



No. 13-256727- -00000-0000

Fecha: 2013-10-29 17:47:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 32

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____
COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA MITIGACIÓN DE ESTRÉS EN PLANTAS

54. **TITULO** _____

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** *STOLLER ENTERPRISES, INC.* _____

DOMICILIO *HOUSTON, TX, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA* _____

74. **APODERADO** *JUAN PABLO CADENA SARMIENTO* _____

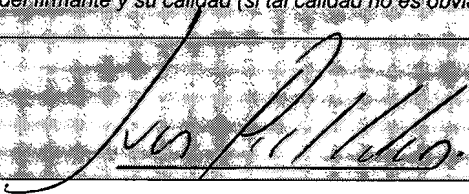
22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-256727- -00000-0000 Fecha: 2013-10-29 17:47:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 32
---	--

AS. 126.271

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/030981	Fecha 28.03.2012
Publicación Internacional No.		WO 2012/135366	Fecha 04.10.2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA MITIGACIÓN DE ESTRÉS EN PLANTAS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1. STOLLER ENTERPRISES, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		4001 W. Sam Houston Parkway North, Suite 100, No. 77043	TELEFONO
CIUDAD		Houston	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		TX	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		US	US
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. STOLLER		Jerry	US
2. LIPTAY		Albert	US
3. SALZMAN		Ronald	US
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1. US		TX	Houston
2. US		TX	Houston
3. US		TX	College Station
			DIRECCIÓN
			11907 Churchill Ct., 77024
			12406 Lakeshore Ridge, 77041
			11066 Stillwater Road, 77845
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. US		US	61/469,044
2. US		US	13/429,414
3.			
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2011/03/29
			2012/03/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-101388, 13-86268	Fecha: 29.10.2013
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 4-19		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 16		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 24		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☒ Otros, especificar: IPRP	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 October 2012 (04.10.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/135366 A1

- (51) International Patent Classification:
A01N 33/00 (2006.01) A01N 43/713 (2006.01)
A01N 33/06 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/030981
- (22) International Filing Date:
28 March 2012 (28.03.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/469,044 29 March 2011 (29.03.2011) US
13/429,414 23 March 2012 (23.03.2012) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
STOLLER ENTERPRISES, INC. [US/US]; 4001 W.
Sam Houston PKWY N., Suite 100, Houston, TX 77043
(US).
- (72) Inventors: STOLLER, Jerry; 11907 Churchill Ct., Hous-
ton, TX 77024 (US). LIPTAY, Albert; 12406 Lakeshore
Ridge, Houston, TX 77041 (US). SALZMAN, Robert;
11066 Stillwater Road, College Station, TX 77845 (US).
- (74) Agents: BUSH, Gary, L. et al.; ANDREWS KURTH
LLP, 600 Travis, Suite 4200, Houston, TX 77002 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

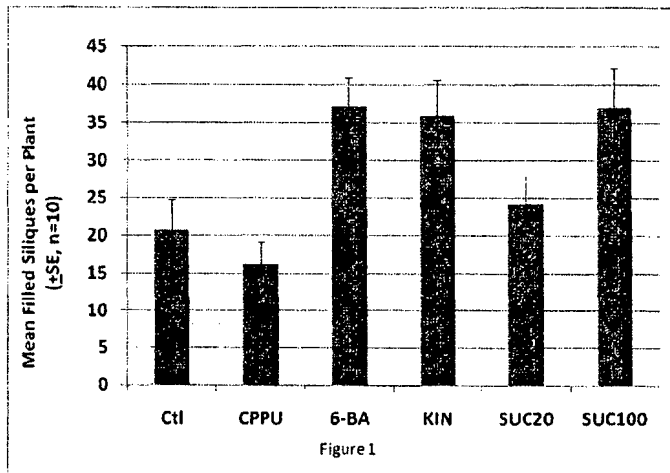
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR STRESS MITIGATION IN PLANTS



(57) Abstract: A composition and method to mitigate plant autophagy and/or apoptosis of newly developing cells in plants grown under environmentally stressful growing conditions, such as high temperature. Exogenous application of a cytokinin, preferably kin-
etin, to either the roots or the foliage (i.e., flowers and leaves) of plants has been discovered to overcome, or at least substantially
mitigate, autophagy when applied during or just prior to flowering. Experimental results indicate that high temperature-induced
autophagy, and subsequent new cell apoptosis, is the result of a deficiency of cytokinin in the plant tissues. The application of low
concentrations of potassium together with the cytokinin appears to provide a synergistic effect by amplifying the effect of the cy-
tokinin to lessen autophagy and increase crop productivity.

WO 2012/135366 A1

COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA MITIGACIÓN DE ESTRÉS EN PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere generalmente a un método y composición para mitigar la autofagia de plantas o la degradación de las células de plantas más viejas para suministrar nutrientes a las células de plantas recientemente formadas deficientes, lo cual puede ocurrir durante el desarrollo (por ejemplo, floración) de nuevas células de plantas bajo condiciones estresantes, tales como altas temperaturas. Además, esta invención se refiere al desarrollo mejorado de semillas, y en consecuencia, el rendimiento incrementado de granos cosechables de plantas, incluyendo plantas de cultivo, que experimentan condiciones de crecimiento ambientalmente estresantes durante el desarrollo y crecimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Tradicionalmente, los fertilizantes minerales se han aplicado predominantemente a plantas de cultivo en crecimiento. Las dificultades surgen, sin embargo, cuando el estrés externo impide el desarrollo exitoso de la planta, especialmente de cultivos de granos o semillas y/u otros cultivos. El estrés físico, tal como los causados por las temperaturas ambientales es ya sea demasiado bajo o demasiado alto, y en particular las altas temperaturas, son especialmente problemáticas. Además, la práctica agronómica del estado del arte no emplea reguladores del crecimiento de plantas para superar una dificultad de la planta, debido a tal estrés, en la producción de cantidades suficientes de nutrientes, por ejemplo, azúcares, para prevenir la autofagia (es decir, canibalismo de las células de plantas previamente formadas por células recientemente formadas para compensar una escasez de nutrientes de células). Es bien sabido que los fertilizantes minerales proporcionan dieciséis minerales que son necesarios para el crecimiento y desarrollo del cultivo. Es sabido que las moléculas de señalización, tales como reguladores de crecimiento de plantas u otras moléculas, mejoran la productividad del cultivo mediante la expresión de ciertos genes. Además, se ha llevado a cabo mucha investigación en el uso de reguladores del crecimiento de plantas y sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo de plantas. Sin embargo, hasta la descripción de la invención aquí, no se ha sabido que la aplicación de ciertas "moléculas de señalización" mejore la productividad de las plantas mitigando la autofagia de plantas causada por estrés ambiental, tales como altas temperaturas de crecimiento.

Considerando la completa cantidad de investigación en técnicas y composiciones para mejorar la producción de alimentos así como también la necesidad continua de mayor producción de alimentos para alimentar una población humana exponencial en crecimiento, hay una necesidad largamente anhelada y no cumplida de métodos y composiciones mejorados para mejorar las productividades de plantas, especialmente en vista de temperaturas ambientales más altas y otras condiciones de crecimiento más severas.

IDENTIFICACIÓN DE OBJETOS DE LA INVENCION

Un objeto de la invención es realizar uno o más de los siguientes:

Proporcionar un método y composición para mejorar la productividad y crecimiento de plantas de cultivo;

Proporcionar un método y composición para mejorar la productividad y crecimiento de plantas de cultivo que crecen bajo estrés ambiental severo;

Proporcionar un método y composición para mejorar la productividad y crecimiento de plantas que crecen bajo condiciones de alta temperatura;

Proporcionar un método y composición para incrementar la síntesis de nutrientes por las plantas;

Proporcionar un método y composición para mitigar la autofagia y/o apoptosis de plantas;

Proporcionar un método y composición para mejorar la productividad y crecimiento de cultivo durante las etapas vegetativas del crecimiento de cultivo, previo a las etapas reproductivas del crecimiento de cultivo;

Proporcionar un método y composición para mejorar el tamaño de semilla de cultivos de grano, y por lo tanto el rendimiento de cultivo, bajo estrés de alta temperatura incrementando la disponibilidad del agua para el dimensionamiento del grano; y

Proporcionar un método y composición para mejorar el tamaño de semilla de cultivos de grano y por lo tanto el rendimiento de cultivo bajo estrés de alta temperatura incrementando la disponibilidad de agua para el dimensionamiento del grano.

