3, R_2, R_3, R_4=H), 3,6-dimetilfuro[2,3-*c*]piridin-2(6*H*)-ona (donde Z=N--CH_3, R_1=CH_3, R_2, R_3, R_4=H). Véase, la patente de EE.UU. 7,576,213. Estas moléculas también se conocen como karrikinas. Véase, Halford, *supra*.

[0046] La cantidad de la al menos una molécula de señalización de planta usada para tratar la semilla, expresada en unidades de concentración, varía generalmente de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-14} M (concentración molar) y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-11} M y, en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-8} M. Expresada en unidades de peso, la cantidad eficaz varía generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 µg/cien libras (CWT) de semilla y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 µg/cwt y, en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0 µg/cwt semilla.

[0047] A efectos del tratamiento indirecto de semilla, es decir, tratamiento en surco, la cantidad eficaz de la al menos una molécula de señalización de planta varía generalmente de 1 µg/acre a aproximadamente 70 µg/acre y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 50 µg/acre a aproximadamente 60 µg/acre. A efectos de aplicación a las plantas, la cantidad eficaz de la al menos una molécula de señalización de planta varía generalmente de 1 µg/acre a aproximadamente 30 µg/acre y, en algunas formas de realización, de aproximadamente 11 µg/acre a aproximadamente 20 µg/acre.

Herbicidas, fungicidas e insecticidas

[0048] Los herbicidas adecuados incluyen bentazona, acifluorfeno, clorimurón, lactofeno, clomazona, fluazifop, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafén, flumiclorac, imazaquin y cletodim. Hay productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos fácilmente disponibles. La concentración de herbicida en la composición corresponderá generalmente a la dosis de uso marcada para un herbicida particular.

[0049] Un "fungicida" como se utiliza en la presente y en la técnica, es un agente que mata o inhibe el crecimiento fúngico. Como se utiliza en la presente, un fungicida "muestra actividad contra" una especie particular de hongos si el tratamiento con el fungicida resulta en la muerte o la inhibición del crecimiento de una población fúngica (por ejemplo, en el suelo) con respecto a una población no tratada. Los fungicidas eficaces conforme a la invención mostrarán adecuadamente actividad contra una amplia gama de patógenos, incluyendo, pero de forma no limititativa, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* o *Selerotinia* y *Phakopsora* y combinaciones de los mismos.

[0050] Los fungicidas comerciales pueden ser adecuados para usar en la presente invención. Los fungicidas disponibles comercialmente adecuados incluyen PROTÉGÉ, RIVAL o ALLEGIANCE FL o LS (Gustafson, Plano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA o RFC, MAXIM 4FS o XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontario) y PROTREAT (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina). Los ingredientes activos de estos y otros fungicidas comerciales incluyen, pero de forma no limitativa, fludioxonil, mefenoxam, azoxistrobin y metalaxil. Los fungicidas comerciales se usan más adecuadamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

[0051] Como se utiliza en la presente, un insecticida "muestra actividad contra" una especie particular de insecto si el tratamiento con el insecticida resulta en la muerte o la inhibición de una población de insectos con respecto a una población no tratada. Los insecticidas eficaces conforme a la invención mostrarán adecuadamente actividad contra una amplia gama de insectos incluyendo, pero de forma no limitativa, gusanos alambre, gusanos cortadores, larvas, gusano de la raíz de maíz, moscas del maíz, escarabajos pulga, chinches de los cereales, áfidos, crisomélidos y chinches apestosas.

[0052] Los insecticidas comerciales pueden ser adecuados para usar en la presente invención. Los insecticidas disponibles comercialmente adecuados incluyen CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO y PONCHO (Gustafson, Plano, TX). Los ingredientes activos de estos y otros insecticidas comerciales incluyen tiametoxam, clotianidina e imidacloprid. Los insecticidas comerciales se usan más adecuadamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

Microorganismos solubilizantes de fosfato, diazótrofos (inoculantes de rizobios) y/u hongos microrrícicos.

[0053] La presente invención puede incluir además el tratamiento de la semilla con un microorganismo solubilizante de fosfato. Como se utiliza en la presente, "microorganismo solubilizante de fosfato" es un microorganismo que es capaz de aumentar la cantidad de fósforo disponible para una planta. Los microorganismos solubilizantes de fosfato incluyen cepas bacterianas y fúngicas. En una forma de realización, el microorganismo solubilizante de fosfato es un microorganismo formador de esporas.

[0054] Los ejemplos no limitativos de microorganismos solubilizantes de fosfato incluyen especies de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* y *Xanthomonas*.

[0055] Ejemplos no limitativos de microorganismos solubilizantes de fosfato se seleccionan del grupo que consiste en *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter sp*, *Arthrobacter sp*., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp*., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter sp*., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium sp*., *Klebsiella sp*., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium sp*., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea aglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces sp*., *Streptosporangium sp*., *Swaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* y *Xanthomonas campestris*.

[0056] En una forma de realización particular, el microorganismo solubilizante de fosfato es una cepa del hongo *Penicillium*. Las cepas del hongo *Penicillium* que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen *P. bilaiae* (anteriormente conocido como *P. bilaii*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variabile*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus* y *P. expansum*.

[0057] En una forma de realización particular, la especie de *Penicillium* es *P. bilaiae*. En otra forma de realización particular las cepas de *P. bilaiae* se seleccionan del grupo que consiste en ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin, et al., 2004. Biol Fertil Soils 40: 36-43). En otra forma de realización particular la especie de *Penicillium* es *P. gaestrivorus*, por ejemplo, NRRL 50170 (ver, Wakelin, *supra*.).

[0058] En algunas formas de realización, se usa más de un microorganismo solubilizante de fosfato, tal como, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos 6, incluyendo cualquier combinación de *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* y *Xanthomonas*, incluyendo una especie seleccionada del grupo siguiente: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter sp*, *Arthrobacter sp*., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp*., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter sp*., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium sp*., *Klebsiella sp*., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium sp*., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea aglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces sp*., *Streptosporangium sp*., *Swaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* y *Xanthomonas campestris*.

[0059] En algunas formas de realización, también pueden combinarse dos cepas diferentes de la misma especie, por ejemplo, se usan al menos dos cepas diferentes de *Penicillium*. El uso de una combinación de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* tiene las ventajas siguientes. Cuando se aplica a un suelo que ya contiene fosfatos insolubles (o difícilmente solubles), el uso de las cepas fúngicas combinadas dará lugar a un aumento en la cantidad

de fósforo disponible para la absorción de la planta en comparación con el uso de solo una cepa de *Penicillium*. Esto a su vez puede resultar en un aumento en la absorción de fosfato y/o un aumento en el rendimiento de plantas cultivadas en el suelo en comparación con el uso de cepas individuales solo. La combinación de cepas permite también usar fosfatos de roca insolubles como un fertilizante eficaz para suelos que tienen cantidades inadecuadas de fósforo disponible. Así, en algunas formas de realización, se usan una cepa de *P. bilaiae* y una cepa de *P. gaestrivorus*. En otras formas de realización, las dos cepas son NRRL 50169 y NRRL 50162. En formas de realización adicionales, las al menos dos cepas son NRRL 50169 y NRRL 50170. En otras formas de realización adicionales, las al menos dos cepas son NRRL 50162 y NRRL 50170.

[0060] Los microorganismos solubilizantes de fosfato pueden prepararse usando cualquier método adecuado conocido por la persona experta en la materia, tal como, la fermentación en estado sólido o líquida usando una fuente de carbono adecuada. El microorganismo solubilizante de fosfato se prepara preferiblemente en forma de una espora estable.

