

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

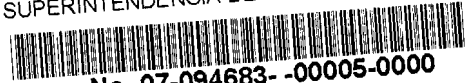
Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COM
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-094683- -00005-0000

Fecha: 2012-02-22 16:20:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 523 RESPUESTA Folios: 48

Re: PI.-ROHM AND HAAS COMPANY.-Solicitud de Patente de Invención en
Fase Nacional para "TRATAMIENTO DE CULTIVOS HORTÍCOLAS CON
UNA COMPOSICIÓN LÍQUIDA QUE COMPRENDE CICLOPROPENOS".
-Clase A01N 37/36.-Expediente número 07-094.683.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 1 de Diciembre de 2011.

2. Con el fin de responder a las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico bajo los acápites de claridad y novedad, atentamente me permito presentar los siguientes argumentos técnicos, así como las siguientes modificaciones en la solicitud de patente en cuestión, por medio de lo cual se superan completamente dichas objeciones.

3. **TÍTULO DE LA SOLICITUD**

En primer lugar, el señor Examinador ha objetado el título de la presente solicitud aduciendo lo siguiente:

"El título no corresponde con el objeto de la solicitud porque es muy general y se requiere que sea más específico de acuerdo con la materia reclamada, por lo cual se sugiere al solicitante hacer la corrección necesaria"

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido reemplazar el título actual:

"Tratamiento de cultivos hortícolas"

por el nuevo título:

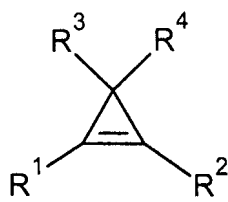
**"TRATAMIENTO DE CULTIVOS HORTÍCOLAS CON UNA COMPOSICIÓN
LÍQUIDA QUE COMPRENDE CICLOPROPENOS"**

El cual se ajusta plenamente al objeto de la solicitud de patente en cuestión y por lo tanto permite superar satisfactoriamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

4. **MODIFICACIONES EN EL CAPÍTULO REIVINDICATORIO DE LA SOLICITUD**

Adicionalmente a lo anterior, atentamente me permito señalar que el solicitante ha decidido realizar las siguientes modificaciones en el capítulo reivindicatorio de la invención:

- En la reivindicación 1 se ha especificado que las plantas de cultivos hortícolas que se tratan con el método allí revelado son plantas seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas (lo anterior de conformidad con la reivindicación 3 actualmente presentada), así como también se ha especificado que el ciclopropeno que hace parte de la composición líquida empleada en el método revelado es un compuesto que tiene la siguiente estructura:



Donde cada uno de R², R³ y R⁴ es hidrógeno y donde R¹ es un grupo alifático sustituido o no sustituido, lo anterior de conformidad con lo mencionado en, por ejemplo, las páginas 1 y 2 de la descripción.

- Como resultado de lo anterior, la reivindicación 3 actualmente presentada ha sido eliminada; y,
- Se ha adicionado una nueva reivindicación, la cual ha sido enumerada como reivindicación 8, es dependiente de la reivindicación 1 y se encuentra dirigida a especificar que la variable R¹ representa un grupo alquilo C₁-C₄, lo anterior de conformidad con, por ejemplo, lo mencionado en la página 7 de la descripción.

De lo anterior es claro que las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la presente invención no implican de manera alguna una ampliación en el alcance de la solicitud presentada originalmente, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000.

5. CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

De otro lado, el señor Examinador ha objetado la claridad del capítulo reivindicatorio con base en los siguientes argumentos:

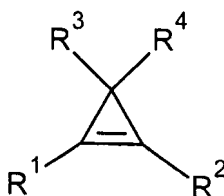
- ***"La reivindicación 1 menciona que el procedimiento es para tratar cultivos hortícolas, pero dichos cultivos no están sustentados en la descripción porque en los ejemplos y ensayos sólo se está tratando los productos agrícolas: tomate, pimentones, sandía y melones cantalope, mencionados en las reivindicaciones 3 y 4 pero que no constituyen una razonable generalización de los cultivos hortícolas. Puesto que fundamentalmente se está haciendo referencia a algunos de los productos agrícolas pertenecientes a las dos familias mencionadas en la Tabla 1 (reivindicación 3)"***

En respuesta a lo anterior inicialmente me permito señalar que el solicitante ha decidido especificar en la reivindicación 1 que las plantas de los cultivos hortícolas que pueden tratarse mediante el método allí revelado son plantas seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas.

Ahora bien, tal como lo menciona el señor Examinador en su Concepto Técnico, a lo largo de la descripción de la solicitud de patente en cuestión se divulgan ejemplos en los que se aplica el método de tratamiento revelado a dos diferentes especies por cada categoría de planta mencionada en la reivindicación 1, hecho que sustenta apropiadamente el alcance de dicha nueva reivindicación y por lo tanto permite superar la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"La reivindicación 1 menciona que la composición líquida comprende ciclopropanos, pero estos no están debidamente sustentados en la descripción, porque solo se está mencionando la efectividad del 1-MCP, el cual no es una razonable generalización de los ciclopropanos"***

Frente a éste particular y de conformidad con lo mencionado previamente en el numeral 3 del presente escrito, me permito señalar que el solicitante ha decidido restringir drásticamente el alcance de la reivindicación 1 al establecer que el ciclopropano que hace parte de la composición líquida empleada en el procedimiento revelado en dicha reivindicación presenta la siguiente estructura química:



Donde cada uno de R^2 , R^3 y R^4 es hidrógeno y donde R^1 es un grupo alifático sustituido o no sustituido.

- ***"En la reivindicación 1 se menciona un procedimiento pero este no se define en términos de una secuencia lógica de etapas y condiciones, sino sólo por una etapa convencional de aplicación del herbicida"***

En respuesta a lo anterior atentamente me permito manifestar ante ese Despacho que la reivindicación 1 de la solicitud en cuestión describe el procedimiento revelado por el solicitante de manera suficientemente clara para que la persona medianamente versada en la materia pueda ponerlo en práctica y obtener el resultado descrito.

En efecto, en dicha reivindicación se establece que un líquido que comprende un ciclopropeno con determinada estructura química general debe ponerse en contacto con una planta seleccionada del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas durante la etapa reproductiva de dicha planta, esto es, durante una época específica dentro del ciclo de crecimiento de dicha planta que es plenamente conocida por la persona medianamente versada en la materia técnica en cuestión y que es explicado en el artículo escrito por Anuradha Pujar y compañeros, titulado: *"Whole.plant growth stage ontology for angiosperms and its application in plant biology"* (Anexo III).

Visto lo anterior, atentamente solicito al señor Examinador la reconsideración de las objeciones realizadas a éste respecto.

- ***"Las reivindicaciones 1, 5-8 no son claras porque la expresión, "uno o más" precediendo una característica no es preciso, porque hace opcional a las características y no limita el alcance de la reivindicación"***

En respuesta a lo anterior me permito señalar ante ese Despacho que el solicitante ha decidido realizar las siguientes modificaciones: reemplazar la frase 'uno o mas ciclopropenos' por la frase 'un ciclopropeno', reemplazar la frase 'uno o más de dichos pasos...' por la frase 'dicho paso...' y reemplazar la frase 'una o más veces durante...' por la frase 'una vez durante...', con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

Con base en lo anterior, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión cumple a cabalidad con las disposiciones de

patentabilidad establecidas en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y encuentra pleno sustento en la descripción.

6. CLARIDAD DE LA DESCRIPCIÓN

Así mismo, el señor Examinador ha objetado la claridad de la descripción aduciendo lo siguiente:

"En el capítulo descriptivo se presentan algunas inconsistencias respecto a los símbolos aceptados por el sistema internacional de unidades, puesto que el símbolo correcto para hectárea es ha, sin tilde alguna (folio 27, 30-31, 33, 36-37, 41) y el símbolo para tonelada métrica es Tm (folio 37-37). Se sugiere realizar dichas correcciones"

Atendiendo a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido realizar a lo largo de toda la descripción de la invención las siguientes modificaciones:

- i. Reemplazar el término Há por Ha; y,
- ii. Reemplazar el término mT por el término correcto Tm

Visto lo anterior, me permito manifestar ante ese Despacho que la descripción de la solicitud de patente en cuestión, tal y como ha sido modificada, cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 28 de la Decisión 486 de 2000.

7. ANÁLISIS DE LA NOVEDAD DE LA SOLICITUD

Finalmente, de acuerdo con el señor Examinador el capítulo reivindicatorio de la presente invención carece de novedad frente a las enseñanzas de los siguientes documentos:

(D1) → EP 1 680 960

(D2) → EP 1 609 359

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que las características esenciales de la composición definida en la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en los documentos D1 y D2 porque:

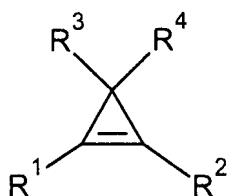
"D1 enseña un método para el tratamiento de una planta que comprende poner en contacto dicha planta con al menos una composición (i) que comprende al menos un ciclopropeno y poner éste con una composición (ii) que comprende al menos un regulador de crecimiento vegetal que no es un ciclopropeno, para

plantas no cítricas (página 12, renglones 30-32), además se proporciona una composición líquida adecuada para el tratamiento de las plantas (página 2, renglones 15-29).

Además D2 de forma independiente da a conocer un método de tratamiento de plantas o partes de plantas que comprende la etapa de poner en contacto con dichas plantas o partes de plantas con al menos una composición que comprende un compuesto doble enlace aducto al ciclopropeno (página 7 renglones 19-23; página 8, página 10, renglones 15-16)"

En vista de lo anterior y con el ánimo de demostrar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión es nuevo frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2, atentamente me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

- (a) La solicitud de patente en cuestión se encuentra dirigida a proteger Un procedimiento para tratar plantas de cultivos hortícolas, donde dichas plantas son seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas, comprendiendo el paso de poner en contacto a esas plantas una o más veces con una composición líquida, en donde dicha composición líquida comprende un ciclopropeno, en donde dicho contacto se efectúa durante una etapa reproductiva de esas plantas, y en donde dicho ciclopropeno es un compuesto que tiene la estructura:

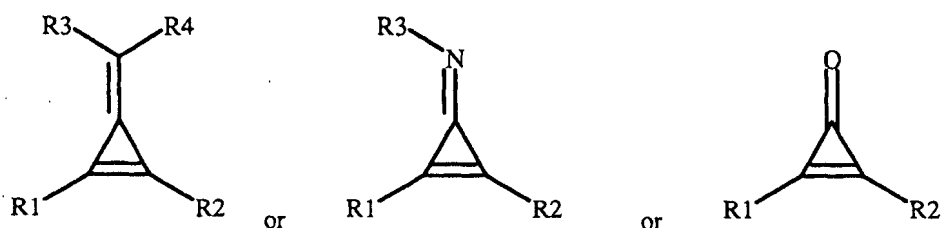


Donde cada uno de R², R³ y R⁴ es hidrógeno y donde R¹ es un grupo alifático sustituido o no sustituido.

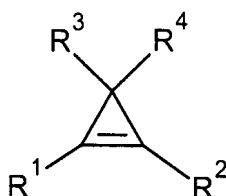
- (b) Ahora bien, en el documento D1 se divulga un método para el tratamiento de plantas no cítricas que incluye poner en contacto dicha planta con una composición que comprende al menos un compuesto ciclopropeno y con una composición que comprende al menos un regulador de crecimiento de planta diferente a ciclopropeno. Así mismo, dicha anterioridad divulga una composición líquida adecuada para el tratamiento de plantas que comprende al menos un ciclopropeno, al menos un regulador de crecimiento de planta diferente a ciclopropeno y uno o más ingredientes adicionales seleccionados del grupo conformado por agentes acomplejantes de metal, surfactantes, hidrocarburos de petróleo y alcoholes.

Sin embargo, a partir de la atenta lectura del documento D1 es claro que en dicha anterioridad no se enseña un procedimiento para tratar plantas de cultivos hortícolas seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas, razón por la cual es claro que la solicitud de patente en cuestión, tal y como ha sido modificada, presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas de D1.

- (c) Por su parte, el documento D2 divulga un método para el tratamiento de plantas o partes de plantas que comprende el paso de poner en contacto dichas plantas o partes de plantas con al menos una composición que comprende un compuesto ciclopropeno en el cual un átomo de un grupo químico está enlazado al carbono 3 del compuesto ciclopropeno mediante un doble enlace, tal y como ocurre en los siguientes casos (ver páginas 2 y 3 de dicha anterioridad):



Sin embargo, contrario a lo anterior, es claro que en el procedimiento revelado en la solicitud de patente en cuestión se emplea un compuesto ciclopropeno que tiene la siguiente estructura química general:



Donde cada uno de R^2 , R^3 y R^4 es hidrógeno y donde R^1 es un grupo alifático sustituido o no sustituido.

De lo anterior es evidente que el carbono 3 del ciclopropeno empleado en la presente invención está enlazado a dos átomos de hidrógeno (grupos R^3 y R^4) y por lo tanto dicho átomo de carbono 3 de ninguna manera puede estar enlazado mediante un doble enlace a algún grupo químico.

Visto lo anterior, es claro que el procedimiento revelado en la solicitud de patente en cuestión también presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas del documento D2.

Visto lo anterior, atentamente me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter

novedoso frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 16 de la Decisión 486 de 2000.

8. CONCLUSIÓN

De conformidad con lo mencionado en el presente memorial, me permito manifestar que el capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión, tal como ha sido modificado, es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

Así mismo, es claro que el procedimiento para tratar plantas de cultivos hortícolas revelado en el nuevo capítulo reivindicatorio de la presente invención es novedoso frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2, toda vez que es claro que un procedimiento para el tratamiento de plantas seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas con una composición líquida que comprende un ciclopropeno con la estructura química general establecida en la reivindicación 1 de la solicitud en cuestión, no era conocido en el estado de la técnica anterior, incluyendo los documentos D1 y D2 señalados por ese Despacho.

Por lo tanto, en vista de las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud, y teniendo en cuenta los argumentos técnicos presentados para demostrar el inequívoco carácter novedoso de la invención en cuestión, resulta completamente claro que se han superado las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico, y por lo tanto, dicha invención es merecedora del privilegio de patente solicitado.

9. Anexo al presente memorial me permito presentar:

- Copia de la nueva descripción de la solicitud, la cual reemplaza al documento actualmente presentado y en la que se han realizado las modificaciones previamente mencionadas;
- Copia del nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud, el cual reemplaza al documento actualmente presentado y en el que se han realizado las modificaciones previamente mencionadas; y,
- Copia del artículo: A. Pujar et al., Whole-plant growth stage ontology for angiosperms and its application in plant biology, *Plant Physiology*, October 2006, Vol. 142, pp. 414-428.

JOSÉ LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

10. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y argumentaciones presentadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

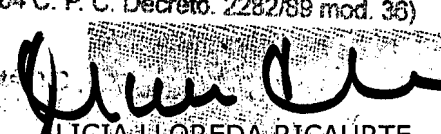


ALICIA LLORED A RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con: CC 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53713 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 36)


ALICIA LLORED A RICAURTE
C.C.F No 39.690.713 de Usaquén

14 FEB. 2012



**TRATAMIENTO DE CULTIVOS HORTÍCOLAS CON UNA COMPOSICIÓN
LÍQUIDA QUE COMPRENDE CICLOPROPENOS**

RESUMEN -OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

En un aspecto de la presente invención, se provee un procedimiento para tratar plantas hortícolas que comprenden el paso de poner en contacto a esas plantas, una o más veces, con una composición líquida, en que esa composición líquida comprende uno o más ciclopropenosy, en que ese contacto se efectúa durante una etapa reproductiva de esas plantas.



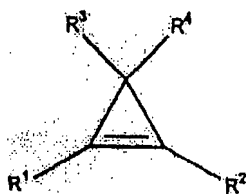
TRATAMIENTO DE CULTIVOS HORTÍCOLAS CON UNA COMPOSICIÓN LÍQUIDA QUE COMPRENDE CICLOPROPENOS MEMORIA DESCRIPTIVA

Las plantas de cultivo se tratan, a menudo, poniéndolas en contacto con composiciones. Un posible beneficio de tal tratamiento es el mejoramiento del rendimiento del cultivo. Por ejemplo, la Publicación de la Patente de los EE. UU. N° 2006/0160704 describe tratar a plantas no-cítricas con composiciones que contienen al menos un ciclopropeno y al menos un regulador de crecimiento vegetal que no es ciclopropeno. Se desea proveer procedimientos que incluyan el tratamiento de ciertas plantas específicas de cultivo, con composiciones líquidas, en etapas de desarrollo adecuadas para esas plantas específicas.

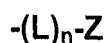
En un aspecto de la presente invención, se provee un procedimiento para tratar plantas hortícolas que comprende el paso de poner en contacto a esas plantas, una o más veces, con una composición líquida, en que esa composición líquida comprende uno o más ciclopropenos y, en que ese contacto se efectúa durante una etapa reproductiva de esas plantas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La práctica de la presente invención incluye el uso de uno o más ciclopropenos. Como se usa aquí, "un ciclopropeno" es cualquier compuesto con la fórmula:



en que cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H y un grupo químico de fórmula:



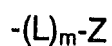
en que n es un entero desde 0 hasta 12. Cada L es un radical bivalente. Los grupos L adecuados incluyen, por ejemplo, a radicales conteniendo uno o más átomos seleccionados de H, B, C, N, O, P, S, Si o mezclas de los mismos. Los átomos dentro de un grupo L pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles, triples o mezclas de los mismos. Cada grupo L puede ser lineal, ramificado, cíclico o una combinación de los mismos. En cualquier grupo R (es decir, cualquiera de R^1 , R^2 , R^3 y R^4) el número total de heteroátomos (es decir, átomos que no son H ni C) varía desde 0 a 6. Independientemente, en cualquier grupo R el número total de átomos no-hidrógeno es 50 o menos. Cada Z es un radical monovalente. Cada Z se selecciona independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, ciano, nitro, nitroso, azido, clorato, bromato, yodato, isocianato, isocianido, isotiocianato, pentafluorotío y un grupo químico G , en que G es un sistema de anillos de 3 a 14 miembros.