Otros objetos, características, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente especificación y figuras para un experto en el arte.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los objetos identificados anteriormente, junto con otras características y ventajas de la invención se incorporan en un método y composición para plantas en crecimiento, especialmente plantas de cultivo, para que sean más productivas y/o resilientes a las condiciones de crecimiento estresantes, tal como alta temperatura. Cuando las temperaturas de crecimiento son demasiado altas, se sabe que se compromete el desarrollo de flores y embriones subsecuentes (semillas), con el resultado concomitante que la productividad de los granos de cultivo u otros tipos de cosechas agronómicas se deterioran y los rendimientos del cultivo se pueden disminuir drásticamente. Bajo condiciones de crecimiento extremas, tales como altas temperaturas, las plantas experimentan una incapacidad para producir los nutrientes, tales como azúcares, necesarios para llevar a cabo los procesos anabólicos normales (es decir, desarrollo de flor y embrión/semilla). Para compensar esta escasez de nutrientes, las plantas que crecen bajo estas condiciones de estrés típicamente sufren autofagia, o auto-canibalismo, para asegurar los nutrientes necesarios a las células recientemente formadas.

La aplicación exógena a la canopia de la planta (es decir, hojas y flores) de la citoquinina de hormona/regulador de crecimiento de la planta se ha descubierto que previene tal autofagia induciendo la producción necesaria de suficientes nutrientes (es decir, azúcares) para el crecimiento de nuevas células de plantas (es decir, desarrollo exitoso y completo de las semillas). Se piensa que los genes que controlan los niveles incrementados de fotosintatos (es decir, productores de azúcar/energía de la planta) se activan por la aplicación exógena de citoquinina. Adicionalmente, la aplicación de bajas concentraciones de potasio junto con la citoquinina se ha encontrado que incrementa sustancialmente el efecto de la citoquinina. Tales resultados son inesperados con tales bajas concentraciones de potasio, debido a que difieren de los efectos fisiológicos normalmente atribuidos a mayores velocidades de aplicación de potasio grado fertilizante. Se piensa que la aplicación de bajas concentraciones de potasio actúa muy similar a otras moléculas de señalización (por ejemplo, hormonas) en la estimulación de transcripción de genes particulares, tales como los genes que expresan efectos de citoquinina, o proporcionan un nivel mejorado de energía o mejoran otras hormonas que tienen un efecto los rendimientos incrementados tales como ácido abscísico o sensibilidad al mismo. La sinergia de la aplicación de bajas concentraciones de potasio y citoquinina a plantas en crecimiento también se puede realizar bajo condiciones de crecimiento de menor estrés.

La composición descrita y su método de aplicación representa un procedimiento práctico para mitigar la autofagia de plantas, y cualquier consiguiente apoptosis, que resulta de las condiciones de crecimiento de planta estresantes, tales como altas temperaturas. El método preferiblemente incluye la aplicación de una hormona de planta, principalmente una citoquinina, al follaje y/o flores de plantas en o aproximadamente el momento del comienzo del florecimiento de la planta (por ejemplo, durante la meiosis y cuando el polen está a punto de entrar en la dehiscencia. Este agente inhibidor de autofagia preferiblemente es la citoquinina, quinetina, sin embargo, otras formas de citoquinina también se pueden usar de manera singular o en combinación, tal como zeatina, varias formas de zeatina, N6-bencil adenina, N6-(delta-2-isopentil)adenina, 1,3-difenil urea, tidiazuron, CPPU (forclorfenuron) u otras formulaciones químicas con actividad similar a citoquinina. Preferiblemente, pero opcionalmente, una baja concentración de potasio también se aplica junto con la hormona de planta para mejorar los efectos de la hormona de planta como se describió previamente.

En una primera etapa, la hormona de planta citoquinina es preparada para la aplicación a las plantas a ser tratadas. La hormona de planta citoquinina preferiblemente se aplica a las plantas como una solución acuosa. Por lo tanto, la preparación de la hormona de planta citoquinina puede incluir una o más de las siguientes actividades: diluir la hormona de planta citoquinina en suficiente agua para crear la concentración deseada de citoquinina en la mezcla/composición aplicada, agregar bajas concentraciones de potasio a la mezcla/composición de hormona de planta citoquinina para mejorar los efectos de la citoquinina aplicada, cargar la hormona de planta citoquinina con o sin potasio (o una mezcla acuosa del mismo) en un rociador o tanque para la subsecuente aplicación a las plantas a ser tratadas, calibrar el rociador o aplicador de dosificación para medir la cantidad deseada de la mezcla de hormona de planta citoquinina a las plantas a ser tratadas y transportar la hormona de planta citoquinina con o sin potasio (o una mezcla acuosa del mismo) a la ubicación de las plantas a ser tratadas.

Preferiblemente, la concentración de citoquinina en una solución acuosa no diluida varía desde aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.10%. Una solución de citoquinina no diluida comercialmente disponible, X-Cyte (un producto de Stoller USA, Houston, Texas), suministra la concentración de citoquinina preferida de aproximadamente 0.04%. A la concentración de citoquinina preferida, la solución acuosa no diluida de citoquinina se aplica en una

segunda etapa a las plantas a ser tratadas a la velocidad de entre aproximadamente 1/4 a 4 pintas (0.4 l a 2.27 l) de solución por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento y más preferiblemente entre 1 a 2 pintas (0.57 a 1.14 l) de solución por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento. Tal aplicación iguala una velocidad de entre aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.76 gramos de citoquinina por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento (diluida en 60 galones (272.7 l) de agua por acre (0.4 hectáreas)), y más preferiblemente, a una velocidad de entre aproximadamente 0.19 a aproximadamente 0.38 gramos de citoquinina por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento (diluida en 60 galones (272.7 l) de agua por acre (0.4 hectáreas)). El potasio, si se aplica con la citoquinina, preferiblemente se aplica a concentraciones muy bajas. Las velocidades de aplicación de potasio preferiblemente están entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) por acre (0.4 hectáreas), más preferiblemente entre aproximadamente 1/2 lb (0.22 kg) a aproximadamente 1 1/2 lbs (0.68 kg) por acre (0.4 hectáreas), y muy preferiblemente aproximadamente 1 lb (.454 kg) por acre (0.4 hectáreas). La citoquinina y/o potasio se pueden aplicar ya sea a las hojas, como se estableció anteriormente, o al suelo a las mismas concentraciones. Se puede aplicar al suelo en cualquier manera apropiada, tal como, por ejemplo, en un surco abierto cerca de las raíces de la planta, el surco se puede cerrar subsecuentemente. También se puede aplicar con varias formas de riego, tal como cinta de goteo o aspersión, o riego por surcos, entre otros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Por vía de ilustración y no limitación, la invención se describe en detalle después sobre la base de las figuras acompañantes, en las cuales:

La Figura 1 es un histograma de resultados experimentales que prueban si el desarrollo deteriorado de semillas/silicua bajo condiciones de crecimiento de alta temperatura es causado por una insuficiencia de nutrientes/azúcar, lo cual puede incitar la apoptosis de células de plantas recientemente formadas vía autofagia; y

La Figura 2 es un histograma de datos experimentales que verifica los resultados obtenidos en la Figura 1, principalmente que la reducción de rendimiento a alta temperatura, causada por la autofagia, principalmente es debido a una insuficiencia de la hormona/regulador de crecimiento de planta, citoquinina.

DESCRIPCIÓN DE LAS IMPLEMENTACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Una implementación preferida de la invención dirige una o más de las deficiencias del arte previo e incorpora al menos uno de los objetos previamente identificados. La invención emplea un regulador de crecimiento de plantas, preferiblemente una citoquinina, la cual cuando se aplica apropiadamente a las plantas se ha descubierto que mejora la síntesis y transferencia de suficientes nutrientes, tales como azúcares, para el crecimiento y desarrollo de las partes reproductivas (por ejemplo, en particular, el polen) de plantas que crecieron bajo condiciones estresantes, tal como altas temperaturas. Para los propósitos de esta invención, las altas temperaturas de crecimiento incluyen temperaturas de crecimiento arriba de aproximadamente 25 grados Celsius (77 grados Fahrenheit), pero más comúnmente temperaturas de crecimiento arriba de aproximadamente 30 grados Celsius (86 grados Fahrenheit). Aún una temperatura mayor de aproximadamente 20 grados Celsius (68 grados Fahrenheit) se puede considerar una "alta" temperatura, dependiendo del tipo de planta (por ejemplo, cebada, trigo y centeno) y/o localidad (por ejemplo, distancia desde los polos de la tierra). Se ha encontrado que tales altas temperaturas comprometen la productividad de la planta de cultivo. Esto se piensa que es el resultado de la reducción de hormonas de plantas citoquinina en la planta debido a las altas temperaturas.

