

MÉTODO PARA PRESERVAR LA VIABILIDAD DEL POLEN DE MAÍZ BAJO ESTRÉS TÉRMICO

La presente invención se refiere a un método para mejorar la viabilidad del polen en plantas de maíz, especialmente bajo estrés térmico, utilizando un hidrolizado de proteínas.

El maíz (*Zea mays*), también conocido como elote, es uno de los cultivos más extendidos en la agricultura mundial. Se cultiva para el consumo humano, la alimentación animal, el etanol de maíz y otros productos derivados del maíz, tales como el almidón y el jarabe de maíz.

Los hidrolizados de proteínas son una clase emergente de productos de gestión de cultivos utilizados en la agricultura para mejorar la asimilación de nutrientes y mitigar el estrés de los cultivos. Los hidrolizados de proteínas se fabrican mediante la hidrólisis ácida o básica de proteínas vegetales o animales. El hidrolizado es generalmente una mezcla de aminoácidos libres, péptidos cortos y péptidos largos, dependiendo de las condiciones de hidrólisis. Se sabe que tienen ciertos efectos bioestimulantes cuando se aplican a las plantas. Se proporciona una reseña de algunos de estos en *Front. Plant Sci.*, 22 de diciembre de 2017 disponible en <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>.

La viabilidad del polen es su capacidad para transferir los gametos masculinos producidos por ellos al saco embrionario para la polinización y puede medirse mediante la integridad de la membrana utilizando un citómetro de flujo de impedancia (Analizador de Polen marca Amphasys Z32). El éxito de la polinización requiere un polen viable; sin embargo, la viabilidad del polen puede verse afectada negativamente por factores externos, tales como el estrés térmico o la sequía.

Actualmente hemos descubierto que los hidrolizados de proteínas aplicados al maíz tienen el sorprendente efecto de mejorar la viabilidad del polen bajo estrés térmico, un efecto del que no se había informado anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para mejorar la viabilidad del polen de una planta de maíz que comprende tratar una planta de maíz, o el locus de la misma, con un hidrolizado de proteínas. Preferiblemente, el método se lleva a cabo en una planta de maíz que posteriormente se somete a estrés térmico.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un proceso de aplicación de un hidrolizado de proteínas a una planta de maíz, o al locus de la misma, con el fin de mejorar la viabilidad del polen. Preferiblemente, el proceso se lleva a cabo con el fin de mejorar la viabilidad del polen bajo estrés térmico. También se proporciona el uso de un hidrolizado de proteínas para preservar la viabilidad del polen de una planta de maíz.

Preferiblemente, el hidrolizado de proteínas es de una fuente animal, tal como el colágeno. Muchos hidrolizados de proteínas están disponibles comercialmente, y un lisado de proteínas particularmente preferido es ISABION (número CAS 9015-54-7; número EC 310-296-6), disponible de Syngenta Crop Protection AG. Se presenta en forma de suspensión concentrada de 100 g/l de aminoácidos totales en agua. El ISABION se compone de aminoácidos libres (11%) y péptidos (52%), que juntos representan el 62.5% del total de aminoácidos.

El hidrolizado de proteínas puede utilizarse en forma no modificada o junto con adyuvantes empleados convencionalmente en la técnica de formulación. Generalmente se suministran en forma de concentrados en suspensión que se diluyen con agua antes de su uso. Típicamente, los concentrados contienen entre 50 y 250 g/l de hidrolizado de proteínas con base en el contenido total de aminoácidos. Preferiblemente, estos concentrados se diluyen con agua antes de su uso en un factor de 10 a 50, de forma que la disolución final de pulverización comprenda entre 0.1 y 1 g/l de hidrolizado de proteínas, preferiblemente de 0.2 a 0.5 g/l, con base en el contenido total de aminoácidos.

Por estrés térmico se entienden aquellas condiciones en las que las temperaturas promedio del ambiente en el que crece el maíz están significativamente por encima de las normalmente esperadas, por ejemplo, más de 5 °C, especialmente más de 8 °C por encima de las temperaturas normalmente esperadas. Ejemplos de condiciones de estrés térmico son temperaturas diurnas superiores a 30 °C, especialmente superiores a 35 °C, y temperaturas nocturnas superiores a 20°C, especialmente superiores a 23 °C.