Los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de grupos adecuados. Los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 pueden ser idénticos entre sí o, cualquier número de ellos puede ser distinto de los otros. Entre los grupos que son adecuados para usar como uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 están, por ejemplo, grupos alifáticos, grupos alifáticos-oxi, grupos alquifosfato, grupos cicloalifáticos, grupos cicloalquilsulfonil, grupos cicloalquilamino, grupos heterocíclicos, grupos aril, grupos heteroaril, halógenos, grupos silil, otros grupos y mezclas y combinaciones de los mismos. Los grupos que son adecuados para usar como uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 pueden estar sustituidos o no-sustituidos. Independientemente, los grupos que son adecuados para usar como uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 pueden conectarse directamente con el anillo de ciclopropeno o pueden estar conectados con el anillo de ciclopropeno, a través de un grupo interventor tal como, por ejemplo, un grupo conteniendo un heteroátomo.



Entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos alifáticos. Algunos grupos alifáticos adecuados incluyen, por ejemplo, a grupos alquil, alquenil y alquínil. Los grupos alifáticos adecuados pueden ser lineares, ramificados, cíclicos o una combinación de los mismos. Independientemente, los grupos alifáticos adecuados pueden estar sustituidos o no-sustituidos.

Como se usa aquí, se dice que un grupo químico de interés está "sustituido" si uno o más de sus átomos de hidrógeno están reemplazados por un sustituyente. Se contempla que tales grupos sustituidos puedan prepararse por cualquier procedimiento incluyendo, pero sin que sea limitación, preparar la forma no-sustituida del grupo químico de interés y efectuando luego la sustitución. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, alquil, alquenil, acetilamino, alcoxi, alcoxialcoxi, alcóxicarbonil, alcoxilimino, carboxi, halógeno, haloalcoxi, hidroxi, alquilsulfonil, alquiltío, trialquilsilil, dialquilamino y combinaciones de los mismos. Un sustituyente adicional, adecuado, que sí está presente puede estar solo o en combinación con otro sustituyente adecuado es:



en que m es 0 hasta 8 y en que L y Z se definieron. Si está presente más de un sustituyente en un grupo simple de interés, cada sustituyente puede reemplazar a un átomo de hidrógeno diferente o, un sustituyente puede estar unido a otro sustituyente, el que a su vez está unido al grupo químico de interés o, una combinación de los mismos.

Entre los grupos adecuados R^1 , R^2 , R^3 y R^4 están, por ejemplo, los grupos oxi-alifáticos sustituidos o no-sustituidos tales como, por ejemplo, alquenoxi, alquinoxí y alcóxicarboniloxi.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos alquilfosfonato sustituidos o no-sustituidos,



alquilfosfato sustituidos o no-sustituidos, los grupos alquilamino sustituidos o no-sustituidos, los grupos alquilsulfonil sustituidos o no-sustituidos, los grupos alquilcarbonil sustituidos o no-sustituidos y los grupos alquilaminosulfonil sustituidos o no-sustituidos incluyendo, por ejemplo, a los grupos alquilfosfonato, dialquilfosfato, dialquiltiofosfato, dialquilamino, alquilcarbonil y dialquilaminosulfonil.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos cicloalquilsulfonil sustituidos o no-sustituidos y los grupos cicloalquilamino tales como, por ejemplo, diciticloalquilaminosulfonil y diciticloalquilamino.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos heterociclicil sustituidos o no-sustituidos (es decir, grupos cíclicos, aromáticos o no-aromáticos, con al menos un heteroátomo en el anillo).

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos heterociclicil sustituidos o no-sustituidos que están conectados al compuesto ciclopropeno a través de un grupo interventor oxi, amino, carbonil o sulfonil; los ejemplos de tales grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son heterocicliciloxi, heterociclicilcarbonil, diheterociclicilamino y diheterociclicilaminosulfonil.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos aril sustituidos o no-sustituidos. Los sustituyentes adecuados son aquellos descritos anteriormente. En algunas modalidades, se usa uno o más grupos aril sustituidos, en los cuales al menos un sustituyente es uno o más de alquenil, alquil, alquinil, acetilamino, alcoxialcoxi, alcoxi, alcoxicarbonil, carbonil, según la Reivindicación alquiloxi, carboxi, arilamino, haloalcoxi, halógeno, hidroxil, trialquilsilil, dialquilamino, alquilsulfonil, sulfonilalquil, alquiltío, tioalquil, arilaminosulfonil y haloalquiltío.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos heterocíclicos sustituidos o no-sustituidos, que están



con el compuesto ciclopropeno a través de un grupo interventor oxi, amino, carbonil, sulfonil, tioalquil o aminosulfonil; los ejemplos de tales grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son diheteroarilamino, heteroariltioalquil y diheteroarilaminosulfonil.

También entre los grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados están, por ejemplo, los grupos hidrógeno, flúor, cloro, bromo, yodo, ciano, nitro, nitroso, azido, clorato, bromato, yodato, isocianato, isocianido, isotiocianato, pentafluorotío, acetoxi, carboetoxi, cianato, nitrato, nitrito, perclorato, alenil, butilmercapto, dietilfosfonato, dimetilfenilsilil, isoquinolil, mercapto, naftil, fenoxi, fenil, piperidino, piridil, quinolil, trietilsilil, trimetilsilil y los análogos sustituidos de los mismos.

Como se usa aquí, el grupo químico G es un sistema de anillos de 3 a 14 miembros. Los sistemas de anillo adecuados como grupo químico G pueden estar sustituidos o no-sustituidos; pueden ser aromáticos (incluyendo por ejemplo, fenil y naftil) o alifáticos (incluyendo grupos alifáticos insaturados, alifáticos parcialmente saturados o alifáticos saturados); y pueden ser carbocíclicos o heterocíclicos. Entre los grupos G heterocíclicos, algunos heteroátomos adecuados son, por ejemplo, nitrógeno, azufre, oxígeno y sus combinaciones. Los sistemas de anillo adecuados como grupo químico G pueden ser monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, policíclicos, espiro o fundidos; entre los sistemas de anillo adecuados para el grupo químico G que son bicíclicos, tricíclicos o fundidos, los varios anillos en un grupo químico G simple pueden ser del mismo tipo o de dos o más tipos (por ejemplo, un anillo aromático puede estar fundido con un anillo alifático).

En algunas modalidades, G es un sistema de anillos que contiene anillos de 3 miembros, saturados o insaturados tal como, por ejemplo, un anillo ciclopropano, ciclopropeno, epóxido o aziridino, sustituidos o no-sustituidos.

En algunas modalidades, G es un sistema de anillos que contiene a un anillo heterocíclico de 4 miembros; en algunas de esas modalidades, G es un sistema de anillos que contiene a un anillo heterocíclico con 5 o más miembros; en



algunas de tales modalidades, el anillo heterocíclico contiene 1 a 4 heteroátomos. Independientemente, en algunas modalidades, el anillo en G es no-sustituido; en otras modalidades, el sistema de anillos contiene 1 a 5 sustituyentes; en algunas de las modalidades en que G contiene sustituyentes, cada sustituyente se selecciona independientemente de los sustituyentes ya descritos. También son adecuadas las modalidades en las cuales G es un sistema de anillos carbocíclico.

En algunas modalidades, cada G es un grupo fenil, piridil, ciclohexil, ciclopentil, propil, furil, tiofenil, triazolil, pirazolil, 1,3-dioxanil o morfolinil sustituidos o no-sustituidos. Entre esas modalidades se incluyen aquellas, por ejemplo, en las cuales G es un grupo fenil, ciclopentil, cicloheptil o ciclohexil, sustituidos o no-sustituidos. En algunas de esas modalidades, G es un grupo ciclopentil, cicloheptil, ciclohexil, fenil o fenil sustituido. Entre las modalidades en las cuales G es fenil sustituido, están aquellas por ejemplo, en que hay 1, 2 o 3 sustituyentes. Independientemente, también entre las modalidades en las cuales G es fenil sustituido están aquellas, por ejemplo, en las cuales los sustituyentes se seleccionan independientemente de metil, metoxi y halógeno.

También se contempla modalidades en las cuales R^3 y R^4 están combinados en un grupo simple, que está unido al átomo de carbono número 3 del anillo de ciclopropeno por un enlace doble. Algunos de tales compuestos se describen en la Publicación de Patente de los EE. UU. N° 2005/0288189.

En algunas modalidades, sólido usan uno o más ciclopropenos, en los cuales uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 es hidrógeno. En algunas modalidades, R^1 y R^2 o ambos, son hidrógeno. En algunas modalidades, R^3 y R^4 o ambos son hidrógeno. En algunas modalidades, R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno.

En algunas modalidades, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son una estructura que no tiene un enlace doble. Independientemente, en algunas modalidades, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son una estructura que no tiene un



enlace triple. Independientemente, en algunas modalidades, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son una estructura que carece de un sustituyente halógeno. Independientemente, en algunas modalidades, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son una estructura que carece de un sustituyente iónico.

En algunas modalidades, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno o alquil C_{1-10} . En algunas modalidades, cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno o alquil C_{1-8} . En algunas modalidades, cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno o alquil C_{1-4} . En algunas modalidades, cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno o metil. En algunas modalidades, R^1 es alquil C_{1-4} y cada uno de R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno. En algunas modalidades, R^1 es metil y cada uno de R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno y el ciclopropeno se conoce aquí como "1-MCP".

En algunas modalidades, se usa un ciclopropeno que tiene un punto de ebullición, a una atmósfera de presión, de 50°C o menor; o 25°C o menor; o 15°C o menor. Independientemente, en algunas modalidades, se usa un ciclopropeno que tiene un punto de ebullición, a una atmósfera de presión, de -100°C o más alto; de -50°C o más alto; o de -25°C o más alto; o de 0°C o más alto.

Los ciclopropenos adecuados para usar en esta invención pueden prepararse por cualquier método. Algunos métodos adecuados de preparación de ciclopropenos son los procedimientos descritos en las Patentes de los EE. UU. N^{os} 5.518.988 y 6.017.849.

En algunas modalidades, una o más composiciones de la presente invención incluyen al menos un reactivo acomplejador iónico. Un reactivo acomplejador iónico interactúa con un ciclopropeno para formar un complejo que es estable en agua. Algunos reactivos acomplejadores iónicos adecuados incluyen, por ejemplo, al ion litio. En algunas modalidades, no se usa reactivo acomplejador iónico.



En algunas modalidades, ninguna composición de la presente invención incluye un agente encapsulador molecular. En otras modalidades, una o más composiciones de la presente invención incluyen a al menos un agente encapsulador molecular.

Cuando se usa un agente encapsulador molecular, los agentes adecuados incluyen, por ejemplo, agentes encapsuladores moleculares orgánicos o inorgánicos. Los orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, ciclodextrinas sustituidas, ciclodextrinas no-sustituidas y éteres coronados. Los agentes encapsuladores moleculares inorgánicos incluyen, por ejemplo, zeolitas. También son adecuadas las mezclas de agentes encapsuladores moleculares. En algunas modalidades de la presente invención, el agente encapsulador molecular es alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, gamma-ciclodextrina o mezclas de las mismas. En algunas modalidades de la invención, particularmente cuando el ciclopropeno o 1-metilciclopropeno, el agente encapsulador es alfa-ciclodextrina. El agente encapsulador preferido variará, dependiendo de la estructura del ciclopropeno o ciclopropenos usados. Cualquier ciclodextrina o mezcla de ciclodextrinas también pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Algunas ciclo-dextrinas están disponibles, por ejemplo, en Wacker Biochem, Inc., Adrian, MI o Cerestar U.S.A, Hammond, IN, así como en otros suministradores.

En algunas modalidades, en las cuales está presente un agente encapsulador molecular, al menos uno de ellos encapsula a uno o más ciclopropenos. Una molécula de ciclopropeno o de ciclopropeno sustituido, encapsulado especialmente una molécula de agente encapsulador molecular se conoce aquí como "complejo de agente encapsulador molecular de ciclopropeno". El complejo de agente encapsulador molecular de ciclopropeno puede prepararse por cualquier medio. En un método de preparación, por ejemplo, tales complejos se preparan poniendo en contacto al ciclopropeno con una solución o suspensión del



agente encapsulador molecular y luego aislando el complejo usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en la Patente de los EE. UU. N° 6.017.849. Por ejemplo, en un procedimiento para prepararlos, en el cual se encapsula 1-MCP en un agente encapsulador, se hace burbujear gas de 1-MCP a través de una solución de alfa-ciclodextrina en agua, desde la cual el complejo precipita primero y luego se aísla por filtración. En algunas modalidades, los complejos se preparan por el procedimiento anterior y, después de la aislación, se secan y almacenan en forma sólida, por ejemplo, como polvo para agregarlos después a composiciones útiles.

En algunas modalidades, uno o más agentes encapsuladores moleculares y uno o más ciclopropanos están presentes en una composición; en algunas de tales modalidades, la cantidad de agente encapsulador molecular puede caracterizarse útilmente por la relación entre moles del agente encapsulador molecular a los moles de ciclopropano. En algunas modalidades, esta relación de moles varía desde 0,1 o mayor o 0,2 o mayor o 0,5 o mayor o 0,9 o mayor. Independientemente, en algunas de esas modalidades la relación es 2 o menor; o 1,5 o menor.

En algunas modalidades, la composición de la presente invención carece de un agente de abscisión.

La práctica de la presente invención incluye una o más composiciones líquidas. Las composiciones líquidas son líquidas a 25°C. En algunas modalidades, las composiciones líquidas son líquidas a la temperatura a la que se usa la composición para tratar a las plantas. Debido a que las plantas se tratan, a menudo, fuera de edificios, las plantas pueden tratarse a temperaturas que varían desde 1°C hasta 45°C; las composiciones líquidas adecuadas no necesitan ser líquidas en todo este rango de temperaturas, pero las adecuadas son líquidas a al menos algunas temperaturas desde 1°C hasta 45°C.



Sí una composición líquida contiene más de una sustancia, esa composición líquida puede ser una solución o dispersión o combinación de las mismas. Sí en la composición líquida, una sustancia está dispersada en otra sustancia en forma de dispersión, la dispersión puede ser de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, una suspensión, un látex, una emulsión, una mini-emulsión, una micro-emulsión o cualquier combinación de las mismas.

La cantidad de ciclopropeno en la composición puede variar ampliamente, dependiendo del tipo de composición y del método que se intenta usar. En algunas modalidades, la cantidad de ciclopropeno, basada en el peso total de la composición, es 4%, en peso o menor; o 1%, en peso o menor; o 0,5% , en peso o menor; o 0,5%, en peso o menor. Independientemente, en algunas modalidades, la cantidad de ciclopropeno, basada en el peso total de la composición, es 0,000.001%, en peso o mayor; o 0,000.01%, en peso o mayor; o 0,000.1%, en peso o mayor; o 0,001%, en peso o mayor.

Entre las modalidades de la presente invención que usan una composición de la presente invención que contiene agua, la cantidad de ciclopropeno puede caracterizarse como partes por millón (es decir, partes, en peso, de ciclopropeno por 1 millón de partes de agua en la composición, "ppm") o como partes por billón (es decir, partes en peso, de ciclopropeno por 1.000 millones de partes de agua en la composición, "ppb"). En algunas modalidades, la cantidad de ciclopropeno es 1 ppb o mayor; o 10 ppb o mayor; o 100 ppb o mayor. Independientemente, en algunas modalidades, la cantidad de ciclopropeno es 10.000 ppm o menor; o 1.000 ppm o menor.

En algunas modalidades, se usa una composición líquida de la presente invención, en la cual algo o todo el ciclopropeno está encapsulado en uno o más agentes encapsuladores.



En algunas modalidades, ninguna composición de la presente invención incluye agentes acomplejadores metálicos. En algunas modalidades, una o más de las composiciones de la presente invención incluye uno o más agentes acomplejadores metálicos.

Puede incluirse uno o más agentes acomplejadores metálicos en una o más composiciones líquidas. Un agente acomplejador metálico es un compuesto capaz de formar enlaces coordinados con átomos metálicos. Algunos agentes acomplejadores metálicos son agentes queladores. Como se usa aquí, un "agente quelador" es un compuesto en que cada una de sus moléculas es capaz de formar dos o más enlaces coordinados con un simple átomo de metal. Algunos agentes acomplejadores metálicos forman enlaces coordinados con átomos metálicos porque el agente acomplejador contiene átomos donantes de electrones que participan en los enlaces coordinados con los átomos metálicos. Los agentes queladores adecuados incluyen, por ejemplo, agentes queladores orgánicos e inorgánicos. Entre los agentes queladores inorgánicos están, por ejemplo, los fosfatos tales como pirofosfato de tetrasodio, tripolifosfato de sodio y ácido hexametáfosfórico. Entre los agentes queladores orgánicos adecuados están aquellos con estructuras macrocíclicas y no macrocíclicas. Entre los agentes queladores orgánicos adecuados están, por ejemplo, los compuestos de porfina, poliéteres cíclicos (también llamados éteres coronados) y compuestos macrocíclicos con ambos, átomos de nitrógeno y oxígeno.

Algunos agentes queladores orgánicos adecuados que tienen estructuras no macrocíclicas son, por ejemplo, los ácidos amino-carboxílicos, 1,3-diquetonas, ácidos hidroxí-carboxílicos, poliaminas, amino-alcoholes, bases heterocíclicas aromáticas, fenol, aminofenoles, oximas, bases de Shiff, compuestos de azufre y mezclas de los mismos. En algunas modalidades, el agente quelador incluye a uno o más ácidos amino-carboxílicos, uno o más



carboxílicos, una o más oximas o mezclas de los mismos. Algunos ácidos amino-carboxílicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), ácido hidroxietil etilendiamino triacético (HEDTA), ácido nitrilo triacético (NTA), N-dihidroxietil glicina (2-HxG), etilenbis(hidroxifenilglicina) (EHPG) y mezclas de los mismos. Algunos ácidos hidroxi-carboxílicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido 5-sulfosalicílico y mezclas de los mismos. Algunas oximas adecuadas incluyen, por ejemplo, dimetilglioxima, salicilaldoxima y mezclas de las mismas. En algunas modalidades, se usa EDTA.

Algunos agentes queladores adecuados, adicionales, son poliméricos. Entre estos, se incluyen, por ejemplo, a las polietileniminas, polimetacrilóilacetonas, ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico.

Algunos agentes acomplejadores metálicos adecuados, que no son agentes queladores son, por ejemplo, carbonatos alcalinos tales como el carbonato de sodio.