Una reducción en el nivel de citoquinina en los tejidos de plantas incita la autofagia – auto-canibalismo – de tejidos de plantas saludables para proporcionar los nutrientes requeridos para el desarrollo reproductor. El estrés de autofagia puede comprometer la formación de semillas (Cheikh et al. 1994), resistencia estructural y/o integridad física de los órganos reproductores (y por consiguiente la fertilización exitosa de huevos) (Liptay et al. 1994), arreglo celular y funcionalidad de órganos (Lolle et al. 1998), replicación celular (Takahshi et al. 2008) y crecimiento celular (Szekeres et al. 1996). Estos efectos de estrés son debido a la autofagia de tejidos pre-formados en los diversos procesos del desarrollo y crecimiento de plantas mencionados previamente. Además, esta autofagia resulta en la apoptosis de productos de cultivo potenciales, reduciendo significativamente el rendimiento de cultivo.

Las aplicaciones exógenas de citoquinina a las flores y hojas (es decir, follaje) de plantas proporcionan el efecto de señalización regulador de crecimiento espacialmente requerido necesario para la síntesis mejorada de nutrientes/azúcares para el uso por las nuevas células sensibles. La citoquinina

y/o potasio también se pueden aplicar al suelo en el cual las plantas están creciendo a las mismas concentraciones. Se puede aplicar al suelo en cualquier manera apropiada, tal como, por ejemplo, en un surco abierto cerca de las raíces de la planta, el surco se puede cerrar subsecuentemente. También se puede aplicar con varias formas de riego, tal como cinta de goteo o aspersión, o riego por surcos, entre otros. El mejoramiento de la síntesis de nutrientes, vía aplicación de citoquinina, se cree que resulta en un desarrollo más completo de los tejidos biológicos para la reproducción de plantas. Específicamente, la disponibilidad de un suministro adecuado de nutrientes/energía conduce al desarrollo exitoso del esperma masculino, incluyendo los diversos tejidos y señales biológicas responsables de su desarrollo. Una fuente de energía adecuada también ayuda en las diversas etapas de desarrollo del polen en el cual los espermatozoides se protegen por recubrimiento. Además, los nutrientes/energía adecuados están disponibles para asistir al esperma masculino en su viaje desde el grano de polen, a través del tubo de polen en desarrollo y en el ovario femenino para la fertilización del huevo. Por consiguiente, la aplicación de citoquinina resulta en la formación exitosa de embriones de semillas y tejidos asociados de la planta de cultivo, superando la autofagia y cualquier apoptosis resultante.

Adicionalmente, se ha encontrado que la aplicación de bajas concentraciones de potasio junto con la citoquinina incrementa sustancialmente el efecto de la citoquinina en tejidos de plantas. Tales resultados son inesperados y difieren de los efectos fisiológicos normalmente atribuidos a mayores velocidades de aplicación de potasio grado fertilizante típico. Los efectos fisiológicos de mayores concentraciones de potasio aplicadas incluyen: mantener la turgencia en las plantas y por consiguiente asegurar un suministro de agua, neutralizar los aniones que ayudan a estabilizar el pH del citoplasma, y procesos metabólicos generales. Para inducir estos efectos fisiológicos, la concentración de potasio aplicado debe estar en el orden de los fertilizantes típicos. Las bajas concentraciones de potasio, descritas en la presente, empleadas para el efecto de señalización son al menos diez por ciento menores que las aplicaciones de fertilizante de potasio típicas, tales como aquellas descritas en la Patente de Estados Unidos 4,581,056 emitida por Nooden et al. o en A. A. Csizinszky, *Foliar and Soil-Applied Biostimulant Studies with Microirrigated Pepper and Tomato*, 103 PROC. FLA. STATE HORT. SOC. 113-17 (1990). Se piensa que el potasio, aplicado en bajas concentraciones, actúa muy similar a otras moléculas de señalización (por ejemplo, hormonas) en la ayuda de transcripción de genes particulares, tales

como los genes que se expresan en respuesta a la citoquinina aplicada. El potasio, si se aplica con la citoquinina, preferiblemente se aplica a concentraciones muy bajas entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) por acre (0.4 hectáreas), más preferiblemente entre aproximadamente 1/2 lb (0.22 kg) a aproximadamente 1 1/2 lbs (0.68 kg) por acre (0.4 hectáreas), y muy preferiblemente aproximadamente 1 lb (.454 kg) por acre (0.4 hectáreas). El efecto de señalización del potasio se ha encontrado que se disminuye incrementadamente para velocidades de aplicación de potasio mayores de aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) por acre (0.4 hectáreas).

Una implementación preferida de la invención facilita la síntesis exitosa de nutrientes/azúcares, de modo que estos nutrientes/azúcares (es decir, energía química) se pueden transferir a los órganos de planta masculinos en desarrollo. El método preferiblemente incluye la aplicación de una hormona de planta, principalmente una citoquinina, al follaje y/o flores de plantas en o aproximadamente el momento de la floración de la planta. El período de efectividad potencial de aplicación de citoquinina puede variar desde varias semanas previo a la emergencia de la flor, hasta e incluyendo la emergencia de la flor, polinización, y durante el desarrollo subsecuente de embriones. Un tiempo preferido es durante el proceso de meiosis, cuando las células madre de polen pueden no diferenciarse, o no dividirse. Este tiempo de meiosis ocurre en plantas dicotiledóneas durante un intervalo después de la diferenciación de brote de la flor, pero antes que las flores se abran. En las plantas monocotiledóneas, tales como granos, corresponde aproximadamente a la etapa de "inicio temprano" (etapa de Feekes 10.0) en el desarrollo del grano. Otro tiempo preferido es durante la liberación de polen de los sacos de polen y tapete, cuando el polen está a punto de entrar en la dehiscencia (o diseminación). En las plantas dicotiledóneas, esta generalmente cae dentro del período que varía desde inmediatamente antes de la abertura de la flor hasta que la flor muere y cae de la planta. En las plantas monocotiledóneas, la liberación de polen corresponde aproximadamente a la etapa de Feekes (10.5.1) en el desarrollo del grano. La aplicación de citoquinina después de la floración también puede mejorar el desarrollo del embrión bajo condiciones de crecimiento de alta temperatura e incrementar el rendimiento.

El agente inhibidor de autofagia preferiblemente es la citoquinina, quinetina, sin embargo, otras formas de citoquinina se pueden usar singularmente o en combinación, tal como zeatina, varias formas de zeatina, N6-bencil adenina, N6-(delta-2-isopentil)adenina, 1,3-difenil urea, tidiazuron, CPPU (forclorfenuron) u

otras formulaciones químicas con actividad similar a citoquinina. Preferiblemente, pero opcionalmente, una baja concentración de potasio también se aplica junto con la hormona de planta para mejorar los efectos de la hormona de planta, citoquinina.

En una primera etapa, la hormona de planta citoquinina se prepara para la aplicación a las plantas a ser tratadas. La hormona de planta citoquinina preferiblemente se aplica a las plantas como una solución acuosa. La aplicación de sustancias químicas agrícolas se puede realizar en cualquiera de varias formas bien conocidas por aquellos expertos en el arte, incluyendo pero no limitado a, rocío, líneas de goteo, abono lateral, etc. Por lo tanto, la preparación de la hormona de planta citoquinina puede incluir una o más de las siguientes actividades: diluir la hormona de planta citoquinina en suficiente agua para crear la concentración deseada de citoquinina en la mezcla/composición aplicada, agregar una baja concentración de potasio a la mezcla/composición de hormona de planta citoquinina para mejorar el efecto de la citoquinina aplicada, cargar la hormona de planta citoquinina con o sin potasio (o una mezcla acuosa del mismo) en un rociador o tanque para la subsecuente aplicación a las plantas a ser tratadas, calibrar el rociador o aplicador de dosificación para medir la cantidad deseada de la mezcla de hormona de planta citoquinina a las plantas a ser tratadas y transportar la hormona de planta citoquinina con o sin potasio (o una mezcla acuosa del mismo) a la ubicación de las plantas a ser tratadas.

