MÉTODOS PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y LA TOLERANCIA AL ESTRÉS EN PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención está dirigida en general a métodos para mejorar el crecimiento y la tolerancia al estrés en plantas que comprenden aplicar cantidades eficaces de ácido (S)-abscísico y glicina betaína a una planta.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los productores intentan continuamente obtener los cultivos de la manera más productiva posible con el fin de maximizar los rendimientos. Los reguladores del crecimiento vegetal constituyen una herramienta que los productores podrán utilizar para afectar el crecimiento de sus plantas basado en las restricciones de agua y temperatura. Los efectos de los reguladores del crecimiento vegetal sobre las plantas bajo diferentes condiciones pueden variar ampliamente. Además, es difícil predecir el efecto que la aplicación de más de un regulador del crecimiento vegetal cuando se aplican de manera simultánea a la planta.

[0003] El ácido (S)-abscísico ("(*S*)-ABA") es un regulador del crecimiento de plantas de maíz endógeno que cumple muchas funciones en el crecimiento y el desarrollo. Por ejemplo, el (*S*)-ABA inhibe la germinación de las semillas, antagonizando de esa manera las giberelinas lo cual estimulan la germinación de los granos. El (*S*)-ABA promueve la tolerancia al estrés y mantiene el crecimiento bajo condiciones de estrés (véase Sharp RE et al., *Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics*, *J Exp Bot*, noviembre, 200, 55(407), 2343-2351). Notablemente,

varios estudios han demostrado que el mantenimiento de niveles ‘normales’ de ABA en plantas bien regadas es un requisito para mantener el crecimiento de brotes en tomate (Sharp RE et al., *Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene*, *J Exp Bot*, septiembre, 2000, 51(350), 1575-1584) y *Arabidopsis* (LeNoble ME et al., *Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression*, *J Exp Bot*, enero, 2004, 55(395), 237-245)**.** Aún más, el (*S*)-ABA es responsable del desarrollo y mantenimiento de la latencia en semillas y plantas leñosas, que si presentan deficiencia de ABA a menudo muestra una brotación de precosecha de las semillas debido a la falta de inducción de latencia.

[0004] Además, también se ha demostrado que las aplicaciones de (*S*)-ABA proporcionan protección contra el enfriamiento y la sequía, así como un aumento del color rojo de las uvas de mesa sin semillas. Los ejemplos de formulaciones de (*S*)-ABA eficaces disponibles comercialmente incluyen ProTone™ y Contego™ (disponible de Valent BioSciences LLC).

[0005] La glicina betaína (“GB”) es un soluto que se acumula en plantas, microorganismos y hongos como respuesta a un estrés abiótico. Entre los cultivos de cereales más importantes, solamente el arroz no acumula GB naturalmente (Shirasawa K. et al., *Accumulation of glycine betaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress*, *Ann Bot*, septiembre, 2006, 98(3), 565-571). La sobreexpresión de genes bacterianos o vegetales en arroz para producir GB dio como resultado una acumulación baja de GB, pero confirió tolerancia al estrés. Se ha demostrado que la aplicación exógena de GB a plantas confiere

tolerancia al estrés abiótico (Chen y Murata, *Glycine betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants*, *Trends Planta Sci*, septiembre, 2008, 13(9), 499-505). Esto incluye resistencia al estrés al inducir resistencia al enfriamiento, al congelamiento y a la sequía en numerosas especies vegetales. Sin embargo, los niveles observados de protección contra el estrés, si bien fueron significativos, no alcanzan umbrales comercialmente aceptables.

[0006] Por lo tanto, persiste la necesidad en el arte de nuevos métodos para mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés abiótico.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] En un aspecto, la presente invención está dirigida a métodos para mejorar el crecimiento de las plantas que comprenden aplicar una cantidad eficaz de ácido (S)-abscísico ((*S*)-ABA) y glicina betaína (GB) a la planta, en donde la relación de pesos de (*S*)-ABA:GB es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:33.

[0008] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a métodos para mejorar la tolerancia al estrés en una planta que comprenden aplicar una cantidad eficaz de (*S*)-ABA y GB a la planta, en donde la relación de pesos de (*S*)-ABA:GB es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:33.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] El Solicitante descubrió inesperadamente que una mezcla de ácido (S)-abscísico ("(S)-ABA") y glicina betaína ("GB") mejoraba la tolerancia al estrés y el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés.