Los agentes acomplejadores metálicos pueden estar presentes en forma neutra o en forma de una o más sales. Las mezclas de agentes acomplejadores metálicos, también son adecuadas.

En algunas modalidades de la presente invención, ninguna composición contiene agua. En otras modalidades, la composición de la presente invención contiene agua.

Independientemente, en algunas modalidades en las cuales se usa una composición líquida que incluye agua y que contiene a uno o más agentes acomplejadores metálicos, la cantidad de agentes acomplejadores metálicos puede caracterizarse útilmente por la concentración molar del agente acomplejador metálico en la composición líquida (es decir, moles del agente acomplejador metálico por litro de la composición líquida). En tales composiciones líquidas, la concentración del



agente acomplejador metálico es 0,000.01 mM (es decir, mili-molar) o mayor; o 0,000.1 mM o mayor; o 0,001 mM o mayor; o 0,01 mM o mayor; o 0,1 mM o mayor. Independientemente, en algunas modalidades en las cuales una composición de la presente invención incluye agua, la concentración del agente acomplejador metálico es 100 mM o menor; o 10 mM o menor; o 1 mM o menor.

En algunas modalidades de la presente invención, uno o más adyuvantes se incluyen en la composición. El uso de adyuvantes se considera opcional en la práctica de la presente invención. Los adyuvantes pueden usarse solos o en cualquier combinación. Cuando se usa más de un adyuvante, se contempla que pueda usarse cualquier combinación de ellos. Algunos adyuvantes adecuados son tensioactivos, alcoholes, aceites, rellenos, pigmentos, aglomerantes, plastificantes, lubricantes, agentes humectantes, agentes esparcidores, agentes dispersadores, adherentes, adhesivos, desespumantes, espesadores, agentes vehiculares y emulsificantes.

En algunas modalidades, se usa una composición de la presente invención, que contiene uno o más adyuvantes seleccionados de alcoholes, aceites y sus mezclas; tal composición puede contener o no uno o más tensioactivos.

En algunas modalidades de la presente invención se usa uno o más tensioactivos. Los tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no-iónicos, anfotéricos y mezclas de los mismos. En algunas modalidades, se usa uno o más tensioactivos aniónicos. También son adecuadas las mezclas de tensioactivos.

Entre las modalidades en las cuales se usa una o más composiciones líquidas que incluyen a uno o más tensioactivos, algunas contienen tensioactivos en cantidades, en peso basadas en el peso total de la composición líquida, de 0,025% o más; o 0,05% o más; o 0,1% o más. Independientemente, algunas composiciones líquidas usan tensioactivos en cantidades, en peso basadas en el peso total de la



composición líquida de 75% o menos; o 50% o menos; o 20% o menos; o 5% o menos; o 2% o menos; o 1% o menos; o 0,5% o menos; o 0,3% o menos.

En algunas de las modalidades, no se incluye aceite en la composición.

Independientemente en algunas de las modalidades, se usa uno o más aceites. Como se usa aquí, un "aceite" es un compuesto que es líquido a 25°C y a 1 atmósfera de presión y, que tiene un punto de ebullición de 30°C o mayor, a 1 atmósfera de presión. Como se usa aquí, "aceite" no incluye agua ni tensioactivos (como ya se describió) ni alcoholes (como se describirá). Algunos aceites son aceites de hidrocarburos, mientras otros no lo son. Los aceites de hidrocarburos son compuestos de alcanos rectos, ramificados o cíclicos, con 6 o más átomos de carbono. Como se usa aquí "sin hidrocarburo" significa cualquier compuesto que contiene al menos un átomo que no es hidrógeno ni carbono.

En algunas modalidades, en las cuales se usa una composición líquida, se incluye uno o más aceites de hidrocarburo en la composición. Algunos aceites de hidrocarburo adecuados incluyen, por ejemplo, hexano, dodecano, hexadecano, petróleo diesel, aceite parafínico refinado (por ejemplo, aceite para aspersión Ultradine™ de la Sun Company) y mezclas de los mismos.

En algunas modalidades, se incluye uno o más aceites no-hidrocarburo en la composición. En algunas modalidades, los aceites no hidrocarburo tienen un punto de ebullición de 50°C o mayor; o 75°C o mayor; o 100°C o mayor. Independientemente, en algunas modalidades, los aceites no hidrocarburo tienen un peso molecular de 100 o mayor; o 200 o mayor; o 500 o mayor.

Algunos aceites no hidrocarburo son, por ejemplo, aceites grasos no hidrocarburo. Aquí "graso" significa cualquier compuesto que contenga uno o más residuos de ácidos grasos. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena larga, con largos de cadena de al menos 4 átomos de carbono. Los ácidos grasos típicos tienen largos de cadena de 4 a 18 átomos de carbono, aunque algunos tienen



cadenas más largas. Algunos de los aceites grasos, no hidrocarburo, adecuados son, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos. Tales ésteres incluyen, por ejemplo, glicéridos de ácidos grasos, incluyendo triglicéridos. Un ejemplo de un triglicérido de ácido graso es el aceite de soya. Los aceites grasos no hidrocarburo pueden ser sintéticos o naturales o modificaciones de aceites naturales o una combinación o mezcla de los mismos. También, entre los aceites grasos no hidrocarburo están los ésteres auto-emulsificantes de ácidos grasos.

Otro grupo de aceites no hidrocarburo adecuados son los aceites de silicona. Los aceites de silicona son oligómeros o polímeros que tienen un espinazo parcial o completamente hecho de eslabones $-\text{SiO}-$. Los aceites de silicona incluyen, por ejemplo, a los aceites de polidimetilsiloxano.

También son adecuadas las mezclas de aceites adecuados, incluyendo mezclas plurales de aceites de hidrocarburo, mezclas plurales de aceites no hidrocarburo y mezclas de uno o más aceites de hidrocarburo con uno o más aceites no hidrocarburo.

Algunas modalidades usan aceites en cantidades en peso, basadas en el peso total de la composición de 0,25% o más; o 0,5% o más; o 1% o más. Independientemente, algunas modalidades usan aceites en cantidades en peso, basadas en el peso total de la composición, de 90% o menor; o 50% o menor; o 10% o menor; o 5% o menor; o 4% o menor; o 3% o menor.

En algunas composiciones líquidas se usa uno o más alcoholes. Los alcoholes adecuados incluyen, por ejemplo, alquil alcoholes u otros alcoholes. Como se usa aquí, los alquil alcoholes son compuestos de alquil con un grupo hidroxil; el grupo alquil puede ser lineal, ramificado, cíclico o una combinación de los mismos. El alcohol puede ser primario, secundario o terciario. En algunas modalidades, se usa los alquil alcoholes que tienen grupos alquil con 2 o más átomos de carbono. En algunas modalidades se usa etanol, isopropanol o una mezcla de ellos.



modalidades se usa uno o más alquil alcoholes que tienen grupos alquil con 20 o menos átomos de carbono; o 10 o menos átomos de carbono; o 6 o menos átomos de carbono; o 3 o menos átomos de carbono.

Entre las composiciones líquidas que usan alcohol, algunas usan alcohol en cantidades en peso, basadas en el peso total de la composición líquida, de 0,25% o mayor; o 0,5% o mayor; o 1% o mayor. Entre las composiciones líquidas que usan alcohol, algunas usan alcohol en cantidades en peso, basadas en el peso total de la composición, de 90% o más; o 50% o más; o 10% o más; o 5% o más; o 4% o más; o 3% o más.

Los ingredientes de la presente invención pueden mezclarse por cualquier medio, en cualquier orden.

En la práctica de la presente invención puede usarse cualquier método que permita por en contacto a la composición líquida o composiciones de la presente invención, con la planta. Como se usa aquí, poner en contacto la planta con una composición líquida de la presente invención se designa "tratar" a la planta. Algunos ejemplos de métodos de contacto son, por ejemplo, asperjar, espumar, nebulizar, vaciar, pincelar, sumergir y métodos similares y sus combinaciones. En algunas modalidades se usa asperjar o sumergir o ambos. En algunas modalidades se usa asperjar.

Algunas plantas se cultivan con el propósito de remover una o más de sus partes, cuando tales partes se consideran un producto útil. Tales plantas se conocen aquí como "plantas cultivadas". La remoción de tales partes útiles de la planta se conoce como cosecha. En la práctica de la presente invención, las plantas que producen partes útiles se tratan con la composición de la presente invención antes de cosechar sus partes útiles. En tales modalidades, cada composición que se usa puede, independientemente de cualquier otra composición que pueda usarse, puede ponerse en contacto con toda o con una porción de la planta. Sí se pone en



contacto la composición con una porción de la planta, esa porción puede o no incluir la parte útil de la planta que se pretende cosechar.

Se usa una composición de la presente invención para ponerla en contacto con plantas. Se contempla que, al efectuar el tratamiento, la composición de la presente invención pueda ponerse en contacto con toda la planta o solo con una o más partes de la planta. Las partes de la planta incluyen cualquier parte de la planta incluyendo, por ejemplo, flores, yemas, brotes, semillas, cotes, raíces, bulbos, frutos, hortalizas, hojas y combinaciones de las mismas.

En algunas modalidades, la composición líquida de la presente invención se asperja sobre plantas cultivadas que crecen en el campo. Tal operación de aspersión puede efectuarse una o más veces en un grupo particular de plantas cultivadas, durante una sola estación de crecimiento. En algunas modalidades la cantidad de ciclopropeno usada en una operación de aspersión es de 0,1 g/ha o más; o 0,5 g/ha o más; o 1 g/ha o más. Independientemente, en algunas modalidades, la cantidad de ciclopropeno usada en una operación de aspersión es 500 g/ha o menor; o 300 g/ha o menor; o 100 g/ha o menor; o 50 g/ha o menor.

En proceso de crecimiento y desarrollo de muchas plantas de cultivo puede describirse por ciertas etapas de desarrollo. Por ejemplo, muchas plantas de cultivo se desarrollan a través de etapas vegetativas, seguidas por etapas reproductivas. Algunas plantas de cultivo se desarrollan a través de etapas de maduración, después de sus etapas reproductivas. En la práctica de la presente invención, las plantas de cultivo se ponen en contacto con una composición de la presente invención, una o más veces durante una o más etapas reproductivas. En algunas modalidades, las plantas de cultivo opcionalmente pueden ponerse en contacto, adicionalmente, con una composición de la presente invención, una o más veces, antes de cualquier etapa reproductiva, una o más veces durante la etapa de maduración o combinación de las mismas.



Algunas plantas de cultivo se desarrollan a través de procesos vegetativos y reproductivos simultáneamente. Se contempla poner en contacto tales plantas de cultivo con una o más composiciones de la presente invención, una o más veces después de la germinación, pero antes de la cosecha.

Se contempla que, en algunas modalidades, el contacto de plantas de cultivo con una composición líquida de la presente invención resultará en un rendimiento mejorado. Se contempla que, para algunas plantas de cultivo específicas, haya una etapa o etapas en las cuales efectuar el contacto con la composición de la presente invención, para lograr el máximo mejoramiento del rendimiento. Se contempla que la etapa o etapas óptimas pueden ser diferentes para cada tipo de planta de cultivo y que tales etapa o etapas óptimas puedan, en algunos casos, depender de las condiciones de crecimiento específicas.

En algunas modalidades, se contempla poner en contacto a un grupo de plantas de cultivo, a cierta etapa deseada de crecimiento. En tales casos, se contempla que tal contacto se efectúe cuando la relación entre el número de plantas que alcanzaron la etapa de desarrollo deseada, al número de plantas totales en el grupo, sea de al menos 0,1; o al menos 0,5; o al menos 0,75; o al menos 0,9 (es decir, cuando la porción de plantas que alcanzaron la etapa de desarrollo deseada sea de al menos 10%, 50%, 75% o 90%).

Los tratamientos adecuados pueden efectuarse en plantas cultivadas en el campo, en un jardín, en un edificio (por ejemplo, en un invernadero) o en cualquier otra ubicación. Los tratamientos adecuados pueden efectuarse en plantas cultivadas en terreno abierto, en uno o más contenedores (por ejemplo, un macetero o florero), en camas confinadas o elevadas o en otros lugares. En algunas modalidades en las cuales el tratamiento se efectúa en un edificio, se contempla que el edificio no sea hermético. En algunas modalidades, el tratamiento se efectúa fuera de cualquier edificio.



En la práctica de la presente invención, las plantas que se tratan son cualquier planta que produzca una cosecha hortícola. Los cultivos hortícolas son productos agrícolas que no son cultivos agronómicos ni son productos forestales. Los cultivos agronómicos son cultivos de campo herbáceos, incluyendo granos, oleaginosas y fibras. Los productos forestales son árboles forestales y producto forestales. Las plantas hortícolas son plantas manejadas en forma relativamente intensiva, que se cultivan para alimento o estética. Algunos cultivos hortícolas típicos son frutas, hortalizas, especias, hierbas y plantas para uso ornamental.

En algunas modalidades, se tratan plantas de cultivo que producen frutas, hortalizas, especias, hierbas o plantas o partes de plantas que se cultivan para uso ornamental. En algunas modalidades retratan plantas que producen frutas u hortalizas. En algunas modalidades, se tratan plantas que producen hortalizas.

Entre las modalidades que incluyen a plantas de cultivo que producen hortalizas, las plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, plantas que producen repollos, alcachofas, espárragos, lechuga, espinacas, hojas de casava, tomates, coliflores, zapallos, pepinos, berenjenas, ajíes y pimientos dulces, cebollines, cebollas, ajos, puerro y otras hortalizas aliáceas, porotos verdes, arvejas, porotos pallares, zanahorias, oca, choclos, hongos, sandías, melones cantaloupe, otros melones, brotes de bambú, betarragas, alcaparras, chaguales, apio, berros, hinojo, rábano picante, mejorana, perejil, radicha, ruibarbo, rutabagas, ajedrea, acederilla y otras hortalizas.

Algunas modalidades incluyen el tratamiento de plantas solanáceas o cucurbitáceas. Las plantas solanáceas incluyen, por ejemplo, *Lycopersicon esculentum* (incluyendo tomates); plantas del género *Capsicum* (tales como pimentones, pimienta dulce y ajíes); y plantas de *Solanum melongena* (incluyendo berenjenas). Las plantas cucurbitáceas incluyen, por ejemplo, *Citrullus lanatus* (sandías), *Cucumis sativus* (pepinos), *Cucumis melo* (todos los melones), *Cucumis*



anguria (berenjenas), *Cucúrbita* (cinco especies de zapallo), *Cucúrbita pepo* (zapallos de verano, zapallitos italianos), *Cucúrbita máxima y moschata*.

Algunas modalidades incluyen el tratamiento de plantas de tomate, de pimiento dulce, de sandia, de melón.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de tomate, las plantas de tomate adecuadas incluyen, por ejemplo, plantas de tomate para procesamiento y para mercado fresco. Las plantas de tomates se tratan, al menos una vez, con al menos un tratamiento efectuado en cualquier tiempo, durante cualquiera etapa reproductiva. En algunas modalidades, las plantas de tomate se tratan en uno o más de los siguientes tiempos: una o más veces durante el período desde la iniciación de la primera floración hasta siete días después; y una o más cosecha. En algunas modalidades, las plantas de tomate se tratan en uno o más de los siguientes tiempos: a la iniciación del primer pluralidad de floración; siete días después de la iniciación del primer período de floración; 28 días antes de la cosecha predicha y cualquier combinación de los mismos.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de tomate, las tasas de tratamiento adecuadas incluyen, por ejemplo, 5 g/ha o más; o 10 g/ha o más; o 20 g/ha o más. Independientemente, entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de tomate, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 100 g/ha o menos; o 60 g/ha o menos; o 30 g/ha o menos.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de pimiento dulce, estas se tratan al menos una vez, con al menos un tratamiento efectuado en cualquier tiempo, durante cualquier etapa reproductiva. En algunas modalidades, las plantas de pimiento dulce se tratan al inicio del primer período de floración.



Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de pimiento dulce, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 5 g/ha o más; o 10 g/ha o más; o 20 g/ha o más. Independientemente, entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de pimiento dulce, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 10 g/ha o menos; o 60 g/ha o menos; o 30 g/ha o menos.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de sandía, estas se tratan al menos una vez, con al menos un tratamiento efectuado en cualquier tiempo, durante cualquier etapa reproductiva. La época de aplicación de los tratamientos en plantas de sandía pueden describirse como "DAF!; es decir días después de floración, lo que significa el número de días después del comienzo de la floración. En algunas modalidades, se tratan las plantas de sandía una o más veces a los 1 a 14 DAF. En algunas modalidades, las plantas de sandía se tratan en cualquier o en todas las combinaciones de las siguientes épocas: 1DAF; 7 DAF y 14 DAF.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de sandía, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 1 g/ha o más; o 2 g/ha o más; o 5 g/ha o más. Independientemente, entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de sandía, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 100 g/ha o menos; o 60 g/ha o menos; o 30 g/ha o menos.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de cantalupa, estas se tratan al menos una vez, con al menos un tratamiento efectuado en cualquier tiempo, durante cualquier etapa reproductiva. En algunas modalidades, las plantas de cantalupa se tratan una o más veces en el período desde iniciación de las yemas hasta 10 días después de la abertura de las flores. En algunas modalidades, las plantas de cantalupa se tratan después de la iniciación de las yemas, pero antes de la abertura de las flores. En algunas modalidades, las plantas de Cantaluña se tratan 10 días después de la abertura de las flores.



Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de cantalupa, las tasas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 5 g/ha o más; o 10 g/ha o más; o 20 g/ha o más. Independientemente, entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de cantalupa, las tasas adecuadas de tratamiento incluyen, por ejemplo, 10 g/ha o menos; o 60 g/ha o menos; o 30 g/ha o menos.

Entre las modalidades que incluyen el tratamiento de plantas de melón, diferentes de las de cantalupa, la época contemplada de tratamiento y las tasas de tratamiento son las mismas ya descritas para plantas de cantalupa.