Preferiblemente, la concentración de citoquinina en una solución acuosa no diluida varía desde aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.10%. Un producto de citoquinina no diluida comercialmente disponible, X-Cyte (un producto de Stoller USA, Houston, Texas), suministra la concentración de citoquinina preferida de aproximadamente 0.04%. A la concentración de citoquinina preferida, la solución acuosa no diluida de citoquinina se aplica en una segunda etapa a las plantas a ser tratadas a la velocidad de entre aproximadamente 1/4 a 4 pintas (0.4 a 2.27 l) de solución por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento y más preferiblemente entre 1 a 2 pintas (0.57 a 1.14 l) de solución por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento. Tal aplicación iguala una velocidad de entre aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.76 gramos de citoquinina por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento (diluida en 60 galones (227.3 l) de agua por acre (0.4 hectáreas) para una solución rociada/aplicada), y más preferiblemente, a una velocidad de entre aproximadamente 0.19 a aproximadamente 0.38 gramos de citoquinina por acre

(0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento (diluida en 60 galones (272.7 l) de agua por acre (0.4 hectáreas) para una solución rociada/aplicada), dependiendo de las especies de planta/cultivo específicas. Por consiguiente, como se describió anteriormente, la cantidad de citoquinina aplicada a las plantas en crecimiento (1 a 2 pintas (0.57 a 1.14 l) de solución de citoquinina no diluida por acre (0.4 hectáreas), lo cual es equivalente a 0.1 ppm a 1.66 ppm de citoquinina de la solución rociada/aplicada por acre (0.4 hectáreas)) es mucho menor que las aplicaciones de citoquinina previas a las plantas en crecimiento. De hecho, las velocidades de aplicación preferidas son más de diez veces menores que otros intervalos reportados de aplicación de citoquinina, que son desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 400 ppm como se sugiere por N. G. Denny, *User Guide of Plant Growth Regulators*. Si la duración del desarrollo de flor es larga, la aplicación puede necesitar ser repetida para las flores recientemente desarrolladas.

La citoquinina y/o potasio (discutido con detalle adicional a continuación) se puede aplicar ya sea a las hojas de las plantas, o al suelo a las mismas concentraciones. Se puede aplicar al suelo en cualquier forma apropiada, tal como, por ejemplo, en un surco abierto cerca de las raíces de la planta, el surco se puede cerrar subsecuentemente. También se puede aplicar con varias formas de riego, tal como cinta de goteo o aspersión, o riego por surcos, entre otros.

El potasio, si se aplica junto con la citoquinina, también se aplica preferiblemente a bajas concentraciones. (Alternativamente, el potasio se puede aplicar previo a o después de una aplicación separada de citoquinina. Sin embargo, tales aplicaciones separadas no son óptimas, debido a que requieren más energía y mucho tiempo). El potasio preferiblemente se aplica como una sal de potasio, tal como aquella encontrada en la potasa, sin embargo otras formas de potasio conocidas por aquellos expertos en el arte se pueden emplear igualmente. Las velocidades de aplicación de potasio preferiblemente están entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) por acre (0.4 hectáreas) (equivalente a aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 4,000 ppm de potasio de la solución rociada por acre (0.4 hectáreas)), más preferiblemente entre aproximadamente 1/2 lb (0.22 kg) a aproximadamente 1 1/2 lbs (0.68 kg) por acre (0.4 hectáreas), y muy preferiblemente aproximadamente 1 lb (.454 kg) por acre (0.4 hectáreas). Los efectos sinérgicos de la aplicación de bajas concentraciones de citoquinina junto con bajas concentraciones de potasio a

plantas en crecimiento no se pueden limitar a condiciones de crecimiento de alto estrés sino también se pueden realizar bajo condiciones de crecimiento de menor estrés.

Las implementaciones preferidas de la invención se describen adicionalmente en los siguientes diversos ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no se proponen en alguna manera, y no se deben interpretar, para limitar el alcance de la invención descrita en la presente.

EJEMPLO 1

Se condujeron experimentos para determinar el grado al cual el regulador de crecimiento de plantas, citoquinina, cuando se aplica apropiadamente a las plantas que crecen en ambientes de alta temperatura, mejora los niveles de azúcar e incrementa la transferencia de azúcares a porciones deficientes de energía de la planta. Estos experimentos también se diseñaron para determinar si los tejidos de planta bajo estrés de alta temperatura sufrieron de uno o ambos de los dos problemas potenciales: Primero, si está bajo estrés de alta temperatura, hay una deficiencia de citoquinina en el tejido de planta. Segundo, si está bajo estrés de alta temperatura, hay degradación de la citoquinina (la cual es un proceso normal para regular el equilibrio de los reguladores de crecimiento de planta en tejidos de planta, en este caso reduciendo la cantidad de citoquinina activa en el tejido de planta).

Los datos de estos experimentos, como se muestra en las Figuras 1 y 2, claramente indican que el problema sufrido por las plantas sometidas a estrés de alta temperatura durante su fase de floración es una insuficiencia de citoquinina en los tejidos reproductores de las plantas. Los resultados además muestran que la aplicación de citoquinina exógena apropiada, como se describe en la presente, incrementa el desarrollo de la planta y rendimientos de cultivo en ambientes de crecimiento de alta temperatura (es decir, incrementa el número y calidad de las semillas que se desarrollan apropiadamente, incrementando así el rendimiento en la cosecha). La Figura 1 es un histograma de los resultados experimentales que prueban si el desarrollo deteriorado de las semillas/silicua bajo condiciones de crecimiento de alta temperatura es causado por una insuficiencia de nutrientes/azúcar, que puede incitar apoptosis de células de planta recientemente formadas por autofagia y la Figura 2 es un histograma de los datos experimentales que verifica los resultados obtenidos en la Figura 1, principalmente que la reducción de rendimiento de alta temperatura, causada por la autofagia,

principalmente es debido a una insuficiencia del regulador/hormona de crecimiento de plantas, citoquinina.

Estos experimentos emplearon la planta de cultivo modelo, *Arabidopsis thaliana*, cuyo genoma fue mapeado tan temprano como el año 2000. Para asegurar la uniformidad, las plantas probadas se seleccionaron de modo que estuvieran en las etapas de inicio de floración y tuvieran números equilibrados de flores a través de grupos. El agente de control así como también todos los agentes probados se aplicaron en una solución acuosa que contiene 0.01% de Silwet® súper esparcidor (obtenido de General Electric) a las hojas y flores (es decir, follaje) de las plantas probadas. Como se muestra en la Figura 1, un agente de control (Ctl) que consiste de una solución acuosa de 0.01% de Silwet® súper esparcidor se aplicó a un grupo de planta de control. Un segundo agente probado que consiste de N-(2-cloro-piridin-4-il)-N-fenil-urea (CPPU) a 10 µg/l (0.1 ppm) se aplicó a un segundo agrupamiento de plantas para probar si la dificultad de la formación de semillas es debido a la insuficiencia de citoquinina o enzimas sobrerreactivas que descomponen la citoquinina en la planta. Los tercero y cuarto agentes probados consistieron de 6-bencil adenina (g-BA) y quinetina (KIN) – ambas citoquininas – cada una aplicada a la velocidad de 100 µg/l (0.1 ppm). Finalmente, los quinto y sexto agentes probados consistieron de azúcares de sacarosa aplicados en soluciones de 20 mM (SUC 20) y 100 mM (SUC 100), respectivamente, aplicados como fuentes de energía fácilmente disponibles.

Las soluciones acuosas de los agentes probados preparadas a las concentraciones/dosis establecidas se rociaron sobre los grupos de prueba de flores y hojas (es decir, follaje) de *Arabidopsis thaliana* hasta la escorrentía en un día previo a la exposición al calor y de nuevo en cuatro días después del inicio de la exposición al calor. La duración total de la exposición al calor fue catorce (14) días. Las temperaturas de crecimiento se mantuvieron entre 33-36 grados Celsius durante dieciséis (16) horas al día, y a aproximadamente 25 grados Celsius durante ocho (8) horas por la noche. Los experimentos se condujeron en estantes encerrados con poli(metil metacrilato), es decir, estantes encerrados con Plexiglass®, usando cuatro lámparas fluorescentes duales y un ventilador de extracción controlado por termostato. Las vainas de semillas (es decir, silículas), llenas de semillas desarrolladas (silículas > 7 mm de largo y/o > 1 mm de ancho y/o que portan semillas), se contaron apenas antes del inicio del experimento, y de nuevo después de catorce (14) días de los tratamientos de exposición al calor.