[0061] En una forma de realización, el microorganismo solubilizante de fosfato es un hongo *Penicillium*. El hongo *Penicillium* según la invención se puede cultivar usando la fermentación en estado sólido o líquida y una fuente de carbono adecuada. Se pueden cultivar aislados de *Penicillium* usando cualquier método adecuado conocido por la persona experta en la materia. Por ejemplo, el hongo se puede cultivar en un medio de crecimiento sólido, tal como el agar de patata y dextrosa o el agar de extracto de malta, o en matraces con medios líquidos adecuados tales como medio Czapek-Dox o caldo de patata y dextrosa. Estos métodos de cultivo se pueden usar en la preparación de un inóculo de *Penicillium spp*. para tratar (por ejemplo, por recubrimiento) semillas y/o aplicar a un portador agronómicamente aceptable que se va a aplicar al suelo. El término "inóculo" como se usa en esta especificación pretende referirse a cualquier forma de microorganismo solubilizante de fosfato, células, micelio o esporas fúngicas, células bacterianas o esporas bacterianas, que es capaz de propagarse sobre o en el suelo cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc. son favorables para el crecimiento fúngico.

[0062] La producción en estado sólido de esporas de *Penicillium* se pueden conseguir inoculando un medio sólido tal como una turba o sustrato a base de vermiculita o granos que incluyen, pero de forma no limitativa, avena, trigo, cebada, o arroz. El medio esterilizado (conseguido a través de autoclave o irradiación) se inocula con una suspensión de esporas ($1x10^2$-$1x10^7$ UFC/ml) de la *Penicillium spp*. apropiada y la humedad se ajusta a de un 20 a un 50%, en función del sustrato. El material se incuba durante 2 a 8 semanas a temperatura ambiente. Las esporas también se pueden producir por fermentación líquida (Cunningham et al., 1990. Can J Bot. 68: 2270-2274). La producción líquida se puede conseguir cultivando el hongo en cualquier medio adecuado, tal como caldo de patata y dextrosa o medios de sacarosa y extracto de levadura, bajo condiciones apropiadas de pH y temperatura que se pueden determinar conforme a procedimientos estándares en la técnica.

[0063] Se puede usar el material resultante directamente o se pueden recoger las esporas, concentrarse por centrifugación, formularse y luego secarse usando secado al aire, liofilización o técnicas de secado de lecho fluidizado (Friesen, et al., 2005, Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 397-404) para producir un polvo humectable. El polvo humectable se suspende entonces en agua, se aplica a la superficie de las semillas y se deja secar antes de la siembra. El polvo humectable se puede usar en conjunto con otros tratamientos de semilla, tal como, pero de forma no limitativa, tratamientos de semilla químicos, portadores (por ejemplo, talco, arcilla, caolín, gel de sílice, caolinita) o polímeros (por ejemplo, metilcelulosa, polivinilpirrolidona). Alternativamente, una suspensión de esporas de la *Penicillium spp*. apropiada se puede aplicar a un portador adecuado compatible con el suelo (por ejemplo, polvo o gránulo a base de turba) hasta un contenido de humedad final apropiado. El material se puede incubar a temperatura ambiente, típicamente durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 8 semanas, antes del uso.

[0064] Aparte de los ingredientes usados para cultivar el microorganismo solubilizante de fosfato, incluyendo, por ejemplo, ingredientes mencionados anteriormente en el cultivo de *Penicillium*, el microorganismo solubilizante de fosfato puede formularse usando otros portadores agronómicamente aceptables. Como se utiliza en la presente en relación con un "portador", el término "agronómicamente aceptable" se refiere a cualquier material que se pueda usar para suministrar los activos a una semilla, suelo o planta, y preferiblemente dicho portador se puede añadir (a la semilla, suelo o planta) sin tener un efecto adverso en el crecimiento de la planta, la estructura del suelo, el drenaje del suelo o similar. Los portadores adecuados comprenden, pero de forma no limitativa, paja de trigo, salvado, paja de trigo molida, polvos o gránulos a base de turba, gránulos a base de yeso, y arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorillonita). Cuando se añaden esporas al suelo, será preferible una formulación granulosa. Las formulaciones como líquido, turba o polvo humectable serán adecuadas para el recubrimiento de semillas. Cuando se usa para recubrir semillas, el material se puede mezclar con agua, aplicar a las semillas y dejar secar. Los ejemplos de otros portadores incluyen salvado humedecido, secado, tamizado y aplicado a semillas recubiertas previamente con un adhesivo, por ejemplo, goma arábiga. En formas de realización que implican la formulación de los activos en una composición única, el portador agronómicamente aceptable puede ser acuoso.

[0065] La cantidad del al menos un microorganismo solubilizante de fosfato varía en función del tipo de semilla o suelo, el tipo de plantas de cultivo, las cantidades de la fuente de fósforo y/o los micronutrientes presentes en el

suelo o añadidas al mismo, etc. Se puede hallar una cantidad adecuada mediante simples experimentos de prueba y error para cada caso particular. Normalmente, para *Penicillium*, por ejemplo, la cantidad de aplicación cae en el intervalo de 0,001-1,0 kg de esporas fúngicas y micelio (peso fresco) por hectárea, o 10^2-10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por semilla (cuando se usan semillas recubiertas), o en un portador granuloso aplicando entre $1x10^6$ y $1x10^{11}$ unidades formadoras de colonias por hectárea. Las células fúngicas en forma de, por ejemplo, esporas y el portador se pueden añadir a una hilera de semillas del suelo al nivel de la raíz o se pueden usar para recubrir las semillas antes de la siembra.

[0066] En formas de realización, por ejemplo, que implican el uso de al menos dos cepas de un microorganismo solubilizante de fosfato, tal como, dos cepas de *Penicillium*, se pueden añadir fertilizantes comerciales al suelo en vez de (o incluso además de) fosfato de roca natural. La fuente de fósforo puede contener una fuente de fósforo nativa del suelo. En otras formas de realización, la fuente de fósforo se puede añadir al suelo. En una forma de realización, la fuente es fosfato de roca. En otra forma de realización la fuente es un fertilizante fabricado. Los fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de monoamonio (MAP), súper fosfato triple (TSP), fosfato diamónico, superfosfato ordinario y polifosfato de amonio. Todos estos fertilizantes se producen por procesamiento químico de fosfatos de roca naturales insolubles en instalaciones de fabricación de fertilizantes a gran escala y el producto es costoso. Mediante la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras se sigue manteniendo la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

[0067] En otra forma de realización, la fuente de fósforo es orgánica. Un fertilizante orgánico se refiere a una enmienda del suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato y potasa. Los ejemplos incluyen productos derivados de plantas y animales, polvos de roca, algas, inoculantes y acondicionadores. Los ejemplos representativos específicos incluyen harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora o guano.

[0068] Por supuesto, otros fertilizantes, tal como fuentes de nitrógeno, u otras enmiendas de suelo pueden añadirse también al suelo a aproximadamente el mismo tiempo que el microorganismo solubilizante de fosfato o en otros momentos, siempre y cuando los otros materiales no sean tóxicos para el hongo.

[0069] Los diazótrofos son bacterias y arqueas que fijan el gas nitrógeno atmosférico en una forma más utilizable, tal como el amoníaco. Los ejemplos de diazótrofos incluyen bacterias de los géneros *Rhizobium spp*. (por ejemplo, *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R.* gallicum, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola* y/o *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium spp*. (por ejemplo, *B. bete*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi* y/o *B. yuanmingense*), *Azorhizobium spp*. (por ejemplo, *A. caulinodans* y/o *A. doebereinerae*), *Sinorhizobium spp*. (por ejemplo, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. saheli*, *S. terangae* y/o *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium spp*., (*M. albiziae*, M. *amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluifarium*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* y/o *M. tianshanense*) y combinaciones de las mismas. En una forma de realización particular, el diazótrofo se selecciona del grupo que consiste en *B. japonicum*, *R leguminosarum*, *R meliloti*, *S. meliloti* y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el diazótrofo es *B. japonicum*. En otra forma de realización, el diazótrofo es *R. leguminosarum*. En otra forma de realización, el diazótrofo es *R. meliloti*. En otra forma de realización, el diazótrofo es *S. meliloti*.