[00010] En una forma de realización, la presente invención está

dirigida a métodos para mejorar el crecimiento de las plantas que comprenden aplicar una cantidad eficaz de (*S*)-ABA y GB a la planta.

[00011] En otra forma de realización preferida, la planta en la cual mejora el crecimiento vegetal está sometida a un estrés abiótico.

[00012] En otra forma de realización, la presente invención está dirigida a métodos para mejorar la tolerancia al estrés en una planta que comprenden aplicar una cantidad eficaz de (*S*)-ABA y GB a la planta.

[00013] En una forma de realización preferida, la tolerancia al estrés que mejora es un estrés abiótico.

[00014] En otra forma de realización preferida, el (*S*)-ABA y la GB se aplican a una relación de pesos entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:33.

[00015] En una forma de realización, la planta es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En una forma de realización preferida, la planta monocotiledónea es un pasto, más preferiblemente maíz. En otra forma de realización preferida, la planta dicotiledónea es una herbácea o una dicotiledónea leñosa, más preferiblemente pepino o albahaca.

[00016] En otra forma de realización, la planta está modificada genéticamente. En una forma de realización preferida, la planta modificada genéticamente expresa resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, tolerancia a sequía o una función fisiológica aumentada.

[00017] En otra forma de realización, la planta está sometida a estrés por frío. Según se usa en la presente, el estrés por frío se refiere a condiciones de temperaturas bajas (por ejemplo, 4-10 °C), en donde crecimiento de las plantas disminuye significativamente en comparación con las

condiciones de invernadero que sustentan un crecimiento y desarrollo óptimos.

[00018] En otra forma de realización, la planta está sometida a estrés por sequía. Según se usa en la presente, el “estrés por sequía” se refiere a las condiciones de riego, en donde el crecimiento vegetal disminuye significativamente en comparación con aquellas donde la disponibilidad de agua es suficiente como para soportar un crecimiento y desarrollo óptimos.

[00019] En una forma de realización preferida, (*S*)-ABA y GB se aplican antes de la aparición del estrés abiótico. Según se usa en la presente, esto puede hacer referencia a numerosos tipos diferentes de estrés, inclusive frío y/o sequía. En el caso del estrés por frío, la composición de (*S*)-ABA y GB se aplica antes de la temperatura fría, como una protección contra los daños por enfriamiento. Cuando el estrés de interés es sequía, la aplicación de (*S*)-ABA y GB antes del estrés por sequía permite el manejo del agua del suelo. Al inhibir el uso del agua durante el crecimiento de la fase vegetativa, hay más agua presente para brindar soporte durante el crecimiento de la fase reproductora, cuando son más altas las pérdidas de rendimiento debido al estrés por agua.

[00020] En una forma de realización preferida, ambos (*S*)-ABA y GB se aplican durante el período de la etapa de crecimiento vegetativo que comienza en V2 y termina en VT. En toda la solicitud, el solicitante se ha referido a las etapas de desarrollo del maíz como etapas “V”. Las etapas “V” se designan numéricamente como V1, V2, V3, etc. En este sistema de identificación de V(n), (n) representa la cantidad de hojas con cuellos visibles. Cada etapa de las hojas se define de acuerdo con la hoja más superior cuyo cuello sea visible (véase *Corn Growth and Development*, 2011. Abendroth, L,

Elmore, R, Boyer, M y Marlay, S, *Iowa State University Press*). "VT" se refiere a la etapa de crecimiento de emergencia de la panoja y no es una etapa vegetativa temprana del maíz.

[00021] En otra forma de realización, se aplican entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 gramos de (*S*)-ABA por hectárea (10000 m^2) al maíz. En una forma de realización preferida, se aplican entre aproximadamente 2 y aproximadamente 75 gramos de (*S*)-ABA por hectárea al maíz.

[00022] En otra forma de realización, se aplican entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 gramos de (*S*)-ABA por hectárea (10000 m^2) a pepino. En una forma de realización preferida, se aplican entre aproximadamente 2 y aproximadamente 75 gramos de (*S*)-ABA por hectárea a pepino.

[00023] En otra forma de realización, se aplican entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 gramos de (*S*)-ABA por hectárea (10000 m^2) a albahaca. En una forma de realización preferida, se aplican entre aproximadamente 2 y aproximadamente 75 gramos de (*S*)-ABA por hectárea a albahaca.