Como se muestra en la Figura 1, el regulador de crecimiento de

plantas, citoquinina, puede mitigar la deficiencia de azúcar en los tejidos de planta causados por altas temperaturas de crecimiento, previniendo así la autofagia. Este resultado es indicado por el número incrementado de semillas (es decir, silicuas) en los agentes probados de citoquinina – 6-bencil adenina (6-BA) y quinetina (KIN). Los resultados ligeramente negativos encontrados con el agente probado N-(2-cloro-piridin-4-il)-N-fenil-urea (CPPU) (es decir, un inhibidor de citoquinina oxidasa) combinados con los resultados positivos encontrados con los agentes probados de citoquinina claramente indican que el problema de autofagia inducida por alta temperatura es debido a una insuficiencia de citoquinina (es decir, falta de síntesis de energía para las células recientemente formadas). Se debe señalar que los dos agentes probados de sacarosa también alivian la deficiencia de azúcar/fotosintato previniendo la autofagia de las plantas. Sin embargo, los agentes de prueba de sacarosa proporcionan alivio temporal costoso debido a que la sacarosa se descompone rápidamente *in situ*.

La Figura 2 presenta un conjunto adicional de resultados experimentales que refuerzan los resultados obtenidos para el experimento previo (Figura 1). El segundo experimento se condujo de la misma manera y usando el mismo control y concentraciones de agente probado como el primer experimento, con la excepción de la aplicación de CPPU. Por consiguiente, las soluciones acuosas respectivas como se usan en el primer experimento, con la excepción de CPPU, se rociaron sobre los grupos de prueba de follaje de *Arabidopsis thaliana* hasta la escorrentía en un día previo a la exposición al calor y de nuevo en cuatro días después del inicio de la exposición al calor. La duración total de la exposición al calor fue catorce (14) días. Las temperaturas de crecimiento se mantuvieron entre 33-36 grados Celsius durante dieciséis (16) horas al día, y a aproximadamente 25 grados Celsius durante ocho (8) horas en la noche. Los experimentos se condujeron en estantes encerrados con poli(metil metacrilato), es decir, estantes encerrados con Plexiglass®, usando cuatro lámparas fluorescentes duales y un ventilador de extracción controlado por termostato. Las vainas de semillas (es decir, silicuas), llenas de semillas desarrolladas (silicuas > 7 mm de largo y/o > 1 mm de ancho y/o que portan semillas), se contaron apenas antes del inicio del experimento, y de nuevo después de catorce (14) días de los tratamientos de exposición al calor. Los resultados del segundo experimento se pueden interpretar de manera similar como los resultados del primer experimento, confirmando que el regulador de crecimiento de plantas, citoquinina, puede mitigar la deficiencia de azúcar en los tejidos de plantas causada por altas temperaturas

de crecimiento, reduciendo así la autofagia.

EJEMPLO 2

En este ejemplo, se observó el efecto del regulador de crecimiento de plantas, citoquinina, específicamente quinetina, aplicado al inicio de la floración y dos a cuatro semanas después a frijoles que crecieron en el campo (es decir, habas) en Gustine, California. Se registraron temperaturas de crecimiento hasta aproximadamente 35 grados Celsius. La Tabla 2 (a continuación) proporciona los resultados de este experimento aleatorizado duplicado. Los rendimientos de habas se incrementaron significativamente (es decir, menos semillas sucumbieron a la autofagia y colapso o muerte de semillas) cuando la solución acuosa de quinetina se aplicó apenas previo a la floración del follaje de habas ya sea a una velocidad de una pinta por acre (0.57 l por 0.4 hectáreas) o dos pintas por acre (1.14 l por 0.4 hectáreas). La diferencia de la prueba “t” de 5% es significativa.

TABLA 1: Rendimiento de Cultivo de la Aplicación de Solución de Kinetina en la Floración para Velocidades de 0 pt/acre, 1/2 pt/acre (0.28 l/0.4 hectáreas), 1 pt/acre (0.57 l/0.4 hectáreas) y 2 pt/acre (1.14 l/0.4 hectáreas)

Rendimiento de Habas Gustine, CA Año 2010				
Promedio	Rendimiento Promedio (lb/parcela)	Rendimiento Promedio (lb/parcela)	Rendimiento Promedio (lb/parcela)	Rendimiento Promedio (lb/parcela)
X- Cyte pt/acre (l/hectárea)	0	0.5 (0.28 l)	1 (0.57 l)	2 (1.14 l)
Rendimiento promedio (lb/parcela)	6.86	6.915	7.845	8.11375
prueba t vs. control		0.416532	0.000115	0.000307
prueba t vs. 1/2 pt/acre (0.28 l/0.4 hectáreas)			0.003132	0.006917
prueba t vs. 1 pt/acre (0.57 l/0.4 hectáreas)				0.09629
rep 1	7.13	6.47	8.13	8.61
	6.84	8.34	8.02	8.02
rep 3	6.59	7.11	7.65	7.83
rep 4	6.8	6.68	8.07	8.37
rep 5	7.17	6.45	7.38	8.51
rep 6	7	7.17	7.55	6.85
rep 7	6.7	6.49	7.91	8.53
rep 8	6.65	6.61	8.05	8.19

EJEMPLO 3

En este ejemplo, se observó el efecto del regulador/hormona de crecimiento de plantas, citoquinina, aplicado junto con bajas concentraciones de potasio. La citoquinina que se aplicó en el campo fue X-Cyte, como se describió previamente. En estos ensayos de campo no duplicados, conducidos en Ohio durante un período de tres años, potasio a 1/2 lb (0.22 kg) a 1 lb (0.45 kg) por acre (0.4 hectáreas) y citoquinina a 1 pinta (0.57 l) por acre (0.4 hectáreas) se aplicaron al maíz de campo. El incremento promedio de rendimiento logrado mediante la aplicación de potasio, además de la citoquinina, fue aproximadamente quince (15) bushels por acre (0.4 hectáreas).

EJEMPLO 4

En este ejemplo, se observó el efecto del regulador de crecimiento de plantas citoquinina, específicamente quinetina, y se aplicó varias veces antes de las etapas reproductoras de crecimiento. En la Tabla 2, V7, V10, V13, y V16 se refieren a las etapas de crecimiento de la planta de maíz. V7 se refiere a la etapa de crecimiento donde el collar de la séptima hoja es visible, V10 se refiere a la etapa de crecimiento donde el collar de la décima hoja es visible, V13 se refiere a la etapa de crecimiento donde el collar de la decimotercera hoja es visible, y V16 se refiere a la etapa de crecimiento donde el collar de la decimosexta hoja es visible. V16 también está apenas previo a la etapa reproductora de crecimiento. Los cultivos de maíz crecieron en Weslaco, Texas. Los niveles de agua fueron nada (es decir, simplemente lluvia referida como tierra seca), o goteo mediante una "cinta de goteo" (es decir, riego por goteo por lo cual suficiente agua se aplicó para el crecimiento más óptimo del cultivo). Los resultados se dan para rendimiento (medido en bushels por acre (0.4 hectáreas)), y el peso de la semilla (medido en gramos por 1,000 granos). Las pruebas t indican si hay diferencias. Todos los tratamientos con citoquinina exógena (en este caso quinetina) mejoraron el rendimiento en una manera altamente significativa. El tamaño de semilla generalmente se incrementó a aproximadamente el mismo con más riego óptimo tanto para el control no tratado como la citoquinina exógenamente aplicada. Sin embargo, bajo condiciones de tierra seca (sin agregar agua o sin riego) el tratamiento con citoquinina incrementó el tamaño de semilla en una manera altamente significativa sobre el control no tratado.

Tabla 2: Tratamiento de cultivos de maíz crecidos en el campo antes de la etapa reproductora de crecimiento con citoquinina, en este caso quinetina, en el efecto del tratamiento sobre el rendimiento del cultivo (medido en bushels de grano por acre (0.4 hectáreas), y tamaño de semilla (medido en gramos por 1,000 granos de semillas).