La aplicación del hidrolizado de proteínas puede realizarse mediante pulverización agrícola convencional. Las dosis típicas de aplicación del hidrolizado proteínico son de 0.5 a 5 litros/ha, más típicamente de 1 a 2 litros/ha de disolución final de pulverización.

El hidrolizado de proteínas puede aplicarse simultáneamente junto con otros productos agroquímicos o fertilizantes, por ejemplo, herbicidas, fungicidas o insecticidas selectivos para el maíz.

Existen dos etapas principales de crecimiento del maíz, las etapas vegetativas (V) y las reproductivas (R).

Tabla 1: Etapas vegetativas del maíz:

Etapa vegetativa	Descripción y tiempo tras la plantación*
VE (Emergencia)	Puede producirse de cuatro a cinco días después de la plantación en condiciones ideales, pero hasta dos semanas o más en condiciones frescas o secas.

5	V1-V5	En V1, aparece la primera hoja con cuello y punta redondeada; se desarrollan raíces nodales. El número de hojas con cuello aumenta. Para V2, la planta mide de 2 a 4 pulgadas de alto y depende de la energía de la semilla. Número de filas de granos que se está determinando. Las raíces nodales toman el control del sistema radicular seminal.
10	V6-V8	Crecimiento hasta o justo por encima de la superficie del suelo. Pueden verse brotes y retoños. Nueva hoja con cuello cada 4 o 5 días. Las hojas inferiores pueden dejar de ser visibles.
15	V9-V11	Aproximadamente de seis a ocho semanas después de VE, alargamiento rápido del entrenudo peduncular. La espiguilla está a punto de comenzar a desarrollarse. Rápido desarrollo de las raíces
20	V12-V-ésimo	Número de granos por fila que se determina entre V12 y V17. Continúa la rápida elongación del tallo. Aumento constante de la acumulación de nutrientes y peso seco (a partir de V10). Etapa de hoja nueva cada 2 o 3 días.
25	VT	Emergencia de la espiguilla - La espiguilla se extiende por encima de la última hoja. La última rama de la espiguilla es visible. Se alcanza la altura total de la planta. El desprendimiento de polen (antesis) comienza poco después de que la espiguilla del maíz esté completamente emergida del verticilo. Las espiguillas cercanas al eje principal de la espiguilla son las primeras en abrirse, dejando al descubierto las anteras que llevan los granos de polen. Aproximadamente 2 a 3 días desde la emergencia de cabellos (R1)

*Representa un crecimiento normal del maíz con base en una temperatura y humedad favorables. Las temperaturas más frías pueden ralentizar el crecimiento, mientras que las temperaturas más cálidas pueden aumentar la tasa de crecimiento y reducir el tiempo entre las fases foliares.

En una realización, se proporciona un método para preservar la viabilidad del polen de una planta de maíz que comprende tratar la planta de maíz, o el locus de la misma, con un hidrolizado de proteínas. Se proporciona además un método en donde la planta de maíz se somete a estrés térmico. En una realización, el estrés térmico es una temperatura diurna superior a 30 °C, y preferiblemente superior a 35 °C. En una realización, el estrés térmico es una temperatura diurna superior a 40 °C.

En otra realización, el estrés térmico es una temperatura nocturna superior a 20 °C, y preferiblemente superior a 23 °C. En una realización, el estrés térmico es una temperatura nocturna superior a 26 °C.

5 En una realización, el hidrolizado de proteínas se aplica a una planta de maíz, o al locus de la misma, durante la fase vegetativa de crecimiento. Preferiblemente, el hidrolizado de proteínas se aplica a una planta de maíz, o al locus de la misma, durante las fases de crecimiento vegetativo V9-V11.