[00024] En aún otra forma de realización, se aplican entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1.000 gramos de GB por hectárea (10000 m^2) a las plantas. En una forma de realización más preferida, se aplican entre aproximadamente 2 y aproximadamente 800 gramos de GB por hectárea a las plantas.

[00025] En otra forma de realización, la aplicación de GB aumenta la actividad de (*S*)-ABA proporcionando así una mayor tolerancia al estrés y un

mayor crecimiento de las plantas.

[00026] En otra forma de realización, ambos (*S*)-ABA y GB se pueden aplicar con un herbicida tal como glifosato, mesotriona, halosulfurón, saflufenacilo o dicamba.

[00027] En otra forma de realización, ambos (*S*)-ABA y GB se pueden aplicar con un fungicida tal como tetraconazol, metconazol, una estrobilurina o un producto combinado de estrobilurina-azol.

[00028] En otra forma de realización, ambos (*S*)-ABA y GB se pueden aplicar con un insecticida tal como metilparatión, bifentrina, esfenvalerato, lorsbano, carbarilo o lanato.

[00029] En aún otra forma de realización, ambos (*S*)-ABA y GB se pueden aplicar con fertilizantes foliares, tales como CoRoN (disponible de Helena Chemical), un nitrógeno de liberación controlada, o BioForge (disponible de Stoller EEUU), que es mayormente N,N'-diformil urea, u otros aerosoles que contienen micronutrientes.

[00030] La mezcla de (*S*)-ABA y GB se puede aplicar mediante cualquier medio conveniente. Los especialistas en el arte están familiarizados con los modos de aplicación que incluyen aplicaciones foliares tales como aplicaciones por aspersión, pulverización y granuladas; aplicaciones al suelo que incluyen aspersión, tratamientos en surco o aplicación lateral.

[00031] En otra forma de realización preferida, la presente invención está dirigida a una composición que comprende (*S*)-ABA y GB, en donde la relación de pesos de (*S*)-ABA:GB es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:33.

[00032] Las soluciones de rociado acuosas utilizadas en la

presente invención contienen en general entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,5% (v/v) de un agente de superficie activa no iónico.

[00033] El agente de superficie activa comprende por lo menos un agente tensioactivo no iónico. En general, el agente tensioactivo no iónico puede ser cualquier agente tensioactivo no iónico conocido en el arte. Los agentes tensioactivos no iónicos adecuados en general son oligómeros y polímeros. Los polímeros adecuados incluyen copolímeros de óxido de alquileno aleatorios y de bloques, tales como copolímeros de bloques de óxido de etileno-óxido de propileno (copolímeros de bloques de EO/PO), que incluyen tanto copolímeros de bloques de EO-PO-EO y PO-EO-PO; copolímeros aleatorios y de bloques de óxido de etileno-óxido de butileno, copolímeros aleatorios y de bloques de aductos de C2-6 alquilo de óxido de etileno-óxido de propileno, copolímeros aleatorios y de bloques de aductos de C2-6 alquilo de óxido de etileno-óxido de butileno, monoalquiléteres de polioxietileno-polioxipropileno, tales como éter metílico, éter etílico, éter propílico, éter butílico o mezclas de los mismos; copolímeros de vinilacetato/vinilpirrolidona; copolímeros de vinilpirrolidona alquilado; polivinilpirrolidona; y polialquilenglicol, incluyendo los polipropilenglicoles y polietilenglicoles. Otros agentes no iónicos son las lecitinas; y agentes de superficie activa de silicona (agentes de superficie activa solubles o dispersables en agua que tienen un esqueleto que comprende una cadena de siloxano, por ejemplo Silwet L77®). Una mezcla adecuada en un aceite mineral es ATPLUS® 411.

[00034] Según se usa en la presente, una “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de *(S)*-ABA y/o GB que mejorará el crecimiento, la tolerancia al estrés por sequía, la tolerancia al estrés por frío y/o el

rendimiento. La “cantidad eficaz” varía dependiendo de las concentraciones de (*S*)-ABA y GB, la especie o variedad vegetal bajo tratamiento, la severidad del estrés, el resultado deseado y la etapa de vida de las plantas, entre otros factores. Por consiguiente, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una “cantidad eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un especialista en el arte.