EXPT	Etap	Variedad	Agua	Fecha de Cosecha de Siembra	Rendimiento Bu/acre (0.4 hectáreas)	Rendimiento SD	Rendimiento Prueba t vs con P=	1,000 Granos peso g	SD Granos peso	Grano peso Prueba t Vs con P=
1	control	B25DC25 R80	Goteo	10/1/11 1/7/12	174	11.6		296	7.1	
1	V10	ibid	ibid	ibid	259	7.0	0.01%	298	2.2	NS
1	V16	ibid	ibid	ibid	311	8.8	0.01%	298	1.0	NS
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
2	control	Asgrow 7573	Tierra seca	03/15/11 07/15/11	91	7.4		227	5.1	
2	V10	ibid	ibid	ibid	149	3.3	0.01%	244	5.0	0.01%
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
3	control	H2684162	Tierra seca	02/15/11 06/10/11	101	2.2		260	15.1	
3	V16	ibid	ibid	ibid	207	4.9	0.015	296	3.6	0.01%
3	V13	ibid	ibid	ibid	208	9.1	0.01%	299	10.1	0.01%
3	V10	ibid	ibid	ibid	211	4.6	0.01%	296	6.6	0.01%
3	V7	ibid	ibid	ibid	212	6.4	0.01%	295	9.6	0.015

El resumen de la descripción se escribe solamente para proporcionar a la Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos y al público en general un

medio por el cual determinar rápidamente de una inspección superficial la naturaleza y esencia de la descripción técnica, y representa una implementación preferida y no es indicativo de la naturaleza de la invención como un todo.

Mientras que algunas implementaciones de la invención se han ilustrado en detalle, la invención no se limita a las implementaciones mostradas; modificaciones y adaptaciones de las implementaciones descritas pueden producirse por aquellos expertos en el arte. Tales modificaciones y adaptaciones están en el espíritu y alcance de la invención como se describe en las reivindicaciones después.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mitigar la autofagia de plantas en plantas que crecen bajo una condición ambiental de alto estrés, caracterizado porque el método comprende las etapas de:

preparar una hormona de planta para la aplicación a plantas, la hormona de planta es principalmente citoquinina, y

aplicar la hormona de planta en una solución acuosa a las plantas durante o apenas previo a la floración, la solución acuosa tiene una concentración de entre aproximadamente 0.01% en peso a aproximadamente 0.1 % en peso de citoquinina, la solución acuosa se aplica a las plantas a una velocidad de aproximadamente 1/4 pinta (0.4 l) a aproximadamente 4 pintas (2.27 l) por acre (0.4 hectáreas).

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución acuosa se aplica al follaje o flores de las plantas.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución acuosa se aplica al suelo en el cual las plantas están creciendo.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la condición ambiental de alto estrés es una temperatura diurna de más de aproximadamente 30 grados Celsius.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la temperatura diurna de más de 30 grados Celsius ocurre durante o apenas previo a la floración.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque adicionalmente comprende la etapa de,

aplicar potasio al follaje o flores de las plantas a la velocidad de entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) de potasio por acre (0.4 hectáreas).

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque adicionalmente comprende la etapa de,

aplicar potasio al suelo en el cual las plantas están creciendo a la velocidad de entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) de potasio por acre (0.4 hectáreas).

8. Un método de agricultura, caracterizado porque comprende las etapas de:

preparar un agente inhibidor de autofagia para la aplicación a plantas

en crecimiento, el agente inhibidor de autofagia consiste de una hormona de planta, la hormona de planta incluye una citoquinina,

preparar una sal de potasio para la aplicación a las plantas en crecimiento, y

aplicar el agente inhibidor de autofagia y sal de potasio en una solución acuosa al follaje o flores de las plantas en crecimiento, o al suelo en el cual las plantas están creciendo, durante o apenas previo a la floración, la solución acuosa se aplica a las plantas en crecimiento de modo que entre aproximadamente 0.09 gramos a aproximadamente 0.76 gramos de citoquinina se aplican por acre (0.4 hectáreas) de plantas en crecimiento.

9. El método de agricultura de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque,

la sal de potasio se aplica al follaje o flores de las plantas en crecimiento, o al suelo en el cual las plantas están creciendo a la velocidad de aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) de sal de potasio por acre (0.4 hectáreas).

10. Un método para plantas en crecimiento, caracterizado porque comprende las etapas de:

preparar una hormona de planta y potasio para la aplicación a follaje o flores de plantas que crecen en una temperatura diurna promedio arriba de aproximadamente 20 grados Celsius, la hormona de planta tiene citoquinina como un componente mayoritario, y

aplicar una solución acuosa de la hormona de planta y el potasio al follaje o flores de las plantas, o al suelo en el cual las plantas están creciendo, durante o apenas previo a la floración, la citoquinina se aplica a las plantas a una velocidad entre aproximadamente 0.09 gramos por acre (0.4 hectáreas) a aproximadamente 0.76 gramos por acre (0.4 hectáreas).

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque

el potasio se aplica al follaje o flores de las plantas, o al suelo en el cual las plantas están creciendo, a una velocidad de entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) por acre (0.4 hectáreas).

12. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque

la temperatura diurna promedio arriba de aproximadamente 20 grados Celsius ocurre durante o apenas previo a la floración.

13. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque

la temperatura diurna promedio excede aproximadamente 30 grados Celsius.

14. Una composición para mitigar el estrés ambiental en plantas en crecimiento, caracterizada porque la composición comprende:

una hormona de planta que incluye principalmente una citoquinina, la citoquinina está presente en una solución acuosa de la composición a una concentración de entre aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 3.4 ppm de citoquinina, la composición está a una cantidad efectiva para disminuir la autofagia de plantas bajo una temperatura de crecimiento diurna promedio arriba de 30 grados Celsius.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque adicionalmente comprende

una sal de potasio presente en la composición a una concentración de entre aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 4,000 ppm de sal de potasio.

16. Una composición para disminuir el estrés ambiental en plantas en crecimiento, caracterizada porque la composición comprende:

una hormona de planta que tiene citoquinina como un componente mayoritario, la citoquinina está presente en una solución acuosa de la composición a una concentración de modo que entre aproximadamente 0.09 gramos a aproximadamente 0.76 gramos de citoquinina se pueden aplicar por acre (0.4 hectáreas) de las plantas en crecimiento cuando la composición se aplica así, la composición está a una cantidad efectiva para disminuir la autofagia de plantas bajo una temperatura de crecimiento diurna promedio arriba de 30 grados Celsius y

una sal de potasio que está presente en la solución acuosa de la composición a una concentración de modo que entre aproximadamente 1/4 lb (0.11 kg) a aproximadamente 2 lbs (0.90 kg) de sal de potasio se pueden aplicar por acre (0.4 hectáreas) de las plantas en crecimiento cuando la composición se aplica así.

RESUMEN DE LA INVENCION

Una composición y método para mitigar la autofagia y/o apoptosis de plantas de células recientemente desarrolladas en plantas que crecen bajo condiciones de crecimiento ambientalmente estresantes, tal como alta temperatura. Se ha descubierto que la aplicación exógena de una citoquinina, preferiblemente quinetina, ya sea a las raíces o el follaje (es decir, flores y hojas) de plantas supera, o al menos sustancialmente mitiga, la autofagia cuando se aplica durante o apenas previo a la floración. Los resultados experimentales indican que la autofagia inducida por alta temperatura, y subsecuente apoptosis de células nuevas, es el resultado de una deficiencia de citoquinina en los tejidos de plantas. La aplicación de bajas concentraciones de potasio junto con la citoquinina parece proporcionar un efecto sinérgico amplificando el efecto de la citoquinina para disminuir la autofagia e incrementar la productividad del cultivo.