[0070] Los hongos micorrícicos forman asociaciones simbióticas con las raíces de una planta vascular y proporcionan, por ejemplo, capacidad de absorción de agua y nutrientes minerales debido al área superficial comparativamente grande del micelio. Los hongos micorrícicos incluyen hongos endomicorrícicos (también llamados micorrizas vesiculares arbusculares, MVA, micorrizas arbusculares o MA), hongos ectomicorrícicos o una combinación de los mismos. En una forma de realización, los hongos micorrícicos son endomicorrizas del filo Glomeromycota y los géneros *Glomus* y *Gigaspora*. En otra forma de realización más, las endomicorrizas son una cepa de *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum* o *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita* o una combinación de las mismas.

[0071] Los ejemplos de hongos micorrícicos incluyen ectomicorrizas del filo Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota. Otros ejemplos incluyen una cepa de *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma citrinum* o una combinación de las mismas.

[0072] Los hongos micorrícicos incluyen micorrizas ecroides, micorrizas arbutoides o micorrizas monotropoides. Las arbusculares y las ectomicorrizas forman micorrizas ericoides con muchas plantas de la orden Ericales,

mientras que algunas Ericales forman micorrizas arbutoides y monotropoides. En una forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza ericoide, preferiblemente del filo Ascomycota, tal como *Hymenoscyphous ericae* u *Oidiodendron sp*. En otra forma de realización, la micorriza también puede ser una micorriza arbutoide, preferiblemente del filo Basidiomycota. En otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza monotripoide, preferiblemente del filo Basidiomycota. En otra forma de realización más, la micorriza puede ser una micorriza de orquídea, preferiblemente del género *Rhizoctonia*.

[0073] Los métodos de la presente invención son aplicables a una semilla leguminosa, ejemplos representativos de las cuales incluyen soja, alfalfa, cacahuete, guisante, lenteja, judía y trébol. Los métodos de la presente invención son también aplicables a una semilla no leguminosa, por ejemplo, Poaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae y Solonaceae. Los ejemplos representativos de una semilla no leguminosa incluyen plantas de cultivo extensivo tales como maíz, arroz, avena, centeno, cebada y trigo, algodón y canola, y hortalizas tales como patatas, tomates, pepinos, remolachas, lechuga y melón cantalupo.

[0074] La invención se describirá ahora en relación con los siguientes ejemplos no limitativos. A menos que se indique lo contrario, se usó agua como control (indicado como "control").

Ejemplos

Experimentos de invernadero

Ejemplo 1: crecimiento de plántulas de Siratro *in vitro* aumentado mediante combinaciones de LCO

[0075] Las semillas de Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) se sometieron a esterilización de superficie con una solución de blanqueador al 10% durante 10 minutos seguida de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas se colocaron luego en tubos de ensayo que contenían 15 ml de medio de agar solidificado estéril suplementado con los LCO ilustrados en las figuras 1a y 2a (y a los que se hace referencia en los ejemplos como el "LCO de soja" y el "LCO de guisante") (con una concentración total de 10^{-8} M solo o en combinación). Otros dos LCO, es decir, el LCO de guisante o el LCO ilustrado en la figura 5 (al que también se hace referencia en los ejemplos como el "LCO de alfalfa") se añadió al LCO de soja para estudiar el efecto de sus combinaciones. Las semillas se cultivaron durante 7 días bajo luz de cultivo a 20°C con ciclo de día/noche de 16/8 h y luego se cosecharon para determinar la longitud de las plántulas.

[0076] Como se refleja mediante la comparación entre el LCO de soja combinado con otro LCO (forma de realización de la invención) y el LCO de soja solo (no de la invención y comparable), la combinación del LCO de soja y de alfalfa fue más eficaz que el LCO de soja solo o su combinación con el LCO de guisante (Fig. 6). El LCO de soja combinado con el LCO de alfalfa produjo la plántula más alta cuando se sumaron la raíz total y la longitud del brote. Esta diferencia fue significativa.

REFERENCIA 2: aplicación foliar de LCO en tomate cereza

[0077] En base a los resultados de la combinación del LCO de soja y el LCO de alfalfa en Siratro (ejemplo 1), se realizó una investigación adicional en tomate. Plantas de tomate cereza Florida petite se cultivaron a partir de semillas en recipientes de plástico de invernadero y se pulverizaron con el LCO de soja o su combinación con el LCO de alfalfa durante la iniciación de los capullos con una dosis de aplicación de 5 ml/planta. Se aplicó también una segunda pulverización una semana después de la primera aplicación. Con grados de madurez diferentes, se midieron el verdor foliar, el número de flores, el número de frutos y el peso fresco de fruto final.

[0078] Los resultados conseguidos mediante la forma de realización (LCO de soja + LCO de alfalfa) (no según la invención) mostraron que hubo un ligero aumento en el verdor foliar con la combinación de LCO en comparación con el LCO de soja no de la invención y comparable (Figs. 7 y 8). En cuanto a las flores totales formadas a lo largo de un periodo de cinco días, la combinación de LCO fue significativamente superior al LCO de soja no de la invención. De forma similar, cuando se contaron los números de fruto a lo largo de un periodo de seis días, la combinación de LCO de soja y de alfalfa resultó ser significativamente superior al LCO de soja (Figs. 9 y 10). Al final de la cosecha, el número medio de fruto por planta fue mayor significativamente para el LCO de soja no de la invención y la combinación de LCO de soja-alfalfa en comparación con el tratamiento de control. Sin embargo, el rendimiento en peso fresco medio de tomates cereza fue solo significativo para la combinación de LCO soja-alfalfa respecto a los LCO de control y de soja (Figs. 11 y 12).

EJEMPLO 3: LCO y sus combinaciones en el crecimiento de las raíces de plántulas de tomate

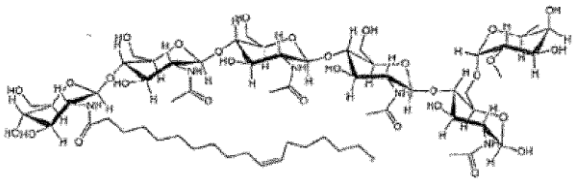
[0079] Se colocaron semillas de tomate de la variedad Royal Mounty en placas Petri con papel de germinación húmedo (empapado con soluciones de tratamiento). Las soluciones de tratamiento se prepararon con cuatro LCO diferentes, es decir, LCO de guisante AC (acilado), LCO de guisante NAC (no acilado), LCO de alfalfa y LCO de soja. La concentración total de LCO usada para preparar una solución de tratamiento a base de agua se mantuvo a 10^{-9} M. Luego se colocaron las placas Petri a oscuras a temperatura ambiente para la germinación. Ocho días después de la germinación, las plántulas se midieron con una regla de bolsillo para determinar su longitud de las raíces.

[0080] Los resultados obtenidos de este experimento indicaron que todos los tipos de LCO individuales aumentaron la longitud de las raíces de las plántulas de tomate en comparación con el control, pero solo determinadas combinaciones de LCO, es decir, LCO de guisante NAC y soja, LCO de guisante AC más soja y LCO de guisante NAC más alfalfa, generaron un aumento de raíz significativo en comparación con los tipos de LCO únicos no de la invención y comparables (Fig. 13). A partir del experimento, parece ser que, para las plántulas de tomate, la combinación de LCO de guisante NAC y soja fue la mejor de todas las combinaciones. Los resultados indican también que unas combinaciones de determinados LCO fueron más beneficiosas para las plántulas de tomate que otras y se puede excluir que la combinación de los cuatro LCO fue mejor.