Entre las modalidades que incluyen plantas de cultivo que producen frutas, las plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, plantas de banano de plátano macho; cítricos, pomáceas, frutas de carozo; bayas; frutas tropicales; frutas misceláneas y otras. Las frutas cítricas incluyen, por ejemplo, naranjas, tangerinas, mandarinas, clementinas, stasumas, limón, lima, pomelo, bergamota, quinotos, y otras. Las frutas pomáceas incluyen, por ejemplo, manzanas, peras membrillos y otras. Las frutas de carozo incluyen, por ejemplo, damascos, cerezas, duraznos, nectarines, ciruelas y otras. Las bayas incluyen, por ejemplo, frutillas, frambuesas, grosellas, uvas para pasas, arándanos, arándano rojo, moras, frambuesas de Logan, moreras, otros arándanos y otras. Las frutas tropicales incluyen, por ejemplo, caquis, kivis, mango, palta, piña, dátiles, papaya, fruto del árbol del pan, chirimoya, Feijoo, guava, mamej, naranjillo, maracuyá, zapote, y otras. La frutas misceláneas incluyen, por ejemplo, babaco, litchi, pomegranada, tuna, tamarindo y fresas de árbol.

En algunas modalidades de la presente invención, se trata un grupo de plantas en forma simultánea o secuencial. Una característica de tal grupo de plantas es el rendimiento que se define como la cantidad (aquí llamada "cantidad de cosecha") de parte útiles de las plantas, recolectadas desde u grupo de plantas definido. En una definición útil del rendimiento, el grupo de plantas definido ocupa una cierta área de terreno (esta definición se usa a menudo cuando las plantas



crecen en un grupo contiguo, en un campo). En otra definición útil de rendimiento, el grupo de plantas definido es un número específico de plantas individualmente identificadas (esta definición puede usarse para cualquier grupo de plantas incluyendo, por ejemplo, plantas en un campo, en maceteros, en invernaderos o cualquier combinación de los mismos).

La cantidad de cosecha puede definirse en una variedad de formas. En la práctica de la presente invención, la cantidad de cosecha puede medirse, por ejemplo, por cualquiera de los siguientes métodos; peso, volumen, número de partes de planta cosechadas o biomasa. También se contempla métodos en los cuales la cantidad de cosecha se mide como la cantidad de cosecha de un constituyente específico (tal como, por ejemplo, sólidos, azúcar, almidón o proteína). Además, se contempla métodos en los cuales la cosecha se mide como la cantidad de una cierta característica (tal como coloración roja, que a veces se usa para medir la cantidad de una cosecha de tomates). Además, se contempla métodos en los cuales la cantidad de cosecha se mide como la cantidad de una porción específica de la parte de planta cosechada.

En algunas modalidades, el rendimiento de la cosecha se define como la cantidad de cosecha por unidad de área. Esto es, el área del campo desde el cual se cosechó y, la cantidad de cosecha se divide por el área para calcular el rendimiento. Por ejemplo, una cantidad de cosecha medida como el peso de las partes de planta cosechadas, conduciría a un rendimiento que se informa como peso por área (por ejemplo, kg/ha). Se contempla que, en algunas modalidades, las partes de planta cosechadas que contribuyen a la cantidad de cosecha sean aquellas partes de planta que satisfacen el criterio de calidad mínima, adecuada para ese tipo de planta. Esto es, cuando se cosechan partes de planta de ciertas plantas, la cantidad de cosecha es, por ejemplo, el peso de las partes de planta de calidad aceptable, que se cosechan de esas plantas. La calidad aceptable puede



determinarla cualquiera con el criterio común usado por personas que cosechan o manipulan partes de plantas de interés. Tal criterio de calidad aceptable de una parte de una planta puede ser, por ejemplo, uno o más de tamaño, peso, firmeza, resistencia a daños, sabor, balance azúcar/almidón, color, belleza, edibilidad, atractivo cosmético, apariencia general, adecuación para venta, otros criterios de calidad o sus combinaciones. También se contempla como criterio de calidad, tanto solo como en combinación con cualquier de los criterios anteriores, la duración del tiempo en que la planta mantiene su calidad (juzgada por cualquiera de los criterios anteriores).

Unos pocos ejemplos ilustrativos (pero no limitantes) de cantidad de cosecha son, por ejemplo, el peso total de la cosecha; el número total de plantas cosechadas; peso (o número) de las partes de plantas cosechadas que cumplen o exceden algún peso mínimo para el tipo de parte de plantas; o peso (o número) de partes de plantas cosechadas que son comestibles; o peso (o número) de las partes de plantas que pueden comercializarse. En tal caso, como ya se definió, el rendimiento de la cosecha es la cantidad cosechada por unidad de área en la cual creció la cosecha.

En algunas modalidades de la presente invención, el tratamiento de un grupo de plantas con los métodos de la presente invención aumentará el rendimiento de la cosecha de tal grupo de plantas, en comparación con el que se hubiera obtenido de tal grupo de plantas si no se hubieran tratado con los métodos de la presente invención. El aumento de rendimiento puede obtenerse en una variedad amplia de formas. Por ejemplo, una forma de aumentar el rendimiento es que cada planta pueda producir un mayor número de partes de planta útiles. Como otro ejemplo, una forma de aumentar el rendimiento es que cada parte pueda tener un mayor peso. Como un tercer ejemplo, el aumento en el rendimiento puede deberse a un mayor número de partes de planta potencialmente útiles que cumplan el criterio



mínimo de calidad aceptable. Otras formas de aumentar el rendimiento pueden resultar también de la práctica de la presente invención. También se contempla los aumentos en rendimiento que suceden por una combinación de formas.

Otro beneficio contemplado de la práctica de algunas modalidades de la presente invención es que puede mejorarse la calidad general de la cosecha. Esto es, una cosecha producida por los métodos de la presente invención puede tener un nivel general o promedio de calidad más alta que cosechas comparables producidas sin los métodos de la presente invención, juzgada por los criterios de calidad adecuados para esa cosecha. En algunos casos, tales cosechas de calidad más alta pueden obtener precios más altos cuando se comercializan.

EJEMPLOS

En los Ejemplos siguientes, se usó los siguientes materiales:

-Polvo 1 = polvo conteniendo 3,8% de 1-MCP, en peso, disponible como AFXRD-038 en Rohm & Haas Co.

-Polvo 2 = polvo conteniendo 2,0% de 1-MCP, en peso, disponible como AFXRD-020, en Rohm & Haas Co.

-Adyuvante 1 = aceite de aspersion Dyne-AmicTM, disponible en Helena Chemical.

En los siguientes Ejemplos, las muestras designadas "UTC" son testigos sin tratamiento y son ejemplos comparativos. Los Ejemplos remanentes representan a la presente invención.

En los siguientes Ejemplos, se usó los procedimientos:

El estanque de la aspersora se llenó con aproximadamente dos tercios del volumen total de agua requerida. La cantidad de Polvo 1 o Polvo 2 se pesó de



acuerdo con la tasa de tratamiento planeada y se preparó el volumen total de aspersión. Se calculó la cantidad adecuada para dar 0,38% (v/v) del volumen total a asperjar. El Adyuvante 1 se agregó al estanque, que se agitó hasta que la mezcla se hizo blanca como leche. Se agregó Polvo 1 o Polvo 2 al estanque, el que se agitó suavemente (no vigorosamente). Se agregó el resto del agua, asegurando que todo el polvo estuviera mojado y se lavó los costados del estanque (sí algo se hubiera depositado allí). Se sacudió el estanque durante 2 a 5 minutos, para asegurar buen mezclado. Después de 5 a 60 minutos, se asperjó las plantas con la mezcla.

Se usó boquillas de abanico plano, produciendo un tamaño de gotitas de 100 a 500 μm . Se asperjó con 187 a 373 l/ha (20 a 40 g/A). Se usó una aspersora de espalda impulsada por dióxido de carbono. Se asperjó antes de las 10:00 am.

En los siguientes Ejemplos se usó las siguientes abreviaturas: ha para hectárea, Tm para tonelada métrica, Al por 1-MCP y wt por peso.

EJEMPLO 1: Procesamiento de Tomates, variedad AB2

Se cultivó la variedad de tomates AB2 en Gainesville, FL. Se condujo el tratamiento por aspersión como ya se describió, con una concentración del líquido ajustada para dar 25 g/ha (9,4 oz/A) de 1-MCP. Se aplicó el tratamiento en las siguientes etapas:

Flor1 = inicio de la primera floración

Flor2 = 7 días después de inicio del primer período de floración

Día28 = 28 días antes de la cosecha predicha

Día21 = 21 días antes de la cosecha predicha



Día14 = 14 días antes de la cosecha predicha

Los resultados son como sigue:

Masa como rendimiento de frutos, informado como Tm/ha (tons/A)

°Brix son sólidos solubles (también llamados sólidos solubles totales o contenido de sólidos solubles), que es una medida de calidad en tomates. Los °Brix se informan como peso de sólidos por unidad de área de campo, es decir, Tm/ha (tons/A)

Retardo es el retardo de la cosecha, informada como % de Verdes

Maduros

Número es el rendimiento de frutos, informado como miles de frutos por hectárea (miles/A).

Ensayo 1

Tratamiento	Masa	°Brix	Retardo
Flor 1	243 (44)	12,1 (2,18)	10
Flor 1 y Flor 2	227 (41)	12,0 (2,17)	11
Día 28	221 (40)	11,6	9
UTC	199 (36)	10,5 (1,89)	8

Ensayo 2

Tratamiento	Masa	°Brix	Retardo
Flor 1	194 (35)	11,0 (1,99)	4
Flor 1 y Flor 2	205 (37)	11,5 (2,08)	3
Día 28	183 (33)	10,9 (1,97)	4
UTC	177 (32)	9,4 (1,70)	5

Ensayo 3

Tratamiento	Masa	°Brix	Retardo
Flor 1 y Flor 2	111 (20)	6,4 (1,15)	13
Día 28	116 (21)	6,3 (1,14)	17
UTC	105 (19)	6,3 (1,14)	15



Ensayo 4

Tratamiento	Masa	°Brix	Retardo
Flor 1 Flor 2	304 (55)	14,9 (2,7)	5
UTC	288 (52)	14,4 (2,6)	4

Los tomates tratados mostraron un mejoramiento en Masa y °Brix sobre los tomates UTC

EJEMPLO 2: Tomates para Procesamiento, Variedad 410

Los tomates de la variedad 410 se cultivaron y trataron como en el Ejemplo 1. Los resultados fueron los siguientes:

Ensayo 5

Tratamiento	Masa	Número
Flor 1	354 (64)	2.245 (909)
Flor 2	376 (68)	2.406 (974)
UTC	327 (59)	2.062 (835)

Los tomates tratados mostraron mejoramiento en Masa y Número, sobre los tomates UTC

EJEMPLO 3: Tomates para Consumo Fresco. Variedad FL47

Se cultivó tomates de la Variedad FL 47 en Florida y se los trató como se describió anteriormente. El rendimiento se informa como Tm/ha (Cwt/A, es decir, el número de grupos de cien libras/A). Los resultados son como sigue:

Ensayo 6

Tratamiento	Masa
Flor 1	27,0 (241)
Flor 2	21,5 (192)
Flor 1 y Flor 2	23,3 (208)
UTC	19,4 (173)



Ensayo 7

Tratamiento	Rendimiento
Flor1	18,3 (163)
Flor2	18,6 (166)
Flor 1 y Flor2	17,2 (154)
UTC	15,8 (141)

Ensayo 8

Tratamiento	Rendimiento
Día21	24,2 (216)
Día 14	20,4 (182)
Día21 y Día14	22,3 (199)
UTC	19,4 (173)

Los tomates tratados mostraron mejoramiento sobre los tomates UTC.

EJEMPLO 4: Pimentones

Se cultivó Pimentones de la variedad Lady Bell, en Fostoria, Ohio, en una parcela pequeña y se los trató como en el Ejemplo anterior, con un tratamiento al inicio del primer período de floración. Las tasas de tratamiento se informan como g/ha (oz/A). Los resultados se informan como Fruta Total (número de pimientos dulces producidos en toda la parcela), Frutas por Planta (promedio de la parcela) y Plantas Totales (número total de plantas en toda la parcela. "NS" significa que la composición líquida no tenía tensioactivos. Los resultados fueron los siguientes:

Tasa de Tratamiento	Frutas Totales	Frutas por Planta	Plantas Totales
UTC	176	6,1	16
5 (1,9)	292	10,1	23
25 (9,4)	243	8,4	22
25 (9,4)NS	231	8	22

Las plantas de pimiento dulce tratadas mostraron mejoramiento sobre las plantas de pimiento dulce UTC.



EJEMPLO 5: Sandía

Se trató plantas de sandía (variedad triploide cv. SS 7187) como en el Ejemplo 1 anterior. Las tasas de tratamiento se informan en gramos de 1-MCP/ha. La etapa de aplicación se informa como DAF (días después de floración). Una sandía comercializable es una con una masa de 4,54 kg o mayor. Un "cull" (seleccionada para eliminación) es una sandía con masa inferior a 4,54 kg o una no cosechada que tiene un diámetro mayor de 5 cm. Se informa los siguientes resultados:

Num25 = Número de frutas con diámetro mayor de 5 cm/planta, evaluada antes de cosecha, a 25 DAF, también conocida como "fruta cuajada".

NumTot = Frutas Cosechadas y NoCosechadas, 42-56 días, con diámetros mayores de 5 cm.

NumMark = Número de sandías comercializables por planta.

NumCull = Número de eliminadas por planta.

Tamaño = Tamaño promedio de la fruta, en kg.

Rendimiento = Masa de sandías comercializables, en toneladas métricas/há.

Los resultados son los siguientes:

CUADRO 5.1

Tasa de Tratamiento	Etapa de aplicación	Num25	NumTot	Rendimiento
UTC	--	1,0	1,65	40,4
10	1	1,8	2,35	46,3
10	7	1,55	1,8	39,1



El análisis estadístico de los datos que se resume en el Cuadro 5.1 mostró que el Tratamiento a 1 DAF dio un aumento significativo en ambos, número y rendimiento de sandías, sobre UTC.

CUADRO 5.2

Tasa de Tratamiento	Epoca de Aplicación	Num25	NumMark	NumCulls	Rendimiento	Tamaño
UTC	--	1,25	1,09	0,78	44,4	7,46
5	7	1,25	1,24	0,64	46,2	6,83
5	14	1,83	1,44	0,58	58,1	7,44
5	7 y 14	1,58	1,40	0,71	55,8	7,26
10	7	1,17	1,47	0,71	60,6	7,56
10	14	1,42	1,33	0,64	51,9	7,09
10	7 y 14	1,67	1,33	0,78	51,4	7,10
25	7	1,58	1,49	0,58	57,0	7,08
25	14	1,75	1,42	0,58	57,1	7,41
25	7 y 14	1,92	1,29	0,60	50,3	7,15

El análisis estadístico de los datos que se resumen en el Cuadro 5.2 mostró lo siguiente. El tratamiento a 25 g/ha produjo un aumento significativo en la cuaja de frutas sobre UTC. Las plantas tratadas mostraron un aumento significativo en el número de frutas comercializables, sobre UTC. Las plantas tratadas mostraron un aumento significativo en el rendimiento sobre UTC. Las diferencias en tamaño de fruta, entre las plantas tratadas y UTC, no fueron significativas.

EJEMPLO 6: Cantaloupe

Se trató plantas de cantalupa como en el Ejemplo 1. La etapa de tratamiento fue "Antes" (antes de la abertura de flores) o "Flor 10" (10 días antes de la abertura de flor). Se midió el promedio de cuaja de la primera flor ("Set"). Los resultados fueron los siguientes:

Tratamiento	Cuaja
UTC	0,137
Antes	0,161
Flor 10	0,0247

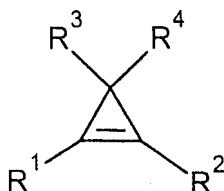


El tratamiento antes de la abertura de la flor dio una cuaja mejorada sobre UTC.



REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para tratar plantas de cultivos hortícolas, donde dichas plantas son seleccionadas del grupo conformado por plantas solanáceas y cucurbitáceas, comprendiendo el paso de poner en contacto a esas plantas una o mas veces con una composición líquida, en donde dicha composición líquida comprende un ciclopropeno, en donde dicho contacto se efectúa durante una etapa reproductiva de esas plantas, y en donde dicho ciclopropeno es un compuesto que tiene la estructura:



donde cada uno de R^2 , R^3 y R^4 es hidrógeno y donde R^1 es un grupo alifático sustituido o no sustituido.

2.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque ese contacto se efectúa a una tasa desde 1 hasta 300 g/ha de ese ciclopropeno.

3.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque esas plantas se seleccionan del grupo que consiste de plantas de sandía, melones de cantalupe, pimentón y tomate.

4.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque esas plantas son de tomate y porque dicho paso de poner en contacto se efectúa en un tiempo que se selecciona del grupo que consiste de:

- a) una vez durante el período desde el inicio de la primera floración hasta 7 días después del inicio del primer período de floración;
- b) una vez durante el período desde 28 días antes de la cosecha predicha, hasta la cosecha; y,
- c) cualquier combinación de los anteriores.



5.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque esas plantas son de pimentón y porque dicho paso de poner en contacto se efectúa en un tiempo al inicio del primer período de floración.

6.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque esas plantas son de sandía y porque dicho paso de poner en contacto se efectúa en un tiempo desde 1 hasta 14 días después de la floración.

7.- El procedimiento según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque esas plantas son de melón cantalupe y porque dicho paso de poner en contacto se efectúa en el período desde iniciación de las yemas hasta 10 días después de la abertura de flores.

8.- El procedimiento según la reivindicación 1, en donde R^1 es alquilo C_{1-4} .



Whole-Plant Growth Stage Ontology for Angiosperms and Its Application in Plant Biology^{1[OA]}

Anuradha Pujar², Pankaj Jaiswal², Elizabeth A. Kellogg², Katica Ilic², Leszek Vincent², Shulamit Avraham², Peter Stevens², Felipe Zapata², Leonore Reiser³, Seung Y. Rhee, Martin M. Sachs, Mary Schaeffer, Lincoln Stein, Doreen Ware, and Susan McCouch*

Department of Plant Breeding, Cornell University, Ithaca, New York 14853 (A.P., P.J., S.M.); Department of Biology, University of Missouri, St. Louis, Missouri 63121 (E.A.K., P.S., F.Z.); Department of Plant Biology, Carnegie Institution, Stanford, California 94305 (K.I., L.R., S.Y.R.); Division of Plant Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211 (L.V., M.S.); Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724 (S.A., L.S., D.W.); Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri 63110 (P.S., F.Z.); Maize Genetics Cooperation-Stock Center, Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801 (M.M.S.); and Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC 20250 (M.M.S., M.S., D.W.)