Figura 1

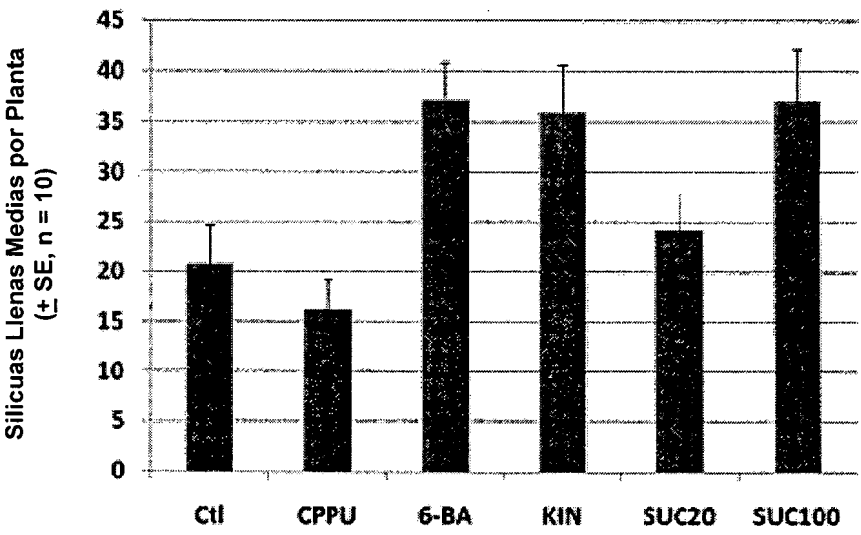
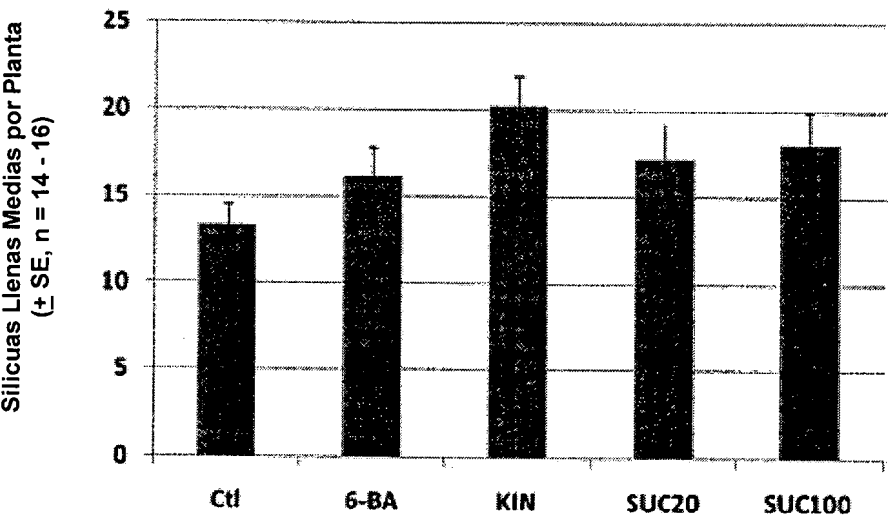


Figura 2



PCT/US2012/030981 12.03.2013

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 202857SOR053	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US12/30981	International filing date (day/month/year) 28 March 2012 (28.03.2012)	Priority date (day/month/year) 29 March 2011 (29.03.2011)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: A01N 33/00(2006.01),33/06(2006.01),43/713 (2012.01) USPC: 504/138,129,118,116.1			
Applicant STOLLER ENTERPRISES, INC.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>6</u> sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No.I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 29 October 2012 (29.10.2012)		Date of completion of this report 07 March 2013 (07.03.2013)	
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer William Kryski Telephone No. 571-272-1700	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US12/30981

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into English which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a)).
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

- ☒ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
 pages 1-21 as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
 pages 22-25 as originally filed/furnished
 pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-2 as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____

☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established:

- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
- ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis) and 70.2(e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

PCT/US2012/030981 12.03.2013

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY		International application No. PCT/US12/30981
Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
1. Statement		
Novelty (N)	Claims <u>1-16</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-16</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-16</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
2. Citations and Explanations (Rule 70.7) Please See Continuation Sheet		

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/30981

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. 1, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☐ in electronic form

b. (time)

- ☐ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☐ to this Authority as an amendment* on _____

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* If item 4 in Box No. 1 applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/30981

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

V. 2. Citations and Explanations:
Claims 1-16 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 4,581,056 A to Nooden, et. al (hereinafter 'Nooden') in view of US 2005/0197253 A1 to Stoller, et. al (hereinafter 'Stoller').

As per claim 1, Nooden discloses a method comprising the steps of: readying a plant hormone for application to plants (abstract 'cytokinin'), said plant hormone being primarily cytokinin (column 12, lines 43-68; column 13, lines 1-22), and said aqueous solution having a concentration of between about 0.01 wt% to about 0.1 wt% cytokinin, (column 12, lines 43-68; column 13, lines 1-22). Nooden fails to disclose a method of mitigating plant autophagy in plants grown under a high stress environmental condition, applying said plant hormone in an aqueous solution to said plants during or just prior to flowering, and that said aqueous solution is applied to said plants at a rate of about ¼ pint to about 4 pints per acre. Stoller discloses applying said plant hormone in an aqueous solution to said plants during or just prior to flowering (paragraph [0085]; claim 18), and that said aqueous solution is applied to said plants at a rate of about ¼ pint to about 4 pints per acre (paragraph [0104]). It would have been obvious, to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to combine the method of Nooden with the method of Stoller, because both methods entail using a composition comprising cytokinins to improve crops and/or mitigate the effects of stresses on them. Combination of the methods would have resulted in the application of the composition at the optimal time in the plant's life cycle. In a similar manner, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to use the composition to treat for autophagy. Stoller discloses that hormone composition comprising cytokinins should relieve stress on plants (paragraph [0085]) and a person of ordinary skill in the art could have recognized that the method of Nooden and Stoller could have treated autophagy among other stress-related plant conditions.

As per claim 2, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 1 and Stoller discloses that said aqueous solution is applied to the foliage or flowers of said plants (paragraphs [0093]).

As per claim 3, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 1 and Stoller discloses that said aqueous solution is applied to the soil in which said plants are growing (paragraph [0109]).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/30981

Supplemental Box

As per claim 4, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 1 and Stoller discloses that the high stress environmental condition is a daytime temperature of greater than about 30 degrees Celsius (paragraphs [0009]-[0010]).

As per claim 5, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 4, but neither Nooden nor Stoller explicitly discloses that said daytime temperature of greater than 30 degrees Celsius occurs during or just prior to flowering. Stoller discloses that high temperatures can impair the normal growth processes of plants (paragraph [0010]) and that the application of cytokinin, when applied at or before the first flower, can mitigate and reverse the stress-induced abnormal growth patterns (paragraph [0085]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have used the methods of Nooden and Stoller on plants when a daytime temperature of greater than 30 degrees Celsius occurs during or just prior to flowering. Additionally, a person of ordinary skill in the art could have employed the methods of Nooden and Stoller, under the conditions taught by Stoller, to mitigate stress to the plant caused by heat, and subsequently improve the crop's yield, as taught by Stoller (paragraph [0088]).

As per claim 6, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 1 and Nooden discloses the method further comprising the step of applying potassium to the foliage or flowers of said plants at the rate of between about 1/4 lb. to about 2 lbs. potassium per acre (column 13, lines 14-16).

As per claim 7, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 1, and Nooden discloses the method further comprising the step of applying potassium at the rate of between about 1/4 lb. to about 2 lbs. potassium per acre (column 13, lines 14-16). Nooden fails to disclose the step of applying potassium to the soil in which the said plants are growing. Stoller discloses that it is applied to the soil in which said plants are growing (paragraph [0109]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have used the methods of Nooden and Stoller on plants when a daytime temperature of greater than 30 degrees Celsius occurs during or just prior to flowering. Additionally, a person of ordinary skill in the art could have employed the methods of Nooden and Stoller, under the conditions taught by Stoller, to mitigate stress to the plant caused by heat, and subsequently improve the crop's yield, as taught by Stoller (paragraph [0088]), and also since addition of potassium to the soil would have aided in the synergistic effect of directly delivering the combination of cytokinin and potassium to the roots of a plant to protect against heat-induced autophagy.

As per claim 8, Nooden discloses a plant hormone including a cytokinin (abstract), readying a potassium salt for application to said growing plants (column 12, lines 55-57), applying the hormone and said potassium salt in an aqueous solution to the foliage of growing plants (column 13, lines 1-5). Nooden further discloses applying an aqueous solution (column 12, lines 45-56) to growing plants such that between about 0.0001 to 10 lbs. of cytokinin are applied per acre of growing plants (column 13, lines 18-20). Nooden fails to disclose a method of farming comprising the steps of: readying an autophagy-inhibiting agent for application to growing plants, said autophagy inhibiting agent consisting of a plant hormone, applying said autophagy-inhibiting agent and said potassium salt in an aqueous solution during or just prior to flowering, and that said aqueous solution applied to said growing plants such that between about 0.09 grams to about 0.76 grams of cytokinin are applied per acre of growing plants. Stoller discloses applying an aqueous solution to plants during or just prior to flowering (paragraph [0085]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to combine the method of Nooden with the method of Stoller, because both methods entail using a composition comprising cytokinins to improve crops and/or mitigate the effects of stresses on them, the combination of methods would have resulted in the application of the composition at the optimal time in the plant's life cycle. In a similar manner, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to use the combination of methods in a method of farming comprising: readying an autophagy-inhibiting agent for application to growing plants, said autophagy inhibiting agent consisting of a plant hormone, to treat for autophagy. Stoller discloses that hormone composition comprising cytokinins can relieve stress on plants (paragraph [0085]), and a person of ordinary skill in the art would have recognized that the method of Nooden and Stoller could have treated for autophagy among other stress-related plant conditions. Additionally, a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, would have recognized that 0.0001 to 10 lbs per acre of cytokinin is equivalent to 0.0453 to 4,536 grams per acre, which would have fallen within the claimed range of amounts.