[00035] Según se usa en la presente, “mejorar” significa que la planta tiene más de la calidad de la que tendría la planta si no hubiera sido tratada mediante los métodos de la presente invención.

[00036] Según se usa en la presente, todos los valores numéricos relativos a cantidades, porcentajes en peso y semejantes, se definen como “alrededor de” o “aproximadamente” cada valor particular, es decir más o menos un 10% (± 10%). Por ejemplo, la frase “por lo menos 5% en peso” se interpretará como “por lo menos entre 4,5% y 5,5% en peso”. Por ello, las cantidades dentro del 10% de los valores reivindicados están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones.

[00037] Los artículos “un”, “una”, “el” y “la” pretenden incluir el plural así como el singular, a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

[00038] Las formas de realización divulgadas son simplemente ejemplos de formas de realización de los conceptos de la invención que se divulga en la presente y no deben considerarse como limitantes, a menos que en las reivindicaciones se definan de otra manera.

[00039] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente

invención y ofrecer instrucciones a un especialista en el arte sobre la manera de usar las formulaciones de la invención. No pretenden ser limitantes en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[00040] A fin de determinar la capacidad de la glicina betaína ("GB") para conferir termotolerancia, tanto sola como en combinación con ácido (S)-abscísico ("(*S*)-ABA"), se condujeron ensayos de tolerancia al enfriamiento (es decir, al frío) usando plántulas de albahaca de hoja grande italiana (*Ocimum basilicum*). Se esterilizaron semillas de albahaca en una solución de etanol que contiene 0,16% del fungicida Maxim®XL (21% fludioxonil y 8,4% mefenoxam) (Maxim es una marca comercial registrada y se encuentra disponible de Syngenta Corporation). Las semillas esterilizadas se hicieron germinar sobre ½ x de medio de sales basales de Murashige y Skoog, suplementado con vitaminas de Gamborg 1x y 0,6% de Phytagar, y se dispusieron en placas de 24 pocillos. Las placas con las semillas sembradas se sellaron con cinta quirúrgica y se colocaron en una cámara de crecimiento con corridas de ciclos diurnos de 12 horas de luz a 24 °C y 12 horas de oscuridad a 19 °C. Se dejó que las plántulas germinaran y crecieran durante cinco días.

[00041] Después de cinco días, se agregaron soluciones concentradas de GB y/o (*S*)-ABA como un recubrimiento en 0,4% de Phytagar. Las placas se volvieron a sellar y se colocaron nuevamente en la cámara de crecimiento durante 48 horas. Después de 48 horas, las placas fueron transferidas a una cámara con ajustes de luz idénticos, pero con la temperatura

definida en 6 °C durante el día y 2 °C a la noche. Las plántulas fueron sometidas a estrés por enfriamiento durante seis días, después de lo cual fueron transferidas nuevamente a la cámara de temperatura ambiente, y se calificaron después de un período de recuperación de seis días.

[00042] Los pocillos individuales contenían las cantidades indicadas de GB y/o (*S*)-ABA. Se prepararon soluciones madre de (*S*)-ABA en dimetilsulfóxido ("DMSO") y la concentración final de DMSO en todos los pocillos era del 0,5%. Los pocillos de control positivo contenían una concentración final de 20 ppm de (*S*)-ABA (~20 mg/l) y 0,5% de DMSO; los pocillos de control negativo contenían 0,5% de DMSO. La GB se evaluó por separado a concentraciones de 0, 3.000, 10.000, 30.000 y 100.000 miligramos por litro ("mg/l".) Para evaluar si había una interacción sinérgica entre GB y (*S*)-ABA, la glicina betaína se agregó al medio a concentraciones de 0, 1.000, 3.000, 10.000 y 30.000 mg/l, en tanto el (*S*)-ABA se mantuvo a una concentración de 3 mg/l. Después seis días de estrés por enfriamiento y seis días de recuperación, las plántulas fueron calificadas según la cantidad de tejido necrótico y dañado, la indicación primaria de estrés por enfriamiento en plántulas de albahaca. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Protección con GB y (*S*)-ABA contra lesiones por enfriamiento en plántulas de albahaca

Formulación	GB (mg/l)	(*S*)-ABA 0 mg/l	(*S*)-ABA 3 mg/l
1	0	—	+
2	1,000	NR	+
3	3,000	—	++
4	10,000	+	++
5	30,000	++	++
6	100,000	+	NR