Plant growth stages are identified as distinct morphological landmarks in a continuous developmental process. The terms describing these developmental stages record the morphological appearance of the plant at a specific point in its life cycle. The widely differing morphology of plant species consequently gave rise to heterogeneous vocabularies describing growth and development. Each species or family specific community developed distinct terminologies for describing whole-plant growth stages. This semantic heterogeneity made it impossible to use growth stage description contained within plant biology databases to make meaningful computational comparisons. The Plant Ontology Consortium (<http://www.plantontology.org>) was founded to develop standard ontologies describing plant anatomical as well as growth and developmental stages that can be used for annotation of gene expression patterns and phenotypes of all flowering plants. In this article, we describe the development of a generic whole-plant growth stage ontology that describes the spatiotemporal stages of plant growth as a set of landmark events that progress from germination to senescence. This ontology represents a synthesis and integration of terms and concepts from a variety of species-specific vocabularies previously used for describing phenotypes and genomic information. It provides a common platform for annotating gene function and gene expression in relation to the developmental trajectory of a plant described at the organismal level. As proof of concept the Plant Ontology Consortium used the plant ontology growth stage ontology to annotate genes and phenotypes in plants with initial emphasis on those represented in The Arabidopsis Information Resource, Gramene database, and MaizeGDB.

Plant systems are complex, both structurally and operationally, and the information regarding plant development requires extensive synthesis to provide a coherent view of their growth and development. The difficulty of developing such a synthesis is exacerbated by the deluge of new technologies such as high-throughput genotyping, microarrays, proteomics, transcriptomics, etc., that generate large amounts of data rapidly. The speed and magnitude of data deposition challenges our ability to represent and interpret

this data within the context of any particular biological system (Gopalacharyulu et al., 2005). The ability to extract knowledge from historical sources and integrate it with new information derived from global datasets requires a sophisticated approach to data mining and integration.

Historically, the growth and development of cultivated plants have been monitored at the whole-plant level with the help of scales of easily recognizable growth stages. Consequently, there exist large volumes of literature detailing growth stages for individual plant species or closely related groups of species. For example, Zadok's scale (Zadok et al., 1974) was developed for the Triticeae crops and is widely used to stage the growth and development of cereal crops in the United States. The flexibility of this scale has allowed it to be extended to other cultivated plants, and a uniform code called the Biologische Bundesanstalt, BUNDessortenamt, and Chemical Industry (BBCH) code was developed from it (Meier, 1997). The BBCH scale is quite generic and encompasses multiple crops, including monocot and eudicot species. It offers standardized descriptions of plant development in the order of phenological appearance, and has coded

¹ This work was supported by the National Science Foundation (grant no. 0321666).

² These authors contributed equally to the paper.

³ Present address: Molecular Sciences Institute, 2168 Shattuck Ave., Berkeley, CA 94704.

* Corresponding author; e-mail srm4@cornell.edu; fax 1-607-255-6683.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Susan McCouch (srm4@cornell.edu).

[OA] Open Access articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.085720

each stage for easy computer retrieval. It should be noted that *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), as a representative of the Brassicaceae and by virtue of not being a cultivated species, did not have a specific growth stage vocabulary or scale until 2001 when Boyes et al. (2001) developed an experimental platform describing the *Arabidopsis* growth stages using the BBCH scale. This work created a crucial semantic link between *Arabidopsis* and cultivated plants. In addition to facilitating the description and synthesis of large amounts of data within a crop species, vocabularies like the BBCH and Zadok's scale also make possible transfer of information among researchers and provide a common language for comparative purposes (Counce et al., 2000).

In the post genomic era, these scales have proved inadequate to handle the deluge of information that required large-scale computation for comparative analysis. This called for the conversion of existing scales into ontology that have an advantage over simple scales because their hierarchical organization facilitates computation across them. Terms in an ontology are organized in the form of a tree, the nodes of the tree represent entities at greater or lesser levels of detail (Smith, 2004). The branches connecting the nodes represent the relation between two entities such that the term radicle emergence stage is a child of the parent term germination stage (Fig. 1). Individual stages of a scale are then parts that can be related to the whole by their order of appearance during plant growth. Each term carries a unique identifier and strictly specified relationships between the terms allow systematic ordering of data within a database, this in turn improves input and retrieval of information (Bard and Rhee, 2004; Harris et al., 2004).

Consequently, several species-specific databases converted BBCH and other scales into formal ontol-

ogies (controlled vocabularies) to facilitate the annotation of genetic information. For example, the Gramene database (Jaiswal et al., 2006) designed its cereal growth stage ontology based on the stages described in the standard evaluation system for rice (*Oryza sativa*; INGER, 1996) and those described by Counce et al. (2000) for rice, by Zadok et al. (1974) for Triticeae (wheat [*Triticum aestivum*], oat [*Avena sativa*], and barley [*Hordeum vulgare*]), and by Doggett (1988) for sorghum. Except for the sorghum, which is a less studied crop, these species had fairly well-described growth staging vocabularies. MaizeGDB (Lawrence et al., 2005) developed a very extensive controlled vocabulary from a modified version of that described by Ritchie et al. (1993). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR; Rhee et al., 2003) developed the *Arabidopsis* growth stage ontology from the scale described by Boyes et al. (2001). However, ontologies created in these projects remained restricted to particular species or families, whereas comparative genomics requires that a common standard vocabulary be applied to a broad range of species. The uniform BBCH scale (Meier, 1997) appeared to be a suitable model to develop a unified ontology since this scale had already synthesized monocot and eudicot crop stages into a single vocabulary.

The Plant Ontology Consortium (POC) was inaugurated in 2003 for the purpose of developing common ontologies to describe the anatomy, morphology, and growth stages of flowering plants (Jaiswal et al., 2005). Its primary task was to integrate and normalize existing species-specific ontologies or vocabularies that had been developed by several major databases for the purpose of annotating gene expression and mutant phenotype. The plant ontology (PO) is divided into two aspects. The first is the plant structure ontology (PSO), a vocabulary of anatomical terms (K. Ilic, E.A. Kellogg, P. Jaiswal, F. Zapata, P. Stevens, L. Vincent, S. Avraham, L. Reiser, A. Pujar, M.M. Sachs, S. McCouch,

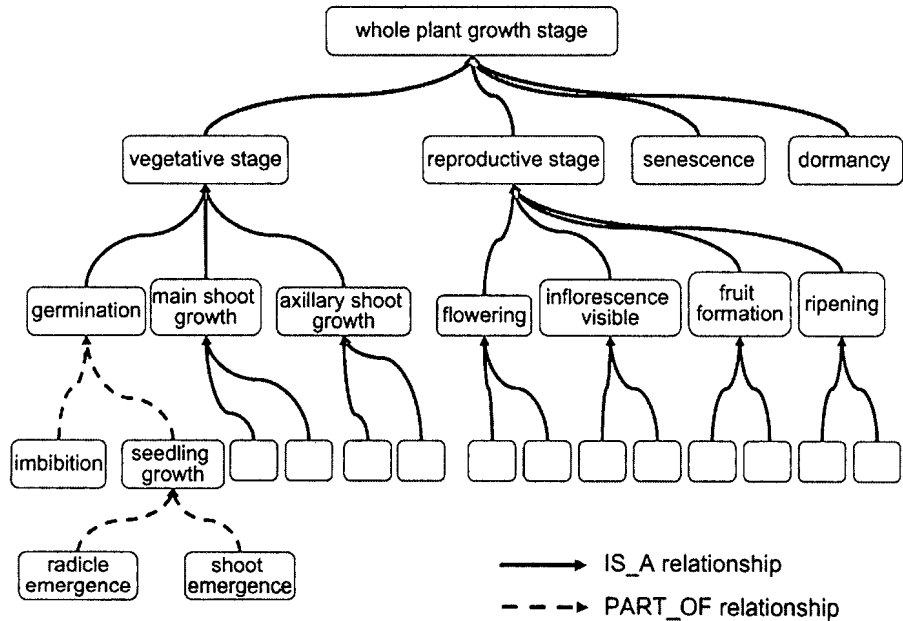


Figure 1. The parent and child term organization in the whole-plant GSO. The solid curved lines joining the terms represent IS_A relationship and the dotted curved lines suggest a PART_OF relationship between the child and the parent terms. A term may or may not have a child term. In this example, germination IS_A vegetative stage and flowering IS_A reproductive stage. Similarly vegetative stage, reproductive stage, senescence, and dormancy are subtypes (IS_A) of whole-plant growth stage. Root emergence and shoot emergence are PART_OF the seedling growth stage. The seedling growth stage and imbibition are PART_OF germination. In this image not all the children terms are shown for every parent term in the GSO.

M. Schaeffer, D. Ware, L. Stein, and S.Y. Rhee, unpublished data), which, since its release to the public domain in 2004, has become widely used by plant genome databases (Jaiswal et al., 2005). The second aspect is the plant growth and developmental stages ontology. This component of PO is further divided into the whole-plant growth stage ontology (GSO) developed by this project and the plant part developmental stages. This article focuses on the whole-plant GSO; we will discuss the history, design, and applications of the GSO and show how it simplifies the description of a continuous and complex series of events in plant development. The plant part developmental stages will be reviewed elsewhere.

RESULTS

The GSO was developed over a period of two years (2004–2006) by a team of plant biologists comprising systematists, molecular biologists, agronomists, plant breeders, and bioinformaticians. We worked to develop a set of terms to describe plant development from germination to senescence that would be valid across a range of morphologically distinct and evolutionarily distant species. Although the rate of addition of new terms to the GSO has slowed since its initial stages of development, it is still under active development as we refine the ontology in response to user input and feedback from database curators.

Currently, the GSO has a total of 112 active terms, each organized hierarchically (Figs. 1 and 2A) and associated with a human-readable definition. Although we started with existing systems such as the BBCH (Meier, 1997) as well as the controlled vocabularies developed for *Arabidopsis* by TAIR, for rice, Triticeae (wheat, oat, and barley), and sorghum by Gramene database, and for maize (*Zea mays*) by MaizeGDB, the current version of GSO is quite distinct from its predecessors. We will first discuss the major design issues we dealt with during the development of the GSO, and then describe the structure of the GSO and its applications to real-world problems. The ontology terms, database, and gene annotation statistics provided here are based on the April, 2006 release of the POC database.

Architecture of the Ontology

We chose to make use of the data model originally developed for the gene ontology (GO) to describe the GSO. This data model uses a directed acyclic graph (DAG) to organize a hierarchy of terms such that the most general terms are located toward the top of the hierarchy while the most specific ones are located at the bottom of the hierarchy (Figs. 1 and 2, A and B). Each parent term has one or more children, and the relationship between a parent and one of its children is named either IS_A to indicate that the child term is a specific type of the parent term, or PART_OF to indicate that the child term is a component of the parent term (Smith, 2004). For example, the reproduc-

tive growth and flowering terms are related by IS_A, because flowering is a type of reproductive growth. On the other hand, seedling growth is related to its children terms radicle emergence and shoot emergence by PART_OF, because seedling growth is comprised of the two processes of radicle emergence and shoot emergence (Figs. 1 and 2A).

Each term is given a unique accession number named PO:XXXXXXX where the series of X's is a seven-digit number (Fig. 2A). Accession numbers are never reused, even when the term is retired or superseded. Obsolete terms are instead moved to a location in the hierarchy underneath a term named *obsolete_growth_and_developmental_stage* (Fig. 2A). This ensures that there is never any confusion about which term an accession number refers to. Each term also has a human-readable name like seedling growth, a paragraph-length definition that describes the criteria for identifying the stage, and citations that attribute the term to a source database, journal article, or an existing staging system. Many terms also have a synonym list; these are described in more detail below.

Our choice of the GO data model was driven by numerous practical considerations, foremost of which was the fact that the data model is supported by a rich set of database schemas, editing tools, annotation systems, and visualization tools.

Naming of Plant Growth Stages

The next issue we dealt with was how to name plant growth stages. Although development in any organism is a continuous process, it is important to have landmarks that identify discrete milestones of the process in a way that is easily reproducible. Extant systems either name growth stages according to a landmark (e.g. three-leaf stage) or by assigning a number or other arbitrary label to each stage. We chose to define growth stages using morphological landmarks that are visible to the naked eye (Counce et al., 2000), because such descriptive terms are more intuitive, self explanatory to the users, and easy to record in an experiment. To minimize differences among species, we were able to describe many growth stages using measurements/landmarks that are in proportion to the fully mature state. For example, the inflorescence stages are described in progression starting from the "inflorescence just visible," "1/4 inflorescence length reached," "1/2 inflorescence length reached," to "full inflorescence length reached." This provides an objective measurement of the degree of maturation of the inflorescence in a way that is not dependent on the absolute value of the inflorescence length.

Synonyms

Because the GSO crosses species and community boundaries, we needed to acknowledge the fact that each community has its own distinct vocabulary for describing plant structures and growth stages. To accommodate this, we made liberal use of the GO data

model's synonym lists, which allow any GSO term to have one or more synonyms from species-specific vocabulary that are considered equivalent to the official term name. The GSO currently contains 997 synonyms taken from several plant species. On an average there are about nine synonyms per GSO term (Table I). Like terms, we attribute synonyms to the database, literature reference, or textbook from which they were derived.

As an example of a synonym, consider "dough stage in wheat" and "kernel ripening in maize," both of which essentially refer to the fruit ripening stage. These terms are included as synonyms to the generic (species-independent) GSO term "ripening" (PO:0007010; http://www.plantontology.org/amigo/go.cgi?view=details&show_associations=terms&search_constraint=terms&depth=0&query=PO:0007010). From the end

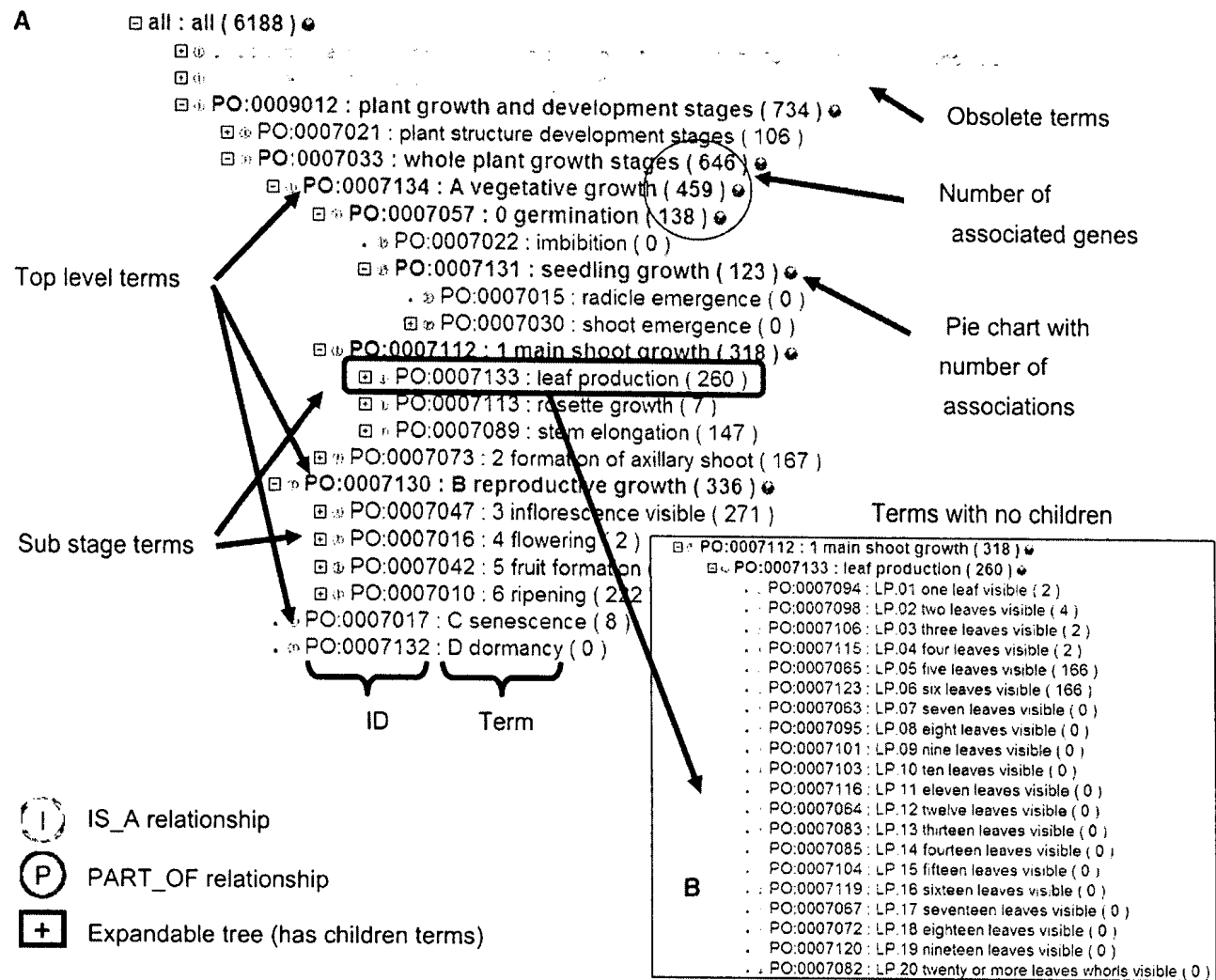


Figure 2. The GSO as seen on the ontology browser available at <http://www.plantontology.org/amigo/go.cgi>. A, For browsing, simply click on the [+] icon before the term name plant growth and developmental stages, and then on the [+] next to whole-plant growth stages (GSO). This will expand the tree by opening the children terms. The PO ID is the term's accession number, and the number followed by the term name is the total number of associations that have been curated to the genes for a given term. This number will change depending on the gene product filter a user may have chosen. Users can also get a pie chart showing the distribution of data associations to a term's children term. In this image, the general level (top level) terms in the GSO are "A_Vegetative growth," "B_Reproductive growth," "C_Senescence," and "D_Dormancy." The substages of "A_Vegetative growth" are "0_Germination," "1_Main Shoot Growth," and "2_Formation of Axillary Shoot," while the substages of "B_Reproductive growth" are "3_Inflorescence Visible," "4_Flowering," "5_Fruit Formation," and "6_Ripening." Neither "C_Senescence" nor "D_Dormancy" currently has substages beneath them. The alphanumeric prefixes serve to make the substages appear in the order in which they occur during the plant's life cycle. If the temporal order is not defined consistently in all plants, the terms may not have these prefixes. The prefixes are usually abbreviations of the term name; for example, LP is for leaf production, SE is for stem elongation. The numerical portion uses double digits starting with 01, 02, and so on. Each of the substages may have more specific stages beneath it. When a term is retired or superseded, it is considered Obsolete. Such terms are moved to a location in the hierarchy underneath a term named "obsolete_growth_and_developmental_stage." B, A detailed view of the substage PO:0007133, "Leaf production" and its children. Children terms up to 20 leaves visible were added to accommodate the growth stage requirements of the maize plant.