REIVINDICACIONES

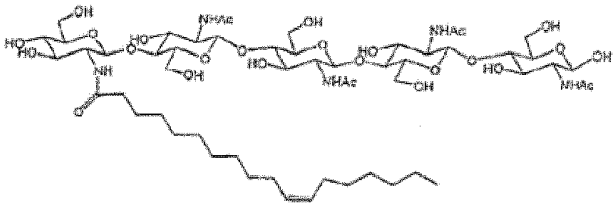
1. Método de aumento del crecimiento de plantas, donde al cosechar la planta muestra al menos uno de entre un mayor rendimiento de las plantas medido en términos de fanegas/acre, un mayor número de raíces, una mayor longitud de las raíces, una mayor masa de raíces, un mayor volumen de raíces y una mayor área foliar, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas, donde dicho método comprende tratar una semilla de planta y/o la planta que germina a partir de la semilla con una cantidad eficaz de al menos dos lipo-quitooligosacáridos (LCO) distintos, donde los al menos dos LCO comprenden:

a.



[Fig. 1a]

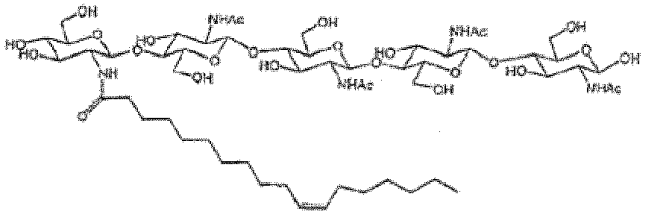
y



[Fig. 2a];

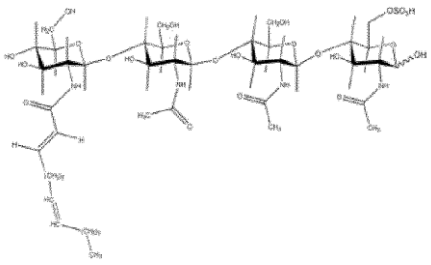
o

b.



[Fig. 2a]

y



[Fig. 5];

2. Método según la reivindicación 1, donde los al menos dos LCO se aplican a la semilla antes de la siembra.

3. Método según la reivindicación 1, donde los al menos dos LCO se aplican a la semilla en aproximadamente el momento de la siembra.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO se aplican a una concentración de 10^{-5} a 10^{-14} molar, opcionalmente de 10^{-5} a 10^{-11} molar, opcionalmente de 10^{-7} a 10^{-8} molar.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO se aplican a una dosis de 1 a 400 µg por cien libras de semillas, opcionalmente de 2 a 70 µg por cien libras de semillas, opcionalmente de 2,5 a 3 µg por cien libras de semillas.

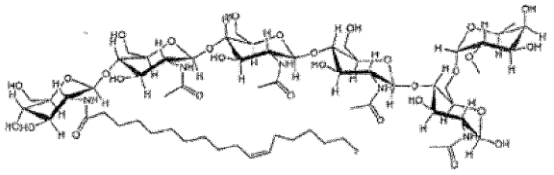
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO se aplican a la semilla en surco.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO se aplican a una dosis de 1 a 70 µg por 4047 m^2 (1 acre), opcionalmente de 1 a 30 µg por 4047 m^2 (1 acre), opcionalmente de 1 a 20 µg por 4047 m^2 (1 acre), opcionalmente de 50 a 60 µg por 4047 m^2 (1 acre).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además tratar la semilla de planta y/o la planta que germina a partir de la semilla con uno o más agentes agronómicamente beneficiosos seleccionados del grupo que consiste en quitooligosacáridos, quitinas, quitosanos, flavonoides, ácido jasmónico, ácido linoleico, ácido linolénico, karrakinas, micronutrientes, herbicidas, insecticidas, fungicidas, diazótrofos, microorganismos solubilizantes de fosfato, hongos micorrícicos, y combinaciones de los mismos.

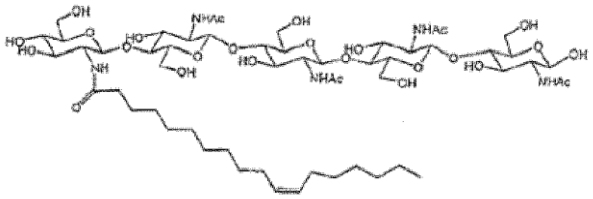
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además tratar la semilla de planta y/o la planta que germina a partir de la semilla con *Penicillium bilaiae* NRRL 50162, *Penicillium bilaiae* NRRL 50169, *Penicillium bilaiae* ATCC 20851, *Penicillium bilaiae* ATCC 22348 y/o *Penicillium bilaiae* ATCC 18309.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO son:



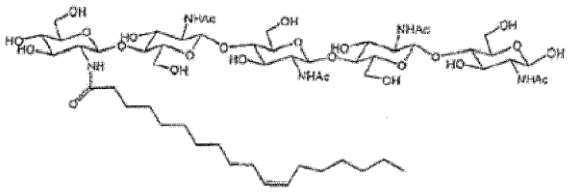
[Fig. 1a]

y



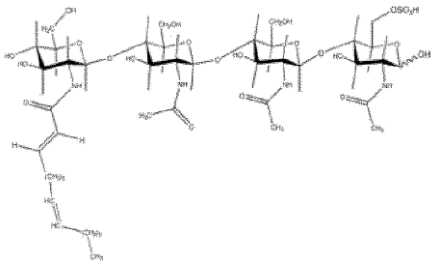
[Fig. 2a].

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los al menos dos LCO son



[Fig. 2a]

y



[Fig. 5].

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la semilla es una semilla de tomate.

FIG. 1a

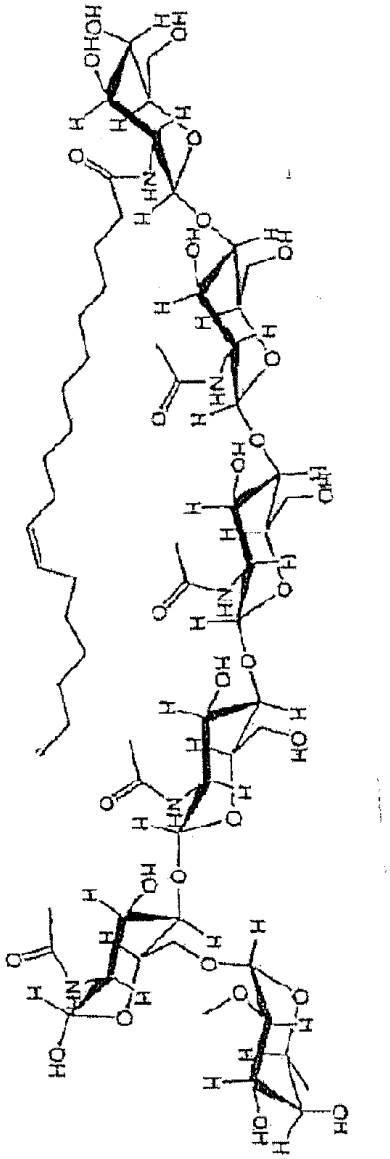
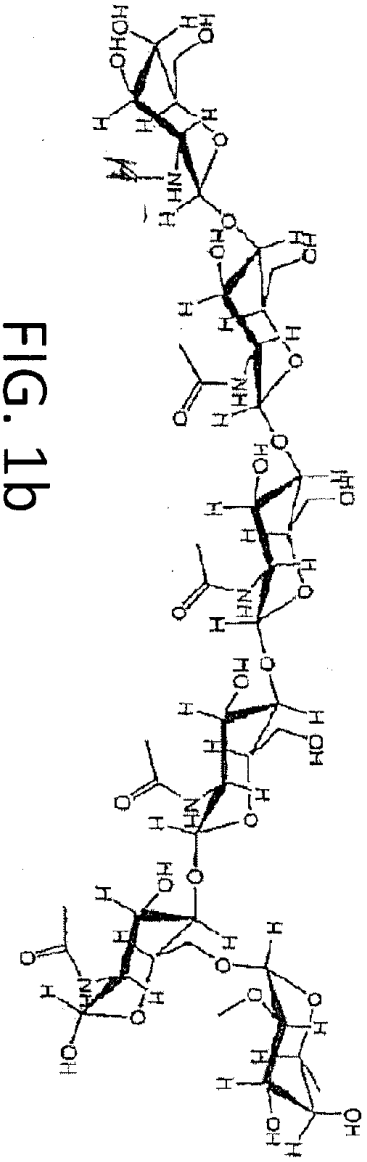