"NR" indica que no se registraron datos

"—" significa lesiones por enfriamiento extensas

"+"significa lesiones por enfriamiento moderadas

"++" significa poca o ninguna lesión por enfriamiento; equivalente a 20 ppm de (*S*)-ABA solamente

[00043] Según se demuestra, GB a 30,000 mg/l permite proveer una protección equivalente a ~20 mg/l de (*S*)-ABA a las plántulas de albahaca. Sin embargo, cuando se combinan GB y (*S*)-ABA solamente se requieren aproximadamente 1/10 de la cantidad de GB y 1/6 de la cantidad de (*S*)-ABA para proporcionar una protección equivalente a cualquiera de ellos por separado. Aunque el análisis de los datos sugiere que puede haber un efecto mayor que un efecto aditivo de la combinación de GB y (*S*)-ABA, se condujeron estudios adicionales para evaluar las interacciones en estas composiciones.

Ejemplo 2

[00044] Se condujo un estudio de laboratorio en Long Grove, Illinois. Se sembraron semillas de pepino (*Cucumis sativa* var. *Straight Eight*) en tierra para macetas Pro-Mix® BX (Pro-Mix es una marca comercial registrada y está disponible de Premier Horticulture Ltd.) y las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento CONVIRON® a 25 °C con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). A los 15 días después de la siembra, las plantas fueron sometidas a rociados con un rociador para pintura Preval® manual. Todas las soluciones de rociado se efectuaron en agua desionizada y se agregó un agente tensioactivo no iónico a todas las soluciones de rociado a 0,05% (v/v). A las 48 horas de postrociado, las plantas se movieron a una cámara de crecimiento CONVIRON® y fueron sometidas a una temperatura de 4 °C durante 48 horas con un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad). Tras

retirarlas de la cámara de frío, las plantas se volvieron a colocar en una cámara de crecimiento CONVIRON® definida en 25 °C con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Las plantas fueron calificadas visualmente por el daño debido a enfriamiento a 72 horas de postenfriamiento. Cada tratamiento se repitió siete veces. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2: Daño a las 72 horas de postenfriamiento en pepino después del tratamiento por rociado con (*S*)-ABA, GB o la combinación

Tratamiento	**Relación de GB:ABA**	**% de área foliar dañada**	**Factor de sinergia**
Control	0	76,4	n/d
(*S*)-ABA 300 mg/l	0:1	52,9	n/d
GB 300 mg/l	1:0	84,3	n/d
GB 1.000 mg/l	1:0	82,1	n/d
GB 3.000 mg/l	1:0	46,4	n/d
GB 300 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	1:1	10,7	3,74
GB 1.000 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	3,3:1	25,0	2,68
GB 3.000 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	10:1	18,6	1,24

[00045] Según se demuestra en la Tabla 2, las mezclas de la presente invención a una relación de entre 1:1 y 10:1 de GB:(*S*)-ABA mostraron un efecto más que aditivo en la prevención de daños debidos al estrés por frío. El Solicitante pudo determinar, usando la siguiente fórmula, que la respuesta a la relación de GB:(*S*)-ABA era sinérgica, en donde se calcula un factor de sinergia con el método de Abbott:

$$\%C_{esp} = A + B - (AB/100),$$

donde $\%C_{esp}$ es la eficacia esperada y “en donde A y B son el aumento de los niveles de crecimiento (o resistencia al estrés) obtenido con cada uno de los [reguladores del crecimiento vegetales] individuales. Si la relación entre la

eficacia observada experimentalmente de la mezcla C_{obs} y la eficacia esperada de la mezcla es mayor que 1, se puede confirmar la existencia de interacciones sinérgicas en la mezcla" (Gisi, *Synergistic Interaction of Fungicides in Mixtures*, *The American Phytopathological Society*, 86: 11, 1273-1279,1996). A fin de ser conservador, el Solicitante ha definido el factor de sinergia mínimo en 1.1 en todos los Ejemplos. El Solicitante determine la presencia de sinergia en las siguientes relaciones de GB:(*S*)-ABA:1:1 (factor de sinergia 3,74); 3,3:1 (factor de sinergia 2,68) y 10:1 (factor de sinergia 1,24).