10 El maíz incluye tanto variedades convencionales como aquellas que se han vuelto tolerantes a herbicidas como bromoxinilo o clases de herbicidas (tal como, por ejemplo, inhibidores de HPPD, inhibidores de ALS, por ejemplo primisulfurón, prosulfurón y trifloxisulfurón, inhibidores de EPSPS (5-enol-pirovil-shikimato-3-fosfato-sintasa), inhibidores de GS (glutamina sintetasa) o inhibidores de PPO (protoporfirinógeno-oxidasa)) como resultado de métodos convencionales de reproducción o ingeniería genética. Entre los ejemplos de maíz que se ha vuelto tolerante a herbicidas o clases de herbicidas mediante
15 métodos de ingeniería genética se incluyen las variedades de maíz resistentes al glifosato y al glufosinato disponibles comercialmente con los nombres comerciales RoundupReady®, Herculex I® y LibertyLink®.

20 El maíz también incluye aquellas variedades que han sido transformadas mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que son capaces de sintetizar una o más toxinas de acción selectiva, tal como se conocen, por ejemplo, de bacterias productoras de toxinas, especialmente aquellas del género *Bacillus*.

Ejemplos de este tipo de plantas son: YieldGard® (variedad de maíz que expresa una toxina CryIA(b)); YieldGard Rootworm® (variedad de maíz que expresa una toxina CryIIIB(b1)); YieldGard Plus® (variedad de maíz que expresa una toxina CryIA(b) y una toxina CryIIIB(b1)); Starlink® (variedad de maíz que expresa una toxina Cry9(c)); Herculex I®
25 (variedad de maíz que expresa una toxina CryIF(a2) y la enzima fosfotransferasa N-acetiltransferasa (PAT) para lograr la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio); Agrisure® CB Advantage (rasgo del gusano barrenador del maíz (CB) Bt11), Agrisure® RW (rasgo del gusano de la raíz del maíz) y Protecta®.
30

El maíz también incluye las variedades que han sido transformadas mediante el uso de técnicas de ADN recombinante de forma que sean capaces de sintetizar una o más toxinas de acción selectiva, tal como se conocen, por ejemplo, de bacterias productoras de toxinas, especialmente aquellas del género *Bacillus*.

35 Las toxinas que pueden ser expresadas por dichas plantas transgénicas incluyen, por ejemplo, proteínas insecticidas de *Bacillus cereus* o *Bacillus popilliae*; o proteínas insecticidas

de *Bacillus thuringiensis*, tales como las δ -endotoxinas, por ejemplo, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry1Fa2, Cry2Ab, Cry3A, Cry3Bb1 o Cry9C, o proteínas insecticidas vegetativas (Vip), por ejemplo, Vip1, Vip2, Vip3 o Vip3A; o proteínas insecticidas de bacterias colonizadoras de nematodos, por ejemplo, *Photorhabdus* spp. o *Xenorhabdus* spp, tal como *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophilus*; toxinas producidas por animales, tales como toxinas de escorpión, toxinas de arácnidos, toxinas de avispa y otras neurotoxinas específicas de insectos; toxinas producidas por hongos, tales como lectinas de plantas, tales como lectinas de guisantes, lectinas de cebada o lectinas de campanillas de invierno; aglutininas; inhibidores de proteinasas, tales como inhibidores de tripsina, inhibidores de serina proteasa, patatina, cistatina, inhibidores de papaína; proteínas inactivadoras del ribosoma (RIP), tales como ricina, RIP de maíz, abrina, luffina, saporina o briodina; enzimas del metabolismo de los esteroides, tales como 3-hidroxiesteroidoxidasas, ecdisteroide-UDP-glicosil-transferasa, colesterol-oxidasas, inhibidores la ecdisona, HMG-COA-reductasa, bloqueadores de canales iónicos, tales como bloqueadores de canales de sodio o calcio, hormona juvenil esterasa, receptores de hormona diurética, estilbeno sintasa, bibencil sintasa, quitinasas y glucanasas.

Además, en el contexto de la presente invención debe entenderse por δ -endotoxinas, por ejemplo, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry1Fa2, Cry2Ab, Cry3A, Cry3Bb1 o Cry9C, o proteínas insecticidas vegetativas (Vip), por ejemplo, Vip1, Vip2, Vip3 o Vip3A, expresamente también toxinas híbridas, toxinas truncadas y toxinas modificadas. Las toxinas híbridas se producen de forma recombinante mediante una nueva combinación de diferentes dominios de esas proteínas (véase, por ejemplo, WO 02/15701). Se conocen toxinas truncadas, por ejemplo, una toxina Cry1Ab truncada. En el caso de las toxinas modificadas, se reemplazan uno o más aminoácidos naturales de la toxina. En tales sustituciones de aminoácidos, preferiblemente se insertan en la toxina secuencias de reconocimiento de proteasas no presentes de forma natural, tal como, por ejemplo, en el caso de Cry3A055, se inserta una secuencia de reconocimiento de catepsina-G en una toxina Cry3A (véase WO 03/018810).