FIG. 1b



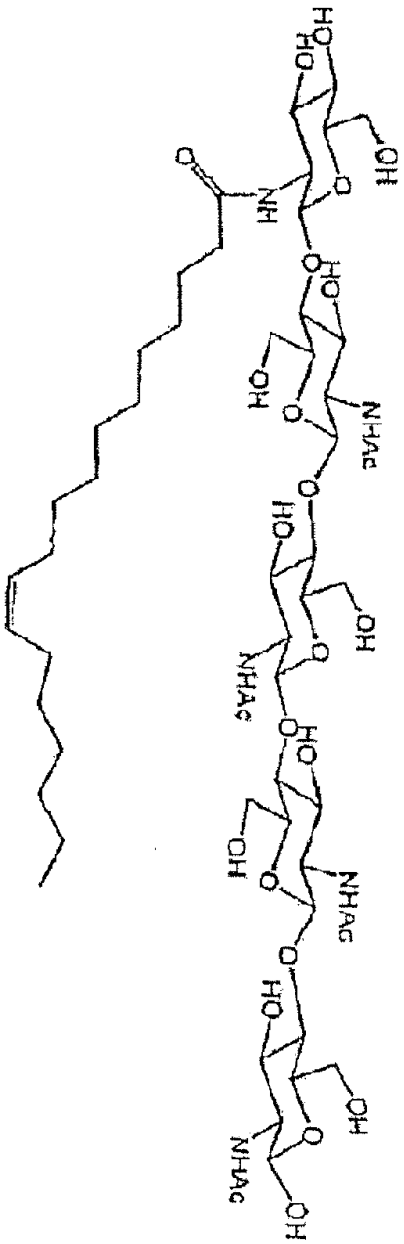


FIG. 2a

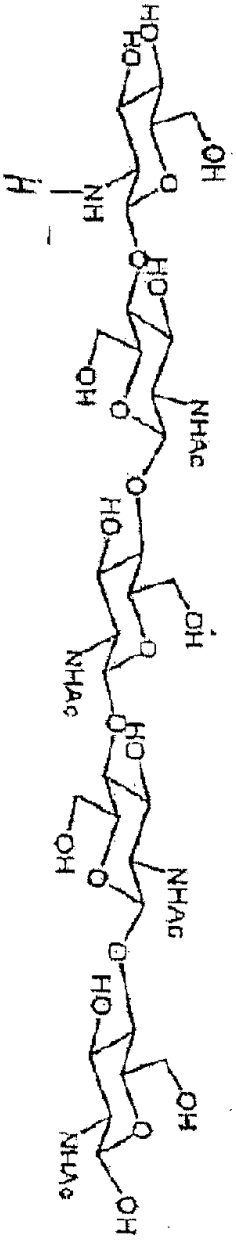


FIG. 2b

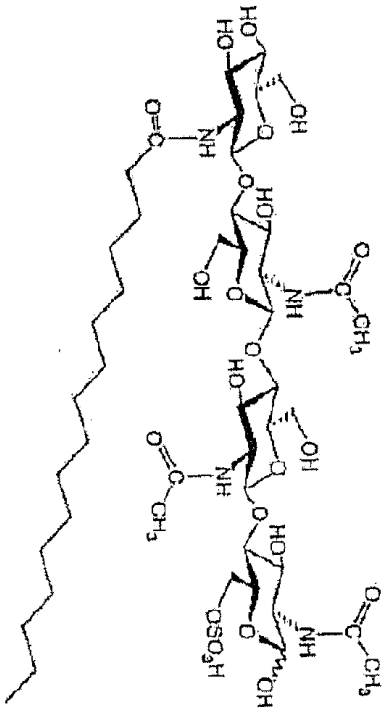


FIG. 3a

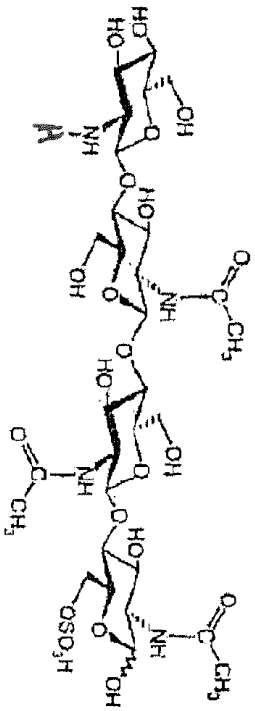


FIG. 3b

FIG. 4a

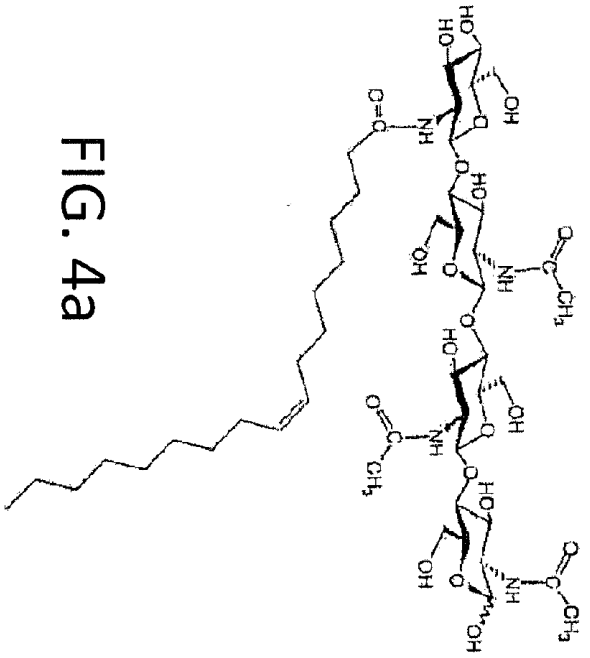
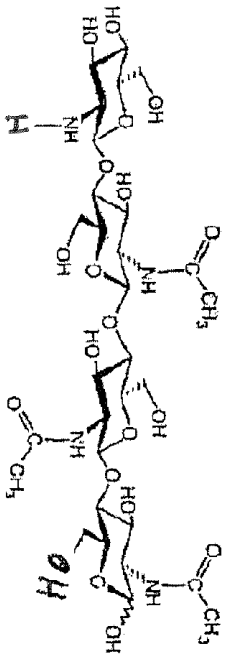