Ejemplo 3

[00046] Se condujo un estudio de laboratorio en Long Grove, Illinois. Se sembraron semillas de albahaca dulce italiana en tierra para macetas Pro-Mix® BX y las plantas se cultivaron a temperatura ambiente bajo luces fluorescentes frías-blancas con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). A los 22 días después de la siembra, las plantas fueron sometidas a rociados con un rociador para pintura Preval® manual. A las 48 horas de postrociado, las plantas se movieron a una cámara de crecimiento CONVIRON® y fueron sometidas a una temperatura de 4 °C durante 72 horas con un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad). Tras retirar las plantas de la cámara fría, las plantas se devolvieron al laboratorio y se colocaron nuevamente bajo las lámparas fluorescentes blancas frías hasta que fueron calificadas visualmente por el daño debido al enfriamiento a las 24 horas y 72 horas de postenfriamiento. Cada tratamiento se repitió siete veces. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3: Daño por enfriamiento de albahaca dulce italiana después del tratamiento por rociado con (*S*)-ABA, GB o la combinación

Tratamiento	Relación	% de área foliar dañada	Factor de

	de GB:ABA			sinergia	
		24 h de postenfriamiento	**72 h de postenfriamiento**	**24 hs**	**72 hs**
Control	0	63	73	n/d	n/d
(*S*)-ABA 300 mg/l	0:1	12	27	n/d	n/d
(*S*)-ABA 1.000 mg/l	0:1	6	14	n/d	n/d
GB 3.000 mg/l	1:0	67	79	n/d	n/d
GB 20.000 mg/l	1:0	45	65	n/d	n/d
GB 3.000 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	10:1	5	14	1,15	1,26
GB 20.000 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	66,7:1	39	60	0,44	0,32

[00047] Según se demuestra en Tabla 3, las mezclas de la presente invención a una relación de 10:1 de GB:(*S*)-ABA mostraron más que un efecto aditivo en la prevención de daños debidos al estrés por frío, en tanto la relación de 66,7:1 ni siquiera confería una protección aditiva. Con el método de Abbot que se describió antes en el Ejemplo 2, el Solicitante determinó que la respuesta a la relación 10:1 de GB:(*S*)-ABA era sinérgica (factor de sinergia 1,15 a las 24 horas y 1,26 a las 72 horas), pero no a la relación de 66,7:1 de GB:(*S*)-ABA (factor de sinergia 0,44 a las 24 horas y 0,32 a las 72 horas).

Ejemplo 4

[00048] Se condujo un estudio de laboratorio en Long Grove, Illinois. Se sembraron semillas de albahaca dulce italiana en tierra para macetas Pro-Mix® BX y las plantas se cultivaron a temperatura ambiente bajo luces fluorescentes frías-blancas con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). A los 22 días después de la siembra, las plantas fueron sometidas a rociados con un rociador para pintura Preval® manual. A las 48 horas de postrociado, las plantas se movieron a una cámara de crecimiento CONVIRON® y fueron sometidas a una temperatura de 4 °C durante 72 horas con un fotoperíodo de

12:12 (luz:oscuridad). Tras retirar las plantas de la cámara fría, las plantas se devolvieron al laboratorio y se colocaron nuevamente bajo las lámparas fluorescentes blancas frías hasta que fueron calificadas visualmente por el daño debido al enfriamiento a las 24 horas y 120 horas de postenfriamiento. Cada tratamiento se repitió siete veces. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4: Daño por enfriamiento de albahaca dulce italiana después del tratamiento por rociado con (*S*)-ABA, GB o la combinación

Tratamiento	**Relación de GB:ABA**	**% de área foliar dañada**		**Factor de sinergia**	
		24 h de postenfriamiento	**120 h de postenfriamiento**	**24 hs**	**120 hs**
Control	0	46,67	65,00	N/D	N/D
(*S*)-ABA 300 mg/l	0:1	23,00	41,00	N/D	N/D
(*S*)-ABA 1.000 mg/l	0:1	11,67	21,67	N/D	N/D
GB 10.000 mg/l	1:0	39,17	56,67	N/D	N/D
GB 30.000 mg/l	1:0	40,00	50,00	N/D	N/D
GB 10.000 mg/l + (*S*)-ABA 300 mg/l	33:1	10,00	20,00	1,34	1,54
GB 30.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	100:1	31,67	47,50	0,56	0,52

[00049] Según se demuestra en Tabla 4, las mezclas de la presente invención a una relación de 33:1 de GB:(*S*)-ABA mostraron más que un efecto aditivo en la prevención de daños debidos al estrés por enfriamiento, en tanto la relación de 100:1 ni siquiera confería una protección aditiva. Con el método de Abbot que se describió antes en el Ejemplo 2, el Solicitante determinó que la respuesta a la relación 33:1 de GB:(*S*)-ABA era sinérgica (factor de sinergia 1,34 a las 24 horas y 1,54 a las 120 horas), pero no a la

relación de 100:1 de GB:(*S*)-ABA (factor de sinergia 0,56 a las 24 horas y 0,52 a las 120 horas).