As per claim 9, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of farming of claim 8, and Nooden further discloses that said potassium salt is applied to the foliage (column 13, lines 1-5) of said growing plants, at the rate of 1/4 lb to 2 lbs potassium per acre (column 13, lines 15-16).

As per claim 10, Nooden discloses a method of growing plants (column 1, lines 9-16) comprising the steps of: readying a plant hormone and potassium (column 12, lines 43-68) for application to foliage of plants (column 13, lines 1-5), said plant hormone having cytokinin as a majority component (column 14, lines 11-18), and applying an aqueous solution (column 12, lines 43-47) of said plant hormone and said potassium to the foliage of said plants (column 13, lines 1-5); applying cytokinin at a rate between 0.0001 pounds per acre to 10 pounds per acre (column 13, lines 18-20). Nooden fails to disclose that the plants grow in an average daytime temperature of above about 20 degrees Celsius and that cytokinin applied to said plants at a rate between about 0.09 grams per acre to about 0.76 grams per acre. Stoller discloses that the plants grow in an average daytime temperature of above about 20 degrees Celsius (paragraph [0009]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to combine the method of Nooden with the method of Stoller, because both methods entail using a composition comprising cytokinins to improve crops and/or mitigate the effects of stresses on them, integrating the temperature range of the plants, as taught by Stoller, into the method of Nooden would have resulted in a method of improving plants that grow in the temperature range of above about 20 degrees Celsius. Additionally, a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, would have recognized that 0.0001 to 10 lbs per acre of cytokinin is equivalent to

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/30981

Supplemental Box

0.0453 to 4,536 grams per acre, which would have fallen within the claimed range of amounts.

As per claim 11, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 10 and Nooden further discloses that potassium is applied to the foliage of said plants (column 13, lines 1-5) at a rate of between about ¼ lb. to about 2 lbs. per acre (column 13, lines 15-17).

As per claim 12, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 10, but neither Nooden nor Stoller explicitly disclose that the average daytime temperature of above about 20 degrees Celsius occurs during or just prior to flowering. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have used the method of Nooden and Stoller on plants when an average daytime temperature above about 20 degrees Celsius occurs during or just prior to flowering. Stoller discloses that high temperatures can impair the normal growth processes of plants (paragraph [0010]) and that the application of cytokinin, when applied at or before the first flower, can mitigate and even reverse the stress-induced abnormal growth patterns (paragraph [0085]). A person of ordinary skill in the art could have employed the method of Nooden and Stoller under the conditions taught by Stoller, to mitigate stress to the plant, and subsequently improve the crop's yield, as taught by Stoller (paragraph [0088]).

As per claim 13, Nooden and Stoller, in combination, disclose the method of claim 10 and Stoller discloses that said average daytime temperature exceeds about 30 degrees Celsius (paragraph [0010]).

As per claim 14, Nooden discloses a composition (column 12, lines 43-68) comprising a plant hormone including primarily a cytokinin (column 12, lines 60-68), said composition comprising 0.0001 wt. % - 10 wt. % cytokinin (column 12, lines 60-63). Nooden fails to disclose a composition for mitigating environmental stress in growing plants, that said cytokinin is present in an aqueous solution of said composition at a concentration of between about 0.1 ppm to about 3.4 ppm cytokinin, and that said composition is an amount effective to lessen plant autophagy under an average daytime growing temperature above 30 degrees Celsius. Stoller discloses a composition for mitigating environmental stress in plants (abstract; paragraph [0085]) under daytime growing temperatures above 30 degrees Celsius (paragraph [0010]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to combine the composition of Nooden with the composition of Stoller used to treat for stress, because both compositions comprise cytokinins and are used to improve crops and/or mitigate the effects of stresses on them, a person of ordinary skill in the art would have further known to use the composition under the temperature range taught by Stoller (paragraph [0085]). Furthermore, Stoller discloses several environmental stresses (paragraph [0085]) for which cytokinins can be used to mitigate the effects. A person of ordinary skill in the art could have used the cytokinin composition to treat for autophagy, among other stress-related conditions. Finally, a person of ordinary skill in the art would have recognized that the 0.0001 wt. % - 10 wt. % cytokinin taught by Nooden (column 12, lines 60-63) is equivalent to 1 - 10,000 ppm.

As per claim 15, Nooden and Stoller, in combination, disclose the composition of claim 14 and Nooden discloses a potassium salt present in said composition at a concentration of between about 0.5 wt. % and 30 wt. % (column 12, lines 55-57). Nooden does not disclose a potassium salt present in said composition at a concentration of between about 500 ppm to about 4,000 ppm potassium salt. However, a person of ordinary skill in the art would have recognized that 0.5 wt. % to 30 wt. % is equivalent to 5,000 ppm to 300,000 ppm. A person of ordinary skill in the art, at the time of invention, could have derived 500 ppm to 4000 ppm, through routine experimentation and testing.

As per claim 16, Nooden discloses a composition (column 12, lines 43-68) comprising a plant hormone having cytokinin as a majority component (column 12, lines 60-68), said cytokinin being present in an aqueous solution (column 12, lines 32-42) of said composition at a concentration such that between about 0.0001 pounds to about 10 pounds of cytokinin may be applied per acre of said growing plants when said composition is so applied (column 13, lines 18-19), and that a potassium salt is present in said aqueous solution of said composition such that between about ¼ lb. to about 2 lbs. of potassium salt (column 13, lines 15-17) may be applied per acre of said growing plants when said composition is so applied (column 12, lines 30-68). Nooden fails to disclose a composition for lessening environmental stress in growing plants and that said composition being in an amount effective to lessen plant autophagy under an average daytime growing temperature above 30 degrees Celsius. Stoller discloses a composition for lessening environmental stress in growing plants (paragraph [0085]) and applying the composition under an average daytime growing temperature above 30 degrees Celsius (paragraphs [0009]-[0010]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of invention, to combine the composition of Nooden with the composition of Stoller, because a person of ordinary skill in the art would have recognized that the cytokinin composition of Nooden, which mitigates the effects of senescence in plants, could be used to treat for stress-related plant conditions, as taught by Stoller. Additionally, a person of ordinary skill in the art would have recognized that the composition could treat plant autophagy, as it is capable of treating other conditions associated with plant stress.

Claims 1-16 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

----- NEW CITATIONS -----

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), **STOLLER ENTERPRISES, INC.**

domiciliado(s) en 4001 W. Sam Houston Parkway North, Suite 100, Houston, TX 77043, US.

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, lemas comerciales, nombres comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad; en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Calle 70A No. 4-41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

HOU3321476.1

POWER OF ATTORNEY

I(We), **STOLLER ENTERPRISES, INC.**

domiciled in 4001 W. Sam Houston Parkway North, Suite 100, Houston, TX 77043, US.

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions of similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Calle 70A No. 4-41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in Houston, Texas, USA

this day of June 2013

Signature

Name Jerry R. STOLLER
Title President

202857SOR053

4/6

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application STOLLER ENTERPRISES, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) v)		an assignment from STOLLER, JERRY to STOLLER ENTERPRISES, INC., dated 19 March 2012 (19.03.2012)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from LIPTAY, ALBERT to STOLLER ENTERPRISES, INC., dated 19 March 2012 (19.03.2012)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from SALZMAN, ROBERT to STOLLER ENTERPRISES, INC., dated 19 March 2012 (19.03.2012)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 101388
		Bogotá D.C., Octubre 08 de 2013 - 15:47:12

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.					NI 860.047.372
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	594596446	08/10/2013	12.800.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-256727-00000-0000

Fecha: 2013-10-29 17:47:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 32



No. 13-256727- -00000-0000

Fecha: 2013-10-29 17:47:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 32

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTII

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	