FIG. 4b



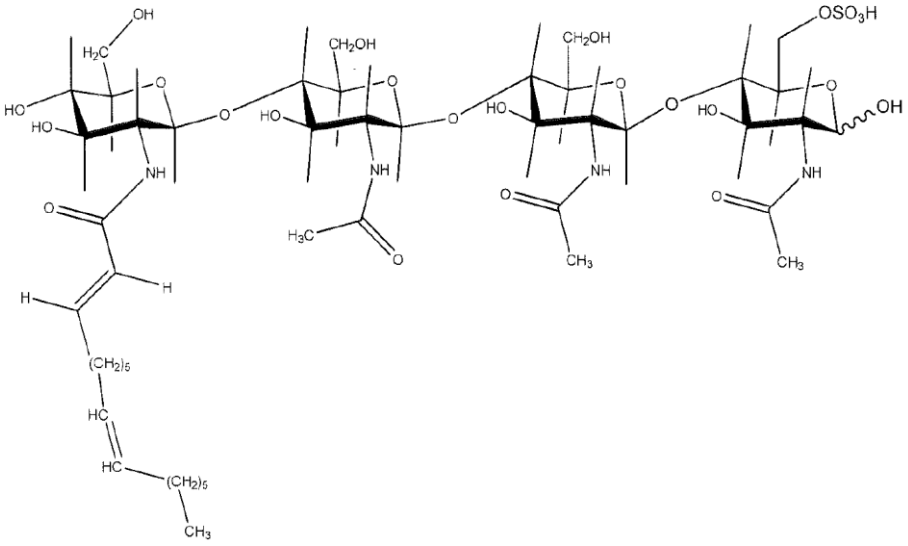

OH
H2C
HO
HO
O
NH
O
H
H
(CH2)5
HC
HC
(CH2)5
CH3
CH2OH
H3C
CH2OH
OSO3H
OH

FIG. 5

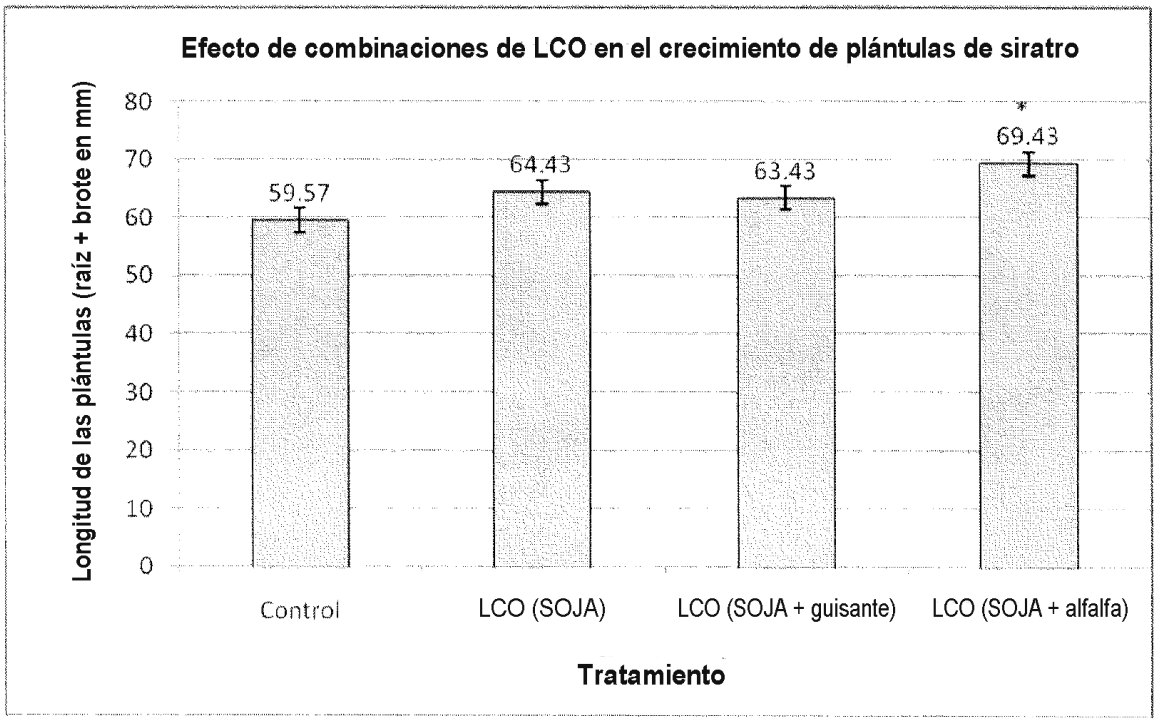

Efecto de combinaciones de LCO en el crecimiento de plántulas de siratro
Longitud de las plántulas (raíz + brote en mm)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
59.57
64.43
63.43
69.43
*
Control
LCO (SOJA)
LCO (SOJA + guisante)
LCO (SOJA + alfalfa)
Tratamiento

FIG. 6

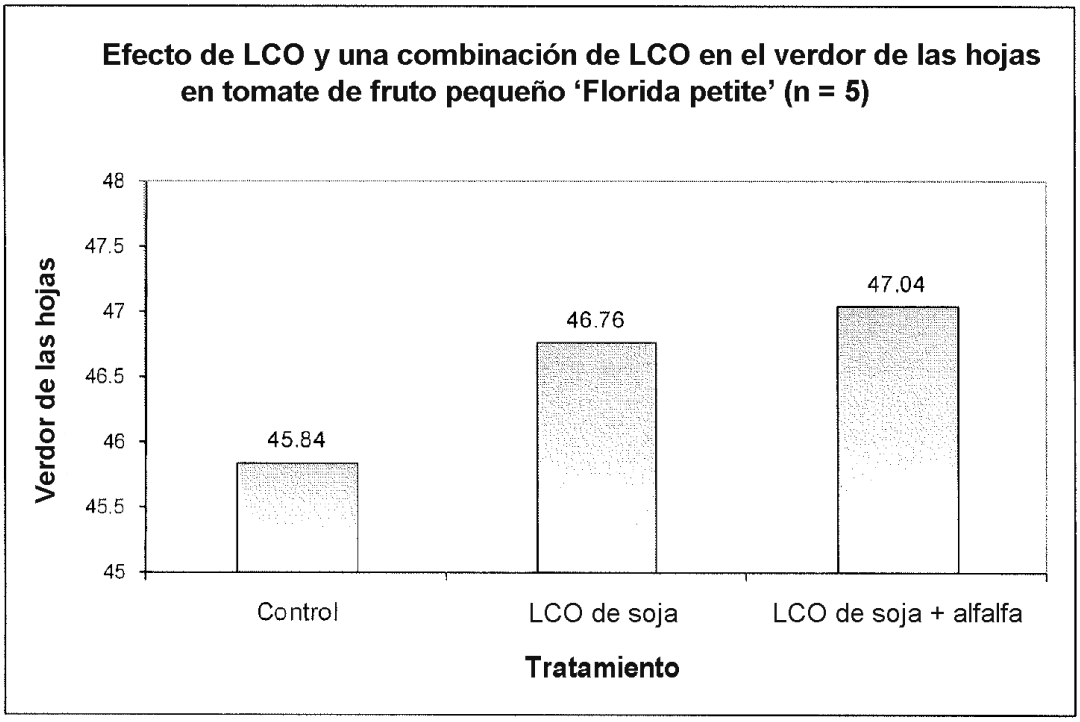


FIG. 7 (no según la invención)