Table 1. A summary of the number of synonyms integrated into the GSO from each species/family/source

The integration of synonyms for Soybean and Solanaceae is in progress.

Species/Source	No. of Synonyms
Arabidopsis	93
Rice	23
Maize	162
Wheat	65
Oat	65
Barley	65
Sorghum	13
BBCB and Zadok scales	381
Soybean	79
Solanaceae (mainly tomato)	51
All the species	997
Average no. of synonyms per GSO term	About 9

user’s point of view, the synonyms can be used interchangeably with the generic terms when searching databases that use the PO. This means that data associated with the ripening stage of all plants is accessible even to a naïve user, irrespective of the variable terminology, diverse morphologies, and differing developmental time lines of plants such as wheat and maize.

By using synonyms, we were able to merge 98% of terms from the various species-specific source ontologies into unambiguous generic terms. In a few cases we encountered identical terms that are used by different communities to refer to biologically distinct stages. We resolved such cases by using the *sensu* qualifier to indicate that the term has a species-specific (not generic) meaning. One example of this, described in more detail later, is “inflorescence visible” (to the naked eye) versus “inflorescence visible (*sensu* Poaceae).” In most plants the inflorescence becomes visible to the naked eye soon after it forms, whereas in Poaceae (grasses), the inflorescence only becomes visible much later in its development, after emergence from the flag leaf sheath.

Spatiotemporal Representation

Less satisfactory is the design compromise that we reached to represent the spatial and temporal ordering of terms. The existing plant growth scales are organized by the temporal progression of developmental events. However, the GO data model presents unique challenges in designing an ontology that represents the temporal ordering of terms across multiple species that display small but key variations in that ordering.

In particular, the GO data model does not have a standard mechanism for representing organisms’ developmental time lines. This has forced each organism database that has sought to represent developmental events using the GO model to grapple with the issue of representing a dynamic process in a static representation. Some animal model organism databases, such as WormBase for *Caenorhabditis elegans*, Flybase for *Drosophila*, Zfin for Zebra fish, have developed developmental stage ontologies (OBO, 2005) in which temporal

ordering is represented using either the DERIVED_FROM, DEVELOPS_FROM, or OCCURS_AT_OR_AFTER relationship to indicate that one structure is derived from another or that one stage follows another. However, we found these solutions to be unworkable for the GSO because of the requirement that the ontology must represent growth stages across multiple species. For example, consider the process of main shoot growth. In the wheat plant, main shoot growth may be completed at the nine-leaf stage, while in rice and maize, shoot growth may be completed at the 11- and 20-leaf stages, respectively, and this varies with different cultivars/germplasms (Fig. 3). Transition to the subsequent stage of reproductive growth is thus staggered for each species, and cannot be accurately described by an ontology in which each stage rigidly follows another.

Our compromise is to visually order the display of terms in a temporal and spatial fashion, but not to build this ordering into the structure of the ontology itself. In practice, what we do is add alphabetic and numeric prefixes to each term. When terms are displayed the user interface tools sort them alphabetically so that later stages follow earlier ones (Fig. 2A). This compromise is similar to the one taken by the *Drosophila* developmental stages ontology (Flybase, <http://flybase.org/>; OBO, 2005).

As an example of how this works, we describe the stages of leaf production using terms named “LP.01 one leaf visible,” “LP.02 two leaves visible,” “LP.03 three leaves visible,” and so forth. When displayed using the ontology web browser, the terms appear in their natural order (Fig. 2B). However, there is nothing hard wired into the ontology that indicates that LP.01 one leaf visible precedes LP.02 two leaves visible.

A related issue is the observation that during plant maturation, multiple developmental programs can proceed in parallel. For instance, the processes of leaf production and stem elongation, although coupled, are temporally overlapping and can proceed at different relative rates among species and among cultivars within a species. We represent such processes as independent children of a more generic term. In the case of the previous example, both leaf production and stem elongation are represented as types of main shoot growth using the IS_A relationship (Figs. 1 and 2A).

Description of the Ontology

The four main divisions of the GSO are “A_Vegetative growth,” “B_Reproductive growth,” “C_Senescence,” and “D_Dormancy” (Fig. 2A). As described earlier, the alphabetic prefix is there to force these four divisions to be displayed in the order in which they occur during the plant’s life cycle in general. The substages of “vegetative growth” are “0_Germination,” “1_Main Shoot Growth,” and “2_Formation of Axillary Shoot,” while the substages of “reproductive growth” are “3_Inflorescence Visible,” “4_Flowering,” “5_Fruit Formation,” and “6_Ripening.” Neither “C_Senescence” nor “D_Dormancy” currently

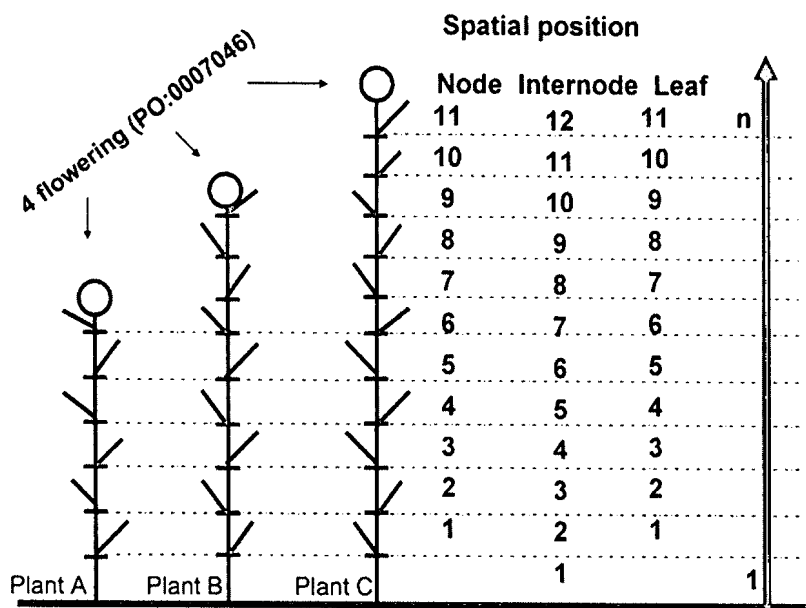


Figure 3. Corresponding growth stages in different plants and advantages of using broad and granular terms for annotations. In this example one can say flowering occurs in plant A at the six-leaf visible stage, in plant B at the nine-leaf visible stage, and in plant C at the 11-leaf visible stage. Plants A to C represent either different germplasm accessions/cultivars of the same species or accessions/cultivars from different species. This nomenclature allows the researcher to record when a gene is expressed or a phenotype is observed by following the gradual progression of the plant's life cycle. For example, if a gene is expressed at the six-leaf or the fifth-internode stage, the meaning is now clear, while in the past, the information had to be recorded as the fifth leaf from the top of the plant. Such annotation required that one wait until the plant completed its life cycle to count the number of leaves from the top, or that one make an assumption how many leaves there would be in the plant/population used in the study. Note: the number of nodes and the number of leaves is always less than the number of internodes by one. The arrow pointing upwards suggests that the numbers are counted in that direction in ascending order starting with 1 and going up to n, where n can be any number depending on the plant.

has substages beneath them. Again, the numeric prefixes are there only to make the substages appear in a logical order. Each of the substages has multiple, more specific stages beneath it.

Although the BBCH scale (Meier, 1997) was the starting point for the GSO, we have diverged from it in many important aspects. A major difference is the number of top-level terms (Figs. 1 and 2A). The BBCH scale has 10 principle stages as its top-level terms, but the GSO only has four. We collapsed four BBCH top-level stages (germination, leaf development, stem elongation, and tillering) into our top-level vegetative growth term, and collapsed another six BBCH top-level terms (booting, inflorescence emergence, flowering, fruit development, and ripening) into reproductive growth. We felt justified in introducing the binning terms vegetative growth and reproductive growth for several reasons; (1) to help annotate genes that act throughout these phases; (2) persistent use in current scientific literature, especially when the specific stage of gene action or expression remains unclear; and (3) they were requested by our scientific reviewers to enhance the immediate utility of the ontology.

We now look in more detail at some of the more important parts of the ontology.

Germination (PO:0007057)

This node in the GSO has eight children that are broadly applicable to seed germination. The stages under "seedling growth" and "shoot emergence" are not given numerical prefixes, as it is not clear which event precedes the other among the various species. Only events of seed germination were considered in this ontology, whereas the BBCH scale equates seed germination with germination of vegetatively propagated annual plants and perennials such as bud sprouting. The two processes are in fact quite distinct in terms of organs developing at this stage, the physiology, and various metabolic processes, and thus we felt that combining them was inappropriate.

Main Shoot Growth (PO:0007112)

This refers to the stage of the plant when the shoot is undergoing rapid growth. It can be assessed in different ways depending on the species and the interests of the biologist. Plants may be equally well described in terms of leaves visible on the main shoot or in terms of the number of nodes detectable (Zadok et al., 1974), and biologists studying *Arabidopsis* commonly assess the size of the rosette. To accommodate existing data

associated to these terms we created three instances of main shoot growth, namely the "leaf production," "rosette growth," and "stem elongation," with a strong recommendation to use "leaf production" wherever possible.

Leaf Production (PO:0007133)

Leaves are produced successively so that the progression through this stage can be measured by counting the number of visible leaves on the plant (Figs. 2B and 3). In any species, leaves are always counted in the same way (Meier, 1997; described in detail later). In plants other than monocotyledons, leaves are counted when they are visibly separated from the terminal bud. The recognition of the associated internode (below) follows the same rule (Fig. 3). Leaves are counted singly unless they are in pairs or whorls visibly separated by an internode, in which case they are counted as pairs or whorls. In taxa with a hypogeal type of germination, the first leaf on the epicotyl is considered to be leaf one and in grasses the coleoptile is leaf one.

In the GSO the stages of leaf production continue up to 20 leaves/pairs/whorls of visible leaves (Fig. 2A), but this can be emended to accommodate higher numbers, as new species are included. This is unlike the BBCH scale (Meier, 1997), where only nine leaves can be counted and all the rest would be annotated to nine leaves or more. This was done to accommodate the leaf development stages of maize, where depending on cultivars the number of leaves can be few as five or have 20 or more leaves. The maize community and the MaizeGDB database (Lawrence et al., 2005) use a modified version of Ritchie's scale (Ritchie et al., 1993) in which the stages of the maize plant are measured solely by counting the leaves from the seedling through the vegetative stages, and the nodes are not counted.

Stem elongation can be assessed by the number of visible nodes; this metric is commonly applied to the Triticeae, for which the Zadok's (Zadok et al., 1974) or BBCH scales (Meier, 1997) were originally developed. Stem elongation begins when the first node becomes detectable. This is usually equivalent to node number seven (the number varies in different cultivars), since earlier nodes are not detectable before elongation commences in the grasses. Boyes et al. (2001) considers *Arabidopsis* rosette growth analogous to stem elongation in the grasses, and uses leaf expansion as the common factor linking the rosette growth and stem elongation stages. In our model, "rosette growth" (PO:0007113) and "stem elongation" (PO:0007089) are treated as separate instances of sibling stages (Figs. 1 and 2A), mainly to provide language continuity for users, rather than for biological reasons.

Reproductive Growth (PO:0007130)

Reproductive growth and its child terms are organized a little differently from vegetative growth. Reproductive growth has four instances: "inflorescence

visible" (PO:0007047), "flowering" (PO:0007026), "fruit formation" (PO:0007042), and "ripening" (PO:0007010; Fig. 2A). The "inflorescence visible (sensu Poaceae)" (PO:0007012) specific to grass family is an instance of the generic term "inflorescence visible" (PO:0007047). This in turn has two instances: "booting" (PO:0007014) and "inflorescence emergence from flag leaf sheath" (PO:0007041). As described earlier, the generic "inflorescence visible" stage is considered separate from "inflorescence visible (sensu Poaceae)," as the former includes all plants where inflorescence formation and visibility coincide, while in members of the Poaceae, many developmental events in the reproductive phase start during the vegetative phase but manifest themselves as visible morphological markers much later.

Other stages are similar in their organization to the existing scales, but as we continue including various species from families Solanaceae and Fabaceae, we anticipate that changes in the organization may be required to accommodate them into the GSO.

User Interface

The GSO terms are in a simple hierarchy that is intuitive to use. The GSO is a relatively small ontology and has a total of 112 terms, excluding the obsolete node. It has four top nodes, 15 interior nodes (terms associated with children terms), and 88 leaf nodes (terms without any children terms; Fig. 2A). New terms are added based on user requests after thorough discussions. A researcher can browse the GSO using the ontology browser available at <http://www.plantontology.org/amigo/go.cgi>. This is a Web-based tool for searching and browsing ontologies and their associations to data. It has been developed by the GO consortium (http://www.geneontology.org/GO.tools.shtml#in_house) and modified to suit our needs. To browse, clicking on the [+] sign in front of the term expands the tree to show children terms (Fig. 2A). This view provides information on the PO identification (ID) of the GSO term, term name, followed by a number of associated data such as genes. For every green-colored parent term a summary of the data associated to its children terms is presented as a pie chart. The user has an option to filter the number of associated data displayed based on species, data sources, and evidence codes. The icons for [i] and [p] suggest the relationship types between the parent and child term as described in the legend. While browsing, a user can click on the term name to get the details at any time (Fig. 4B). The users will see the icon [d] for develops_from relationship type. This relationship type is used strictly in the PSO and not GSO. It suggests that a plant structure develops from another structure (Jaiswal et al., 2005).

In addition to the browse utility, users may search by entering the name of a term or a gene. For example, querying with "germination" results in three terms, of which two are from the GSO section of the plant growth and development stage ontology and one from the PSO. To avoid getting a large list, users may choose

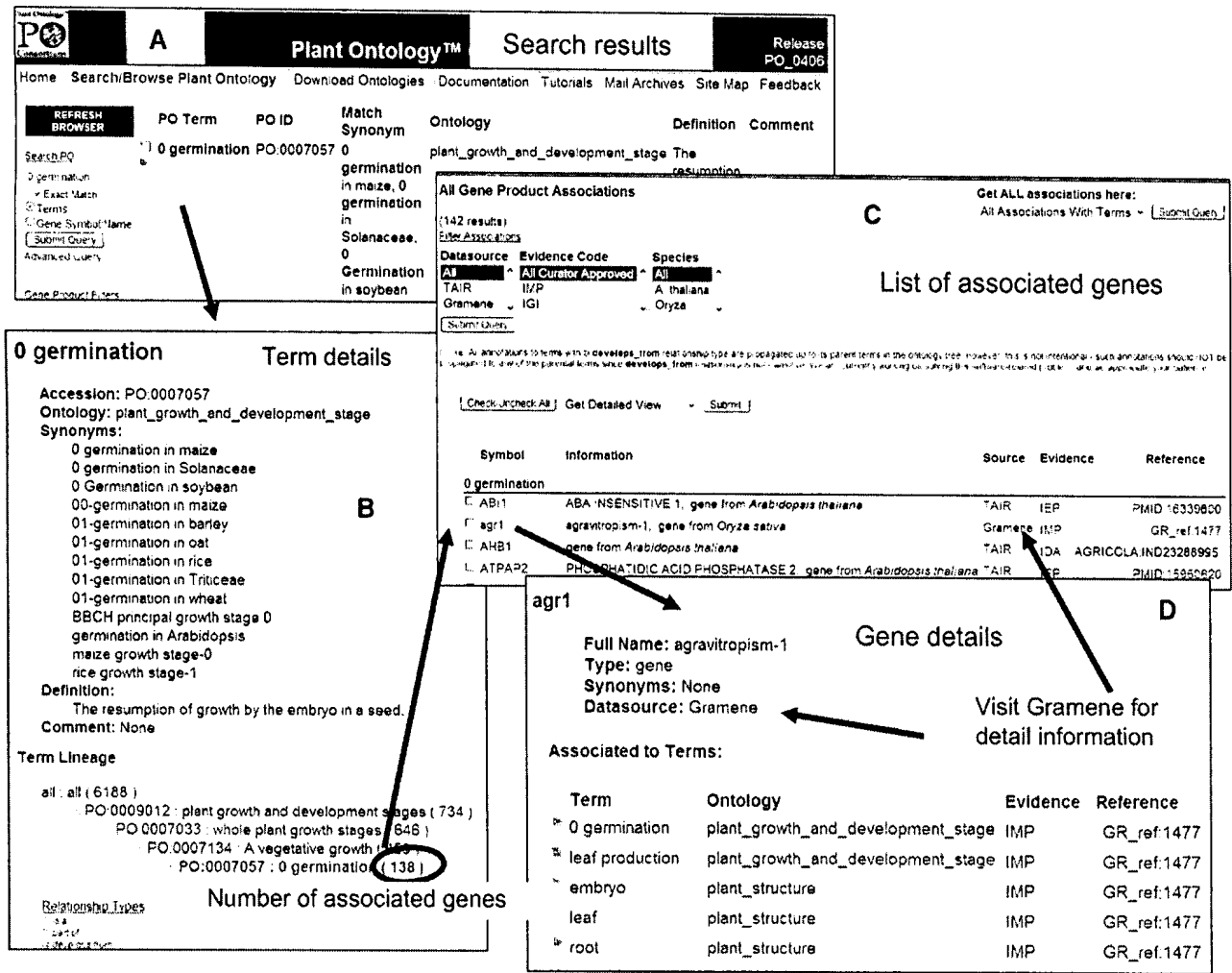


Figure 4. An example of a GSO search using the ontology browser and search Web interface. A, Ontology search results for 0 germination by using the exact match and terms filter. To start searching, visit the www.plantontology.org Web site and click on the “Search and Browse Plant Ontology” link on the page menu. An ontology browser page opens that has a search option on the left-hand side. Type the term name of interest, such as “germination” for a generic search or “0 germination” for an exact match. Select the term filter and submit query. Click on the term name to visit the term detail page or browse the lineage of this term in the ontology by clicking the tree icon next to the check box. B, The term detail page provides information on the term name, accession/ID, synonyms, definition, comments, and associations to genes. C, The list of genes associated to the term are listed in the bottom half of the term detail page. A default list gives all the genes with every type of evidence code and source. The evidence type, species, and source filters can be used to generate the list as desired. The list provides the gene symbol, name, source, evidence, and a citation. The gene symbol links to the gene detail page and the source links to the original record in the contributor’s database (e.g. TAIR/Gramene), the evidence code links to its details and the reference links to the original citation referred to by the contributor for inferring the ontology association to the gene. D, The gene detail page provides information on the symbol, name, synonym, source, a list of all the terms in the GSO and PSO, evidence, and the citations. This view suggests where and when a gene is expressed and/or an associated phenotype is observed.

the exact match option before submitting the query. A search for “0 germination” choosing exact match gives one result (Fig. 4A). A user may browse the parents and children of this term by clicking on the blue-colored tree icon and following the [+] sign next to the term name, which suggests that there are additional terms under this term, or simply clicking on the term name “0 germination” for more details. The term detail page (Fig. 4B) provides information on the ID, aspect ontology (plant structure or growth and development), species-specific synonyms, if any, definition,

external references and links, if any, and the associated data. The association section allows a user to select the source database, species name, and the evidence code (Table II) used to make the annotation to limit the data displayed. For example, there are 138 gene associations to the term “0 germination” (PO:0007057; Fig. 4B). The list of associated data (Fig. 4C) gives information about the name, symbol, type (e.g. gene), the source, and the species, in addition to the evidence used for inferring the association to the term. The gene symbol provides a hyperlink to the gene detail page (Fig. 4D), and the data

44

Table II. List of evidence codes for use in annotations to GSO

These are used in building the annotation inferences that indicate the type of experiment cited by the researcher whose data was used to determine the protein and/or transcript expression and phenotype of mutant(s) or quantitative trait loci.