Ejemplo 5

[00050] Se condujo un estudio en invernadero en Long Grove, Illinois. Se sembraron semillas de una variedad híbrida comercial en macetas de tres litros Pro-Mix® BX. Los invernaderos se mantuvieron a 25 ± 3 °C con un fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad), con iluminación al nivel del dosel de canopia de ~250 µmoles m-2 s-1. El maíz se fertilizó típicamente con Peters 21-5-20 + micronutrientes, nitrato de calcio y amonio y sulfato de magnesio. Los índices de crecimiento típicos para el maíz bajo estas condiciones variaban en un rango de entre 4 y 5 centímetros por día.

[00051] En este estudio, se utilizaron aplicaciones por rociado al maíz en la etapa V4. Estas aplicaciones se efectuaron con un rociador por surcos equipado con una boquilla 4001E Teejet® (Teejet se encuentra disponible y es una marca comercial registrada de Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL, EEUU) y se aplicaron a 40 libras por pulgada cuadrada (28122,8 kg/m^2) y a 30 galones/acre (0,028 L/m^2) de solución de rociado. Después de las aplicaciones por rociado, las plantas se volvieron a colocar en el invernadero.

[00052] A los 3 y 4 días después de la aplicación por rociado, se midió la conductancia de los estomas de la 4ª hoja verdadera usando un medidor de fotosíntesis Licor Modelo 6400 XT (Licor, Lincoln, Nebraska) empleado de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para facilitar el análisis, los valores de conductancia de los estomas se expresan como un porcentaje del control en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: Conductancia de los estomas de maíz después del rociado

Tratamiento	**Relación de GB:ABA**	**% de conductancia control**		**Factor de sinergia**	
Días de postrociado	**n/d**	**3 días**	**4 días**	**3 días**	**4 días**
Control	n/d	100	100	n/d	n/d
ABA 100 mg/l	0:1	81,3	91,8	n/d	n/d
ABA 300 mg/l	0:1	73,6	88,7	n/d	n/d
ABA 1.000 mg/l	0:1	76,5	95,9	n/d	n/d
ABA 3.000 mg/l	0:1	55,3	77,5	n/d	n/d
GB 1.000 mg/l	0:1	86,2	97,9	n/d	n/d
GB 1.000 mg/l + ABA 100 mg/l	10:1	60,2	84,3	1,33	1,54
GB 1.000 mg/l + ABA 300 mg/l	3,3:1	53,1	71,5	1,28	2,17
GB 1.000 mg/l + ABA 1.000 mg/l	1:1	52,7	64,8	1,39	5,72
GB 1.000 mg/l + ABA 3.000 mg/l	0,33:1	47,3	74,5	1,01	1,05

[00053] Según se demuestra en Tabla 5, las mezclas de la presente invención a relaciones de 10:1, 3,3:1 y 1:1 de GB:(*S*)-ABA mostraron más que un efecto aditivo en la disminución de la conductancia de los estomas, en tanto la relación de 0,33:1 ni siquiera confería una disminución aditiva. Con el método de Abbot que se describió antes en el Ejemplo 2, el Solicitante determine la presencia de sinergia a las siguientes relaciones de GB:(*S*)-ABA: 10:1 (factor de sinergia de 1,33 a los 3 días de postrociado ("DPS") y 1,54 a los 4 DPS); 3,3:1 (factor de sinergia de 1,28 a los 3 DPS y 2,17 a los 4 DPS); y 1:1 (factor de sinergia de 1,39 a los 3 DPS y 5,72 a los 4 DPS), pero no a la relación de 0,33:1 (factor de sinergia de 1,01 a los 3 DPS y 1,05 a los 4 DPS). Por lo tanto, se requiere una relación de por lo menos 1:1 de GB-(*S*)-ABA para que la mezcla muestres disminuciones sinérgicas en la conductancia de los estomas.