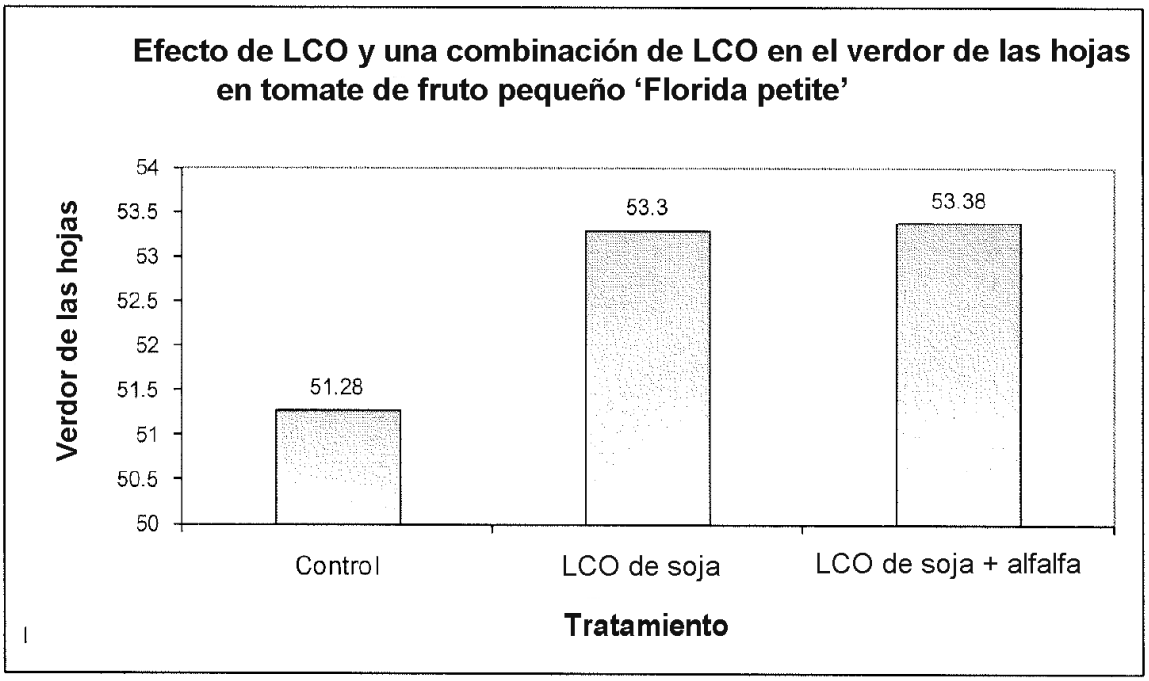


FIG. 8 (no según la invención)

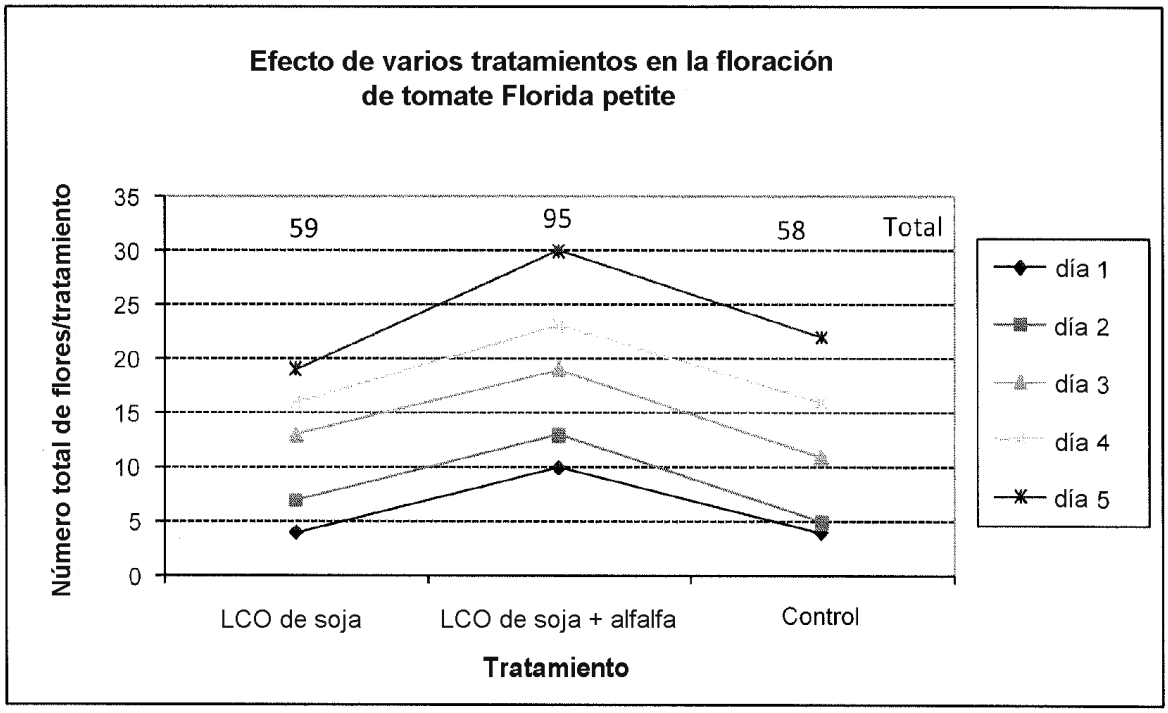


FIG. 9 (no según la invención)

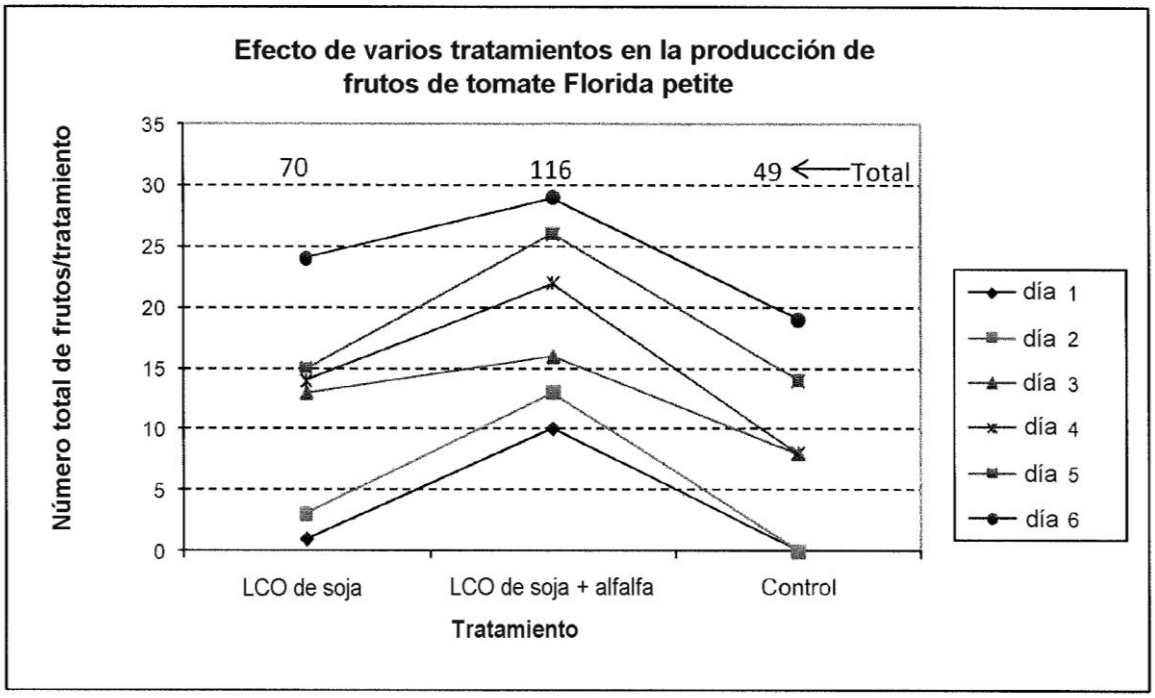


FIG. 10 (no según la invención)