Evidence Code	Name
IC	Inferred by curator
IDA	Inferred from direct assay
IEA	Inferred from electronic annotation
IEP	Inferred from expression pattern
IMP	Inferred from mutant phenotype
IGI	Inferred from genetic interaction
IPI	Inferred from physical interaction
ISS	Inferred from sequence or structural similarity
NAS	Nontraceable author statement
TAS	Traceable author statement

source links to the same entry on the provider’s Web site. This allows a user to search for extended details that may not be provided in the POC database, such as information on genome location, biochemical characterization, associations to the GOs, etc. For help at any time, users can click on the help menu at the bottom of the browser page or visit the link http://www.plantontology.org/amigo/docs/user_guide/index.html.

Annotations to GSO

Annotation is the process of tagging snippets of information to the genomic element by skilled biologists to extract its biological significance and deepen our understanding of the biological processes (Stein, 2001). The curator attributes the added information to its source by the use of evidence codes (http://www.plantontology.org/docs/otherdocs/evidence_codes.html) indicating the kind of experiment that was carried out to infer the association to a GSO term, such as inferred from expression pattern (IEP) involving northern, western, and/or microarray experiment, or inferred from direct assay (IDA) such as isolated enzyme and/or in situ assays, etc. (Table II). The user interface has query filter options to search for genes annotated with a given type of evidence code. Explicit spatiotemporal information related to the whole plant is extracted from literature by a curator and described using terms from the GSO. The current build of the GSO has over 600 genes associated to it from the TAIR and Gramene databases (Fig. 5A). Analysis of the data at this point may not be entirely reflective of current research in Arabidopsis and rice, as manual curation is a dynamic and evolving process and will necessarily lag behind the actual state of research. In TAIR, about 130 gene associations to whole-plant growth stages carry the evidence code IEP, while in the Gramene database, a majority of GSO annotations (about 480) carry the evidence code inferred from mutant phenotype (IMP) and a smaller number of IEP and inferred by genetic interaction (IGI) associations. A closer look at the number of genes associated to various terms and their

immediate parents (Fig. 5, A and B) reveals that many of these genes with GSO annotations in TAIR are associated to germination stages, which is a vegetative stage. Similarly the vegetative stages, particularly five- to six-leaf stages (children of leaf production) and reproductive stages, namely the inflorescence visible (sensu Poaceae), a child of inflorescence visible, fruit formation, and ripening stages in the rice plant are of particular importance (Fig. 5B). The Solanaceae Genome Network (SGN) has adapted the GSO and has created a mapping file for Solanaceae (tomato [*Lycopersicon esculentum*]) synonyms that is used to associate their data. Tomato mutants are initially being curated to these terms and, predictably, a large number of mutants will be associated to the ripening stages (data not shown). As we continue to solicit data from collaborating databases and annotate using the GSO, we obtain a global view of how data is associated with different stages of plant growth (Fig. 5B).

Application

This section provides examples of genetic analyses that typically use whole-plant ontogeny as a feature of the experimental design and data analysis. It indicates some of the difficulties of extracting spatiotemporal information from the literature and shows the advantages of curating genomic information using the plant ontologies (GSO and PSO), which allow the users to query when and where a gene is assayed, expressed, or its effects become visible during the life cycle of a plant. In addition the PO database supports queries such as what are the genes that are expressed during the germination stage in Arabidopsis and rice or show me all of the phenotypes in the reproductive stages of a rice plant when mutated.

Annotation Examples of Mutant Phenotypes

The primary description of phenotypic data is usually at the whole-plant level and it is rarely a straightforward exercise of term-to-term association for the curator. For example, characterization of dwarf mutants is done in different ways, most often by the leaf or node number that is affected, counted either top down or bottom up; in this system the leaf and the internode below it can be used to define the same stage. This is distinct from node visible stages that are less reliable, as the first node that is visible is a variable number in grasses (Fig. 3).

An example is provided by recording of internode elongation, the main morphological feature that is affected in dwarf plants, is attributed among others to the effect of gibberellin and brassinosteroids (Chory, 1993; Ashikari et al., 1999). Yamamuro et al. (2000) show that brassinosteroid plays important roles in internode elongation in rice and have characterized dwarf mutants based on the specific internode that is affected. In the *dn*-type mutant all the nodes are uniformly affected (the total number of nodes in a

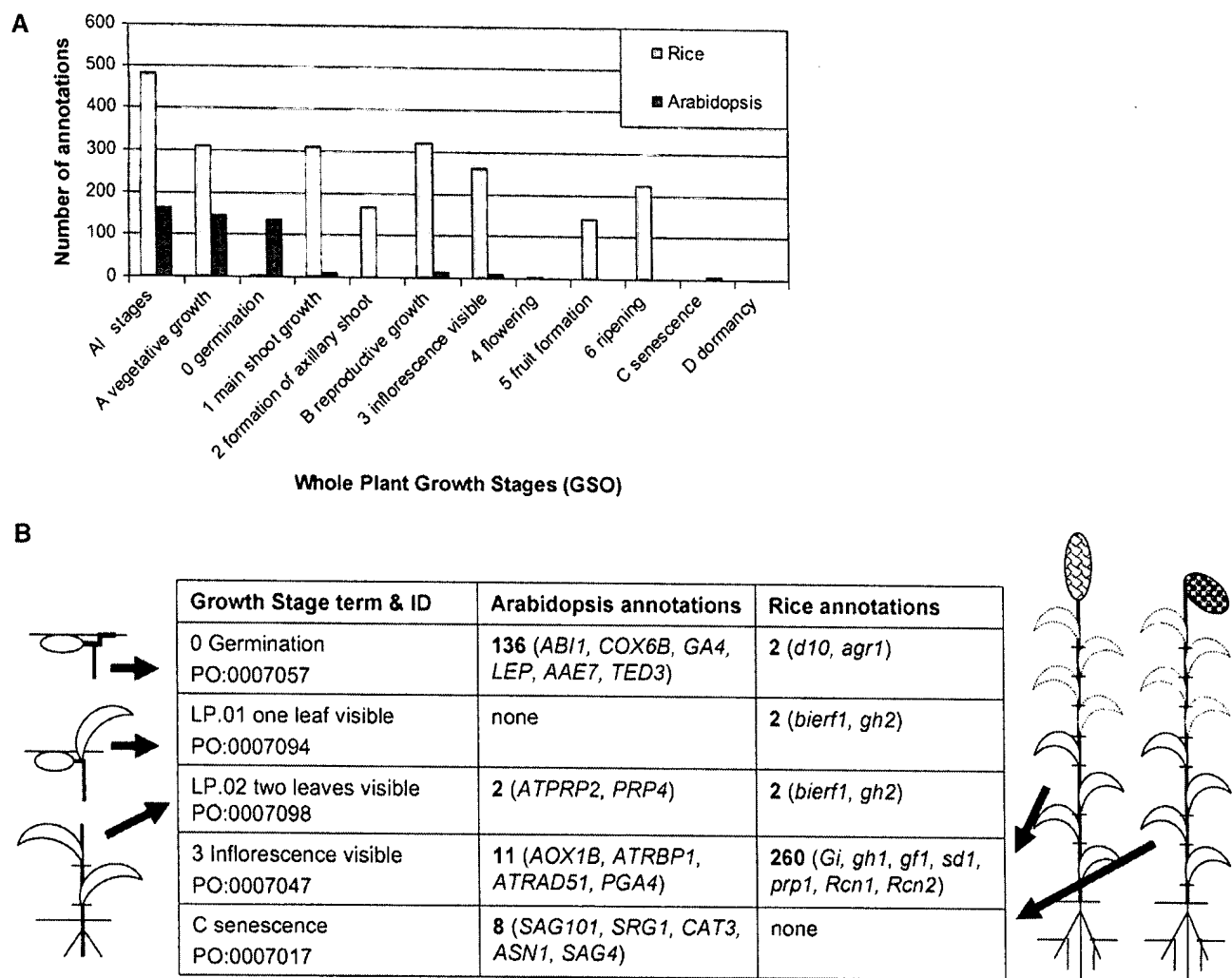


Figure 5. Summary of the Arabidopsis and rice gene annotations to the GSO. A, Growth stage-specific gene annotations from Arabidopsis and rice. The stages prefixed with A to D are the top most categories of the growth stages, namely vegetative, reproductive, senescence, and dormancy. The stages prefixed with 0 to 2 are vegetative substages, and those with 3 to 6 are reproductive substages. All stages means all the GSO terms. B, A list of selected Arabidopsis and rice genes annotated to five specific growth stage terms, suggesting the current state of annotations and not the actual growth stage-specific profile. A similar list can be generated to get growth stage-specific gene expression profiles for a given species. In columns 2 and 3, the numbers (written in bold) appearing before the parentheses are the total number of gene annotations; species-specific genes are written in italics.

given mature rice plant). However, in the *nl*-type mutant, only the fourth internode is affected, while in the case of the *sh*-type mutant, only the first internode is affected. However, in this case, the authors of the study number the internodes from top down (the uppermost internode below the panicle is the first internode). To be consistent with the GSO, these numbers have to be converted to the appropriate leaf/node counting from the base of the shoot (Fig. 3). This has to be achieved by the curator’s personal knowledge of the plant, from legacy information available for the species and germplasm accession, or by contacting the authors. Unlike the above example, generally leaves are counted from below and the curator extracts information from statements such as when the plant is at the three-leaf stage. This permits an immediate visualization of the morphological appearance of the plant

to the researcher and curator as well as the user (Fig. 3). Currently by using the IMP filter, more than 500 genes annotated to different growth stages are available in the PO database.

Cross-Database Comparison of Gene Annotations

Almost all organismal databases are mutually exclusive and provide little or no overlap in their schemas with other databases. Thus they cater to exclusive user communities. To illustrate how the use of ontologies can overcome database interoperability problems, we compare the related processes of flowering time in Arabidopsis and heading date in rice (Fig. 6). The gene network underlying the photoperiodic flowering response involves photoreceptors, circadian clock systems, and floral regulator genes (Yanovsky

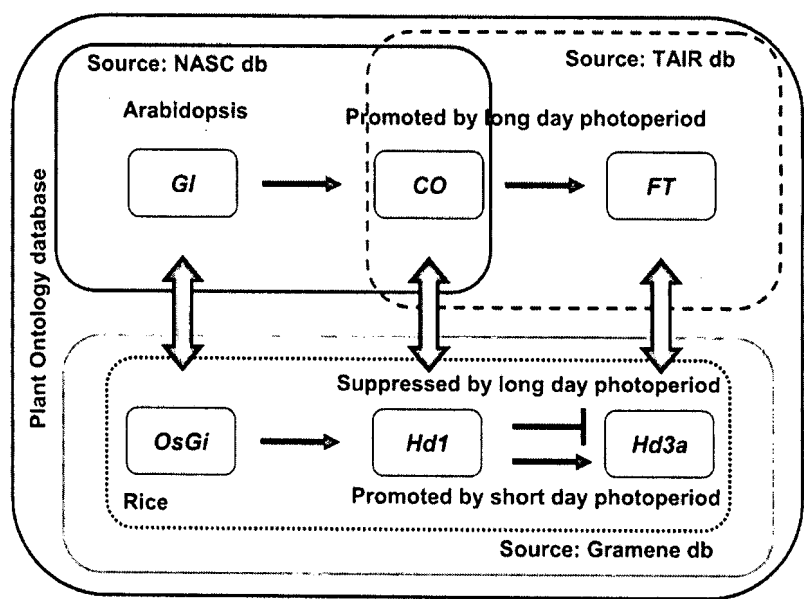


Figure 6. Genes participating in the flowering time pathway. This image illustrates the flowering time pathway genes from Arabidopsis, *GI*, *CO* and *FT*, and rice, *OsGi*, *Se1 (Hd1)*, and *Hd3a*. In the PO database, the annotation for these genes is provided by three databases, the National Arabidopsis Stock Centre, TAIR (for Arabidopsis), and Gramene (for rice). The curators have used terms (Table III) from the whole GSO and PSO to suggest when and where in a plant these genes were expressed or their phenotype was observed. Based on the experiment types (evidence codes) and citation evidences, the databases recorded information about the mutant/gene/gene product to the GSO and the PSO terms. Compared to the short-day length promotion of flowering in rice, flowering is promoted by long-day exposure in Arabidopsis. When rice is exposed to long days, it leads to a down regulation of the *Hd3a* gene by *Se1 (Hd1)*, leading to a delayed transition of the vegetative shoot apical meristem to the reproductive inflorescence meristem. In other words, the growth stage inflorescence visible (sensu Poaceae), which is synonymous with heading stage, is delayed. The double-headed arrows suggest that the Arabidopsis and rice genes are orthologous. The colored boxes around the genes represent the databases that provided the gene annotations. In the PO database, the putative orthology of these genes cannot currently be determined or displayed, but it can be inferred by visiting either the Gramene or the TAIR database.

and Kay, 2002; Izawa et al., 2003; Putterill et al., 2004; Searle and Coupland, 2004). Interestingly, the molecular components that underlie the transition from vegetative to reproductive growth are conserved in Arabidopsis and rice (Hayama and Coupland, 2004; Putterill et al., 2004).

The three key regulatory genes in Arabidopsis are *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)*, and *FLOWERING TIME (FT)*, and in rice they are *Oryza sativa Gigantea (OsGi)*, *Photosensitivity (Se1; synonymous with Heading date 1 [Hd1])*, and *Hd3a* (Hayama et al., 2003; Fig. 6). *GI* is an activator of *CO* (Izawa et al., 2000) and literature provides evidence that the *Se1 (Hd1)* gene from rice is an ortholog of a *CO* family member in Arabidopsis (Putterill et al., 1995; Yano et al., 2000). Furthermore, an allele at the *Hd3a* locus in rice promotes the transition to floral development (Kojima et al., 2002) and it appears to be an ortholog of *FT* (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Thus, the relationship of *OsGi* to *Se1 (Hd1)* and that of *Se1 (Hd1)* to *Hd3a* in rice is similar to *GI*, *CO*, and *FT* in Arabidopsis, despite the fact that Arabidopsis is a long-day plant while rice is a short-day plant (Kojima et al., 2002; Hayama et al., 2003; Fig. 6).

At present all the above genes are available in the PO database, annotated either or to both GSO and PSO terms (Table III). The Arabidopsis databases,

National Arabidopsis Stock Centre and TAIR, have used IMP, IEP, IDA, and traceable author statement (TAS) evidence codes to annotate *GI*, *CO*, and *FT* genes to the exact plant structure where they are expressed. Gramene database has used the IMP and IGI evidence codes to annotate *OsGi*, *Se1 (Hd1)*, and *Hd3a*. For rice the IGI code was used to describe the epistatic interaction between *Se1 (Hd1)* and *Hd3a*. Table III also includes the annotation of the same genes to the GO. Although this information is not provided by the POC database, it can be retrieved by visiting the respective source databases TAIR and Gramene from the gene detail pages. The information on GO annotations further suggests the biochemical roles of these genes and their functional similarity or dissimilarity.

Cross-database querying is often difficult because of the way the stage of plant growth is described or the way a trait or phenotype is assayed and curated in species-specific databases. In Arabidopsis the time of flowering is indicated by the number of rosettes on a plant (Samach et al., 2000), while it is indicated by the number of days between planting (or transplanting) and heading of the primary panicle in rice (Yano et al., 2000). The phenology or growth stage studied in both plants is the same (appearance of reproductive structure), but the annotation typically used to identify

Table III. Annotation of the three orthologous sets of flowering time pathway genes from *Arabidopsis* and rice

The GSO and PSO annotations for *Arabidopsis* *GI*, *CO*, and *FT*, and rice *OsGI*, *Se1* (*Hd1*), and *Hd3a* genes were imported from the PO database. The annotations to GO (columns 4–6) were imported from TAIR and Gramene databases to give an overview on the functional characteristics of the orthologous genes. The curators assigned the ontology terms from the whole growth stage (GSO) and plant structure (PSO) aspect to suggest when and where in a plant these genes were expressed or phenotyped. Depending on the experiment type (evidence code) and citation evidence (references), the databases recorded information about the mutant/gene/gene product to GSO and PSO terms. The same procedure was used for GO annotations. Columns 2 to 6 provide information on the term names, ID, and the evidence code.

Genes	Plant Growth Stage (GSO)	Plant Structure (PSO)	GO: Cellular Component	GO: Molecular Function	GO: Biological Process
Arabidopsis					
<i>GI</i>	Whole plant (PO:0000003; TAS)	Flower (PO:0009046; IMP)	Nucleoplasm (GO:0005654; IDA) and nucleus (GO:0005634; IDA)	Unknown	Response to cold (GO:0009409; IMP), flower development (GO:0009908; TAS), regulation of circadian rhythm (GO:0042752; IMP), positive regulation of long-day photoperiodism, and flowering (GO:0048578; IMP)
<i>CO</i>	Not available	Flower (PO:0009046; IMP)	Nucleus (GO:0005634; NAS)	Transcription factor activity (GO:0003700; ISS)	Regulation of flower development (GO:0009909; IMP)
<i>FT</i>	Not available	Leaf (PO:0009025; TAS) and shoot apex (PO:0000037; IDA)	Unknown	Phosphatidylethanolamine binding (GO:0008429; ISS) and protein binding (GO:0005515; IPI)	Positive regulation of flower development (GO:0009911; IMP)
Rice					
<i>OsGI</i>	Inflorescence emergence from flag leaf sheath (PO:0000003; IMP)	Inflorescence (PO:0009049; IMP)	Nucleus (GO:0005634; IEP)	Unknown	Inflorescence development (GO:0010229; IMP)
<i>Se1</i> (<i>Hd1</i> , <i>F11</i>)	Inflorescence emergence from flag leaf sheath (PO:0007041; IGI, IMP), stem elongation (PO:0007089; IMP), and FR.04 fruit ripening complete (PO:0007038; IMP)	Floret (sensu Poaceae; PO:0006318; IMP), inflorescence (PO:0009049; IGI, IMP), inflorescence meristem (PO:0000230; IMP), and seed (PO:0009010; IMP)	Nucleus (GO:0005634; IEP)	DNA binding (GO:0003677; ISS), transcription factor activity (GO:0003700; ISS), and zinc ion binding (GO:0008270; ISS)	Inflorescence development (GO:0010229; IGI), long-day photoperiodism (GO:0048571; IEP, IGI), and short-day photoperiodism (GO:0048572; IEP, IGI)
<i>Hd3a</i> (<i>F132a</i>)	Inflorescence emergence from flag leaf sheath (PO:0007041; IMP), stem elongation (PO:0007089; IMP), and FR.04 fruit ripening complete (PO:0007038; IMP)	Floret (sensu Poaceae; PO:0006318; IMP), inflorescence (PO:0009049; IMP), inflorescence meristem (PO:0000230; IMP), seed (PO:0009010; IMP), and sporophyte (PO:0009003; IEP)	Unknown	Phosphatidylethanolamine binding (GO:0008429; ISS)	Inflorescence development (GO:0010229; IMP), short-day photoperiodism (GO:0048572; IMP), and regulation of timing of transition from vegetative to reproductive phase (GO:0048510; IMP)

that growth stage is very different. Once generic terminology describing plant phenology/growth stages is agreed upon and consistently utilized in database curation, these kinds of results will become more readily accessible with fewer queries.

Standard Growth Stage Vocabulary in Experimental Description and Design

Associated with the problem of database curation is the problem of data collection in laboratories and research groups, where data related to plant growth stages are typically collected based on chronological age alone such as 5 d after germination, 10 d after flowering, 1-month-old plant, leaf tissue was harvested in the spring of 2005, etc. The widely differing developmental timelines do not allow meaningful comparisons, even among members of the same species, particularly when environmental conditions vary. However, if critical studies can be performed on a few model genotypes from the same species across various environments they can serve as a reference. This kind of data has been described for 24 rice cultivars, including Nipponbare, Azucena, IR36, IR64, Koshihikari, etc. (Yin and Kropff, 1996), for 19 genotypes of maize, including B73, Mo17, hybrid B73xMo17, and 16 additional hybrids (Padilla and Otegui, 2005), and a comparative study including wheat, barley, and maize (McMaster et al., 2005). The overall outcome of all these studies suggested that although genotypes may differ in their growth profiles in terms of growth rate or flowering time as a result of environmental variables (i.e. light, temperature, or water-deficit conditions), the targeted vegetative growth stages recorded by counting the number of leaves almost always followed a predictable pattern for a given genotype. The responses to variables such as increase or decrease of growth rate or stem elongation, versus the leaf numbers, were not interdependent. This further proved that such experiments can be used by researchers to estimate the growth stage profile based on counting the number of leaves and that this estimate of growth stage was independent of the environment as long as the genotype is known. Thus, data collected with reference to a commonly defined series of whole-plant growth stages such as the ones described in the GSO will provide greater coherence and facilitate comparisons between and within species (Boyes et al., 2001).

DISCUSSION

The GSO is meant to link genetic and molecular information along the ontogenetic trajectory of plant growth, from germination to senescence in developmental time and space. Development is the execution of the genetic program for the construction of a given organism. The morphological structure is the product of many hundreds or thousands of genes that must be expressed in an orchestrated fashion to create any given

tissue, body part, or multicellular structure (Davidson, 2001). Development is thus the outcome of a vast network of genes whose expression is regulated both spatially and temporally. Suites of genes are expressed only during specific times during the life cycle of a plant, while other genes are turned on and off intermittently throughout the life cycle. Effective annotation of growth stage-specific gene markers in plant genome databases requires the development and use of ontologies, such as the GSO described here. Many genetic and developmental studies are initially conducted using a specific model system that is rich in genomic resources, but validation of hypotheses often depends on investigation of multiple plant systems (Cullis, 2004). Incorporation of information from multiple sources requires integration and synthesis of data across species and database boundaries. The use of common terminology to describe homologous features in diverse species is the first step. Inclusion of synonyms for growth stages of every plant species offers an effective solution for the immediate term, but may become unwieldy in the future. It is analogous to the approach taken by the WORDNET project that defines words using sets of synonyms and currently covers 150,000 English words (Fellbaum, 1998). We are working with our software developers to provide tools that will categorize synonyms, eventually helping the user community to find the GSO terms that qualify as the growth stage terms for the plant species of their choice and automate the process of identifying derivative synonyms that can be queried in multiple ways. For example, a user may want to query on the terms sixth leaf/six leaves/6 leaves, all of which are derivatives of each other. Improvements in developer's tools will help prevent the ontology from becoming unwieldy and will greatly improve the efficiency of searches.

The GSO will also be valuable in describing high-throughput experimental designs, where plant development is typically analyzed using global patterns of gene expression at defined developmental stages (Schnable et al., 2004). We further anticipate that the design of an experiment is likely to influence the potential to conduct comparative analyses. For example, a problem may arise when a normalized set of tissue samples, e.g. from leaf tissue harvested at the three-, six-, and 10-leaf stages, is used to isolate a protein sample for a proteomics experiment or mRNA for either the microarray experiment or for constructing an expressed sequence tag/cDNA library. Unless each sequence from the library is associated with a particular source tissue and growth stage, it is very difficult to ascertain the actual growth stage at which the mRNA was expressed. Further in the PSO and GSO annotations it is not necessary that one gene is associated with only one plant structure and growth stage description. There can be multiple annotations to accommodate the necessary information about an expression profile, e.g. an expressed sequence tag accession can be expressed in leaf tissue at both the three- and 10-leaf stage but it may not be detected in

the six-leaf stage. Hence, the use of well-defined GSO would be extremely useful to provide a framework for comparing gene expression patterns analyzed at different stages within and across species.

The generic design of the GSO aims to facilitate the process of integrating genomic information from diverse plant systems to deepen our understanding of plant form and function. Adoption of the ontology will contribute to its continued improvement and development and will promote an increasingly global view of plant biology. Members of the POC have used the emerging GSO to annotate genes and phenotypes in plants. As proof of concept, data associations from TAIR and Gramene are already available and users can now search over 600 annotated genes, updated on a monthly basis. The Gramene database (Jaiswal et al., 2006) will display the cereal GSO together with the GSO and eventually retire the cereal GSO, giving transition time for its users to familiarize themselves with the new terms. A similar approach will be taken by TAIR (Rhee et al., 2003), and MaizeGDB (Lawrence et al., 2005) is currently testing their annotations. Initially, emphasis was focused on the core databases but expanding use of the ontology by Soybase collaborators Rex Nelson and Randy Shoemaker and SGN collaborators Naama Menda and Lukas Mueller highlights its utility for comparative genomics. Soybase has adapted the GSO for description of soybean (*Glycine max*) data. SGN adapted the GSO for taxonomic family-wide description of Solanaceous plants and is currently testing it for tomato mutant description. In subsequent releases associations to maize and tomato will become available in the PO database, followed by soybean.

As our understanding of the gene networks and underlying molecular details regarding the origin and diversification of complex pathways such as flowering time grows, a challenge is presented to test the ability to place this knowledge into a framework that can accommodate the information as it emerges and place it into an appropriate comparative context. Similarly our current understanding of genetics and evolution in plants raises many questions about orthology, paralogy, and coorthology in diverse species (Malcomber et al., 2006). The functional relationships among these genes and gene families will be reflected in databases that annotate such information using precise morphological terms from the GSO and the PSO. The effective use of controlled vocabularies also helps identify problems and gaps in knowledge related to the curation of genes in different species where the evolutionary relationships are not entirely clear. Drawing from the experience of its core databases, the POC in the future will address the above issues by preparing and sharing annotation standards that can be used by other member databases to the benefit of the larger plant science community.

The current GSO design is based on annual plants, therefore discussions are underway with collaborators representing the poplar (*Populus* spp.) and citrus research communities to expand it to include perennials.

We also hope that future software developments will allow us to hard wire temporal relationships into the ontology. We encourage databases and individual researchers to contact us if they are suggesting new terms, modification of existing definition(s), term-to-term relationships, or even interested in joining the POC by contributing the associations to their genes and mutant phenotypes by writing an e-mail to po-dev@plantontology.org. More information about joining POC can be found online (<http://www.plantontology.org/docs/otherdocs/charter.html>).

MATERIALS AND METHODS

Ontology Development

Biologists from University of Missouri at St. Louis and Missouri Botanical Gardens, and curators from the TAIR, MaizeGDB, and Gramene databases worked together to evaluate growth and development in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), maize (*Zea mays*), and rice (*Oryza sativa*), examining the vocabularies and models used to describe the whole-plant growth stages in each species. Growth stages of *Arabidopsis* were described by Boyes et al. (2001) based on the BBCH scale (Meier, 1997) that includes both monocot and nonmonocot species. The BBCH scale in turn is based on the Zadok scale, developed for Triticeae (Zadok et al., 1974), which forms one of the literature bases for the cereal GSO developed by Gramene database (Jaiswal et al., 2006). Rice terminology was derived from INGER (1996), for Triticeae from Zadok et al. (1974) and Haun (1973), and for sorghum from Doggett (1988). MaizeGDB (Lawrence et al., 2005) derives its growth stage vocabulary from a modified version of Ritchie's scale (Ritchie et al., 1993). The vocabulary developed by MaizeGDB was integrated into cereal GSO in the Gramene database as well. With these preexisting interconnections in the core databases, we were able to begin synthesizing them into a generic ontology. Similar growth stage concepts for the above species were identified and mapped to the generic growth stages and stored in mapping files. The mapping files are available at <http://brebiou.cshl.edu/viewcvs/Poc/mapping2po/>. More details about the project and ontology development is available on the documentation section of the PO Web site (<http://www.plantontology.org/docs/docs.html>).

Review of Ontology

All aspects of the ontologies developed by the POC, including the GSO, are a collaborative effort and involve evaluation and assessment by numerous external experts. Before each ontology is released to the public, the POC's internal board of senior editors provides critical assessments and offers suggestions for substantive changes that are thoroughly discussed and incorporated into a revised version of the ontologies. The revised ontologies are then released to database curators and developers, who check for inconsistencies and provide critical feedback about problems and/or advantages associated with use of the new ontologies. In the final phase, the ontologies are subjected to review (<http://www.plantontology.org/docs/growth/growth.html>) by an external panel of experts. Over 15 outside scientists with expertise in the growth and development of diverse plant species have provided valuable input to the development of this ontology (http://www.plantontology.org/docs/otherdocs/acknowledgment_list.html).

Ontology Editing Tools and Web Interface

The plant ontologies are built and maintained using the DAG editor (DAG-edit) developed by the GO software group. It is open source software implemented in Java and installed locally; flat files are used to store the ontologies. DAG-edit permits creating and deleting new terms, and adding synonyms in categories such as exact, broad, narrow, or related synonyms. This software also supports a user-defined plug in for reading, saving, importing, and exporting (Harris et al., 2004; http://sourceforge.net/project/showfiles.php?group_id=36855). The ontologies are shown using a tree structure. As the GSO is a relatively small ontology, the DAG-edit shows a good overview of the expanded tree in one window. The tool DAG-edit was superseded by the Open Biomedical Ontology Editor (OBO-edit) in its recent

release by the GO software group. The same will be used in the future development and maintenance of the GSO.

The PO uses the Amigo ontology browser as the Web interface for searching and displaying the ontologies (Fig. 4). Querying can be done using term names, numerical identifier, synonyms, or definitions. The associated annotations to terms from all the represented databases can be viewed on the term detail page (Jaiswal et al., 2005).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Rex Nelson and Randy Shoemaker from Soybase and Naama Menda and Lukas Mueller of SGN for their participation in development and mapping of Soybean and Solanaceae terms to the GSO. We thank numerous researchers for reviewing the GSO and they are listed online (http://www.plantontology.org/docs/otherdocs/acknowledgment_list.html). We apologize to the countless scientists and farmers whose observations on growth stages and plant development were not incorporated into this manuscript for lack of space. We acknowledge the Gene Ontology Consortium for software support. We thank Drs. Dean Ravenscroft and Junjian Ni of Gramene database for reviewing the manuscript.

Received June 23, 2006; accepted July 28, 2006; published August 25, 2006.

LITERATURE CITED

Ashikari M, Wu J, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A (1999) Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10284–10289

Bard JB, Rhee SY (2004) Ontologies in biology: design, applications and future challenges. *Nat Rev Genet* **5**: 213–222

Boyce BC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Górlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499–1510

Chory J (1993) Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet* **9**: 167–172

Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Sci* **40**: 436–443

Cullis CA (2004) *Plant Genomics and Proteomics*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ

Davidson HE (2001) *Genomic Regulatory Systems*, Ed 1. Academic Press, San Diego

Doggett H (1988) *Sorghum*, Ed 2. John Wiley & Sons, New York

Fellbaum C (1998) *WordNet: An Electronic Lexical Database*. MIT Press, Cambridge, MA

Gopalacharyulu PV, Lindfors E, Bounsaythip C, Kivioja T, Yetukuri L, Hollmen J, Oresic M (2005) Data integration and visualization system for enabling conceptual biology. *Bioinformatics (Suppl 1)* **21**: i177–i185

Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, et al (2004) The gene ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* **32**: D258–D261

Haun JR (1973) Visual quantification of wheat development. *Agron J* **65**: 116–119

Hayama R, Coupland G (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **135**: 677–684

Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**: 719–722

INGER (1996) *Standard Evaluation System for RICE*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp 1–52

Izawa T, Oikawa T, Tokutomi S, Okuno K, Shimamoto K (2000) Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J* **22**: 391–399

Izawa T, Takahashi Y, Yano M (2003) Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 113–120

Jaiswal P, Avraham S, Ilic K, Kellogg EA, Pujar A, Reiser L, Seung RY, Sachs MM, Schaeffer M, Stein L, et al (2005) Plant ontology (PO): a

controlled vocabulary of plant structures and growth stages. *Comp Funct Genomics* **6**: 388–397

Jaiswal P, Ni J, Yap I, Ware D, Spooner W, Youens-Clark K, Ren L, Liang C, Zhao W, Ratnapu K, et al (2006) Gramene: a bird’s eye view of cereal genomes. *Nucleic Acids Res* **34**: D717–D723

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**: 1962–1965

Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960–1962

Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002) Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**: 1096–1105

Lawrence CJ, Seigfried TE, Brendel V (2005) The maize genetics and genomics database: the community resource for access to diverse maize data. *Plant Physiol* **138**: 55–58

Malcomber ST, Preston JC, Reinheimer R, Kossuth J, Kellogg EA (2006) Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Adv Bot Res* **44**: 423–479

McMaster GS, Wilhelm WW, Frank AB (2005) Developmental sequences for simulating crop phenology for water-limiting conditions. *Aust J Agric Res* **56**: 1277–1288

Meier U (1997) *Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants* (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie [BBCH]-Monograph). Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

OBO (2005) *Open Biological Ontologies*. <http://obo.sourceforge.net/> (June 1, 2006)

Padilla JM, Otegui ME (2005) Co-ordination between leaf initiation and leaf appearance in field-grown maize (*Zea mays*): genotypic differences in response of rates to temperature. *Ann Bot (Lond)* **96**: 997–1007

Putterill J, Laurie R, Macknight R (2004) It’s time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**: 363–373

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995) The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847–857

Rhee SY, Beavis W, Berardini TZ, Chen G, Dixon D, Doyle A, Garcia-Hernandez M, Huala E, Lander G, Montoya M, et al (2003) The Arabidopsis information resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res* **31**: 224–228

Ritchie SW, Hanway JJ, Benson GO (1993) *How a Corn Plant Develops*. CES Special Report No. 48. Iowa State University, Ames, IA, p 21

Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* **288**: 1613–1616

Schnable PS, Hochholdinger F, Nakazono M (2004) Global expression profiling applied to plant development. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 50–56

Searle I, Coupland G (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* **23**: 1217–1222

Smith B (2004) Beyond Concepts: Ontology as Reality Representation. *In* AVaL Vieu, ed, *International Conference on Formal Ontology and Information Systems*. Proceedings of FOIS 2004, Turin, Italy

Stein L (2001) Genome annotation: from sequence to biology. *Nat Rev Genet* **2**: 493–503

Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2000) Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**: 1591–1606

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, et al (2000) Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. *Plant Cell* **12**: 2473–2484

Yanovsky MJ, Kay SA (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature* **419**: 308–312

Yin X, Kropff MJ (1996) The effect of temperature on leaf appearance in rice. *Ann Bot (Lond)* **77**: 215–221

Zadok JC, Chang TT, Konzak FC (1974) A decimal code for growth stages of cereals. *Weed Res* **14**: 415–421