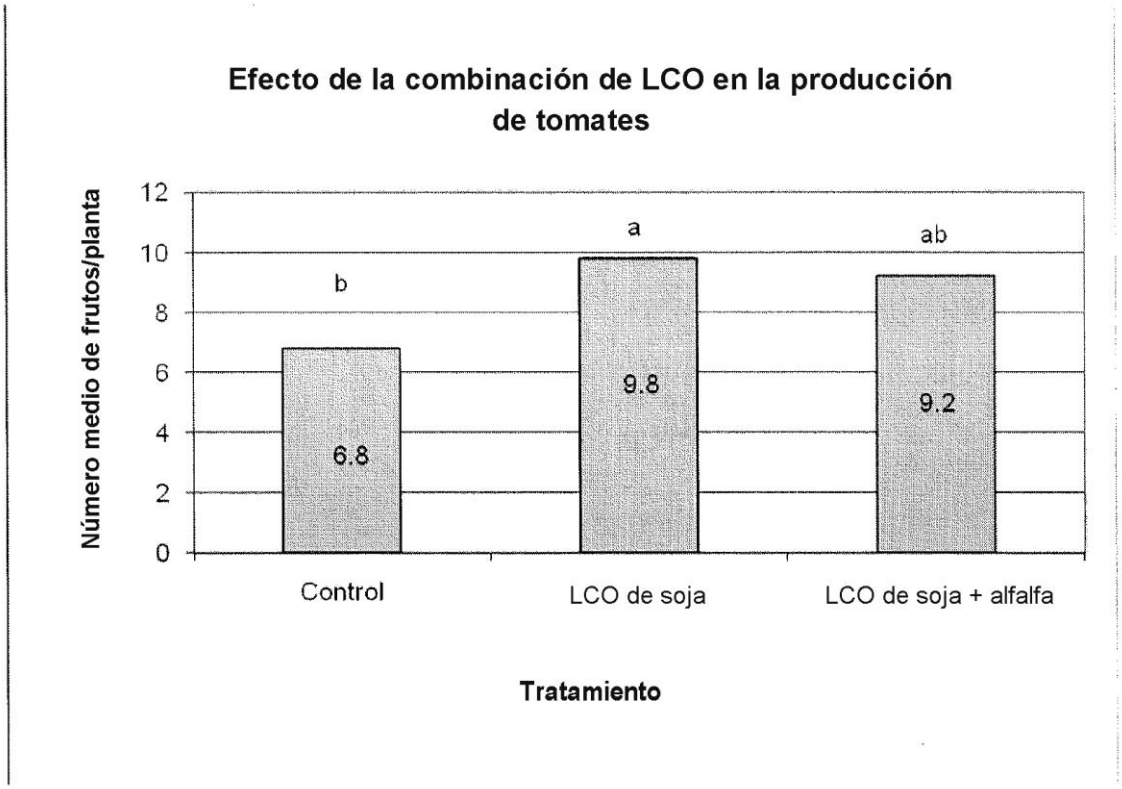


FIG. 11 (no según la invención)

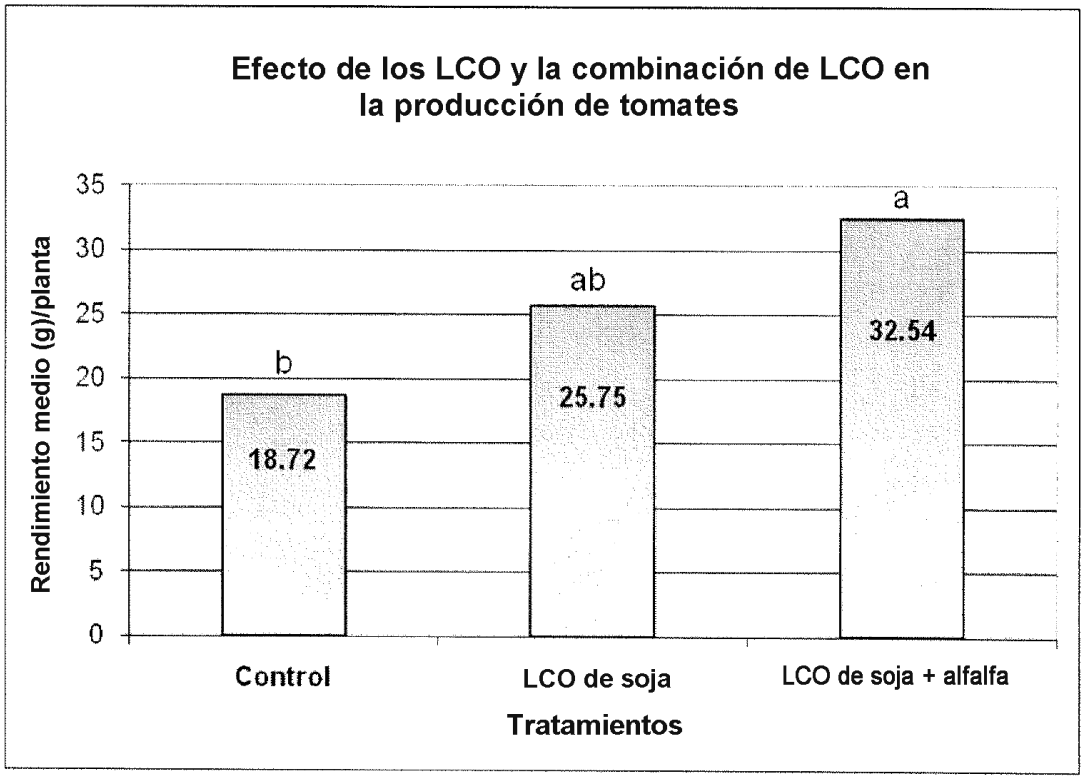


FIG. 12 (no según la invención)

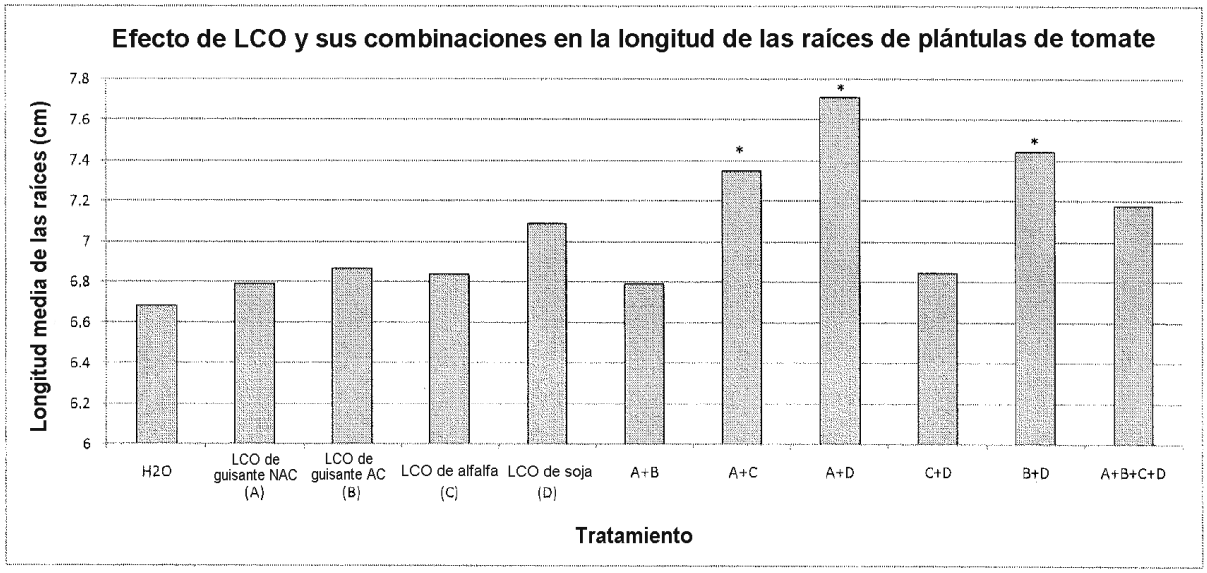

Efecto de LCO y sus combinaciones en la longitud de las raíces de plántulas de tomate
Longitud media de las raíces (cm)
7.8
7.6
7.4
7.2
7
6.8
6.6
6.4
6.2
6
H2O
LCO de guisante NAC (A)
LCO de guisante AC (B)
LCO de alfalfa (C)
LCO de soja (D)
A+B
A+C
A+D
C+D
B+D
A+B+C+D
*
Tratamiento

FIG. 13