Ejemplos de tales toxinas o de maíz transgénico capaz de sintetizarlas se divulgan, por ejemplo, en EP-A-0 374 753, WO93/07278, WO95/34656, EP-A-0 427 529, EP-A-451 878 y WO 03/052073.

La toxina contenida en las plantas transgénicas confiere a las plantas tolerancia a los insectos dañinos. Tales insectos pueden pertenecer a cualquier grupo taxonómico de insectos, pero se encuentran de manera especialmente común en los escarabajos (coleópteros), insectos de dos alas (dípteros) y mariposas (lepidópteros).

Las plantas transgénicas que contienen uno o más genes que codifican una resistencia insecticida y expresan una o más toxinas son conocidas y algunas de ellas están disponibles comercialmente. Ejemplos de este tipo de plantas son: YieldGard® (variedad de

maíz que expresa una toxina Cry1Ab); YieldGard Rootworm® (variedad de maíz que expresa una toxina Cry3Bb1); YieldGard Plus® (variedad de maíz que expresa una toxina Cry1Ab y una toxina Cry3Bb1); Starlink® (variedad de maíz que expresa una toxina Cry9C); Herculex I® (variedad de maíz que expresa una toxina Cry1Fa2 y la enzima fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) para lograr la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio); NatureGard®, Agrisure® GT Advantage (rasgo de tolerancia al glifosato GA21), Agrisure® CB Advantage (rasgo del gusano barrenador del maíz (CB) Bt11) y Protecta®.

Ejemplos adicionales de estos cultivos transgénicos son el maíz Bt11 de Syngenta, el maíz Bt176 de Syngenta, el maíz MIR604 de Syngenta, el maíz MON 863 de Monsanto, el maíz 1507 de Pioneer, el maíz NK603 × MON 810 de Monsanto.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención. En los ejemplos se utiliza un hidrolizado de proteínas comercial ISABION disponible de Syngenta Crop Protection AG. ISABION tiene las características técnicas que se muestran en la Figura 1 (Composición general de ISABION), Figura 2 (Composición de aminoácidos de ISABION) y Figura 3 (Hidrólisis de ISABION).

1. Método

ISABION se aplicó a cinco variedades diferentes de plantas de maíz ANA1416, CNA1124, AA2359, DAX3360 e ITPJ8713. El ISABION se aplicó mediante pulverización en 2 dosis correspondientes a 1 litro de ISABION por hectárea y 2 litros de ISABION por hectárea con un volumen de pulverización de 200 L/ha y se utilizaron plantas de maíz no tratadas idénticas como un estándar de comparación. El momento de aplicación es entre las fases de crecimiento vegetativo V9-11. Se realizaron tres repeticiones para cada aplicación. En la antesis (fase de desprendimiento de polen - VT), se seleccionaron aleatoriamente 5 espiguillas por repetición y se midió la viabilidad del polen con un analizador de polen Amphasis Z32 como D0 (tras el muestreo de campo). A continuación, las espiguillas se dividieron en 2 modalidades, una como "D24" sin estrés en condiciones de 28 °C/18 °C (temperatura diurna/nocturna), 60% de HR (humedad relativa) con fotoperiodo de 14 horas. Otra como "ESTRÉS D24" para el tratamiento de estrés térmico en la cámara de crecimiento. Las condiciones de estrés térmico se fijaron en 40 °C/26 °C (temperatura diurna/nocturna), 60% de HR (humedad relativa) con fotoperíodo de 14 horas. A continuación, se midió la viabilidad del polen del maíz sometido a estas dos modalidades.

2. Resultados

Los resultados muestran claramente que ISABION mejora la viabilidad del polen en estas pruebas. En el caso de la línea de maíz ANA1416, tolerante al calor, no se observaron

diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos en las condiciones D24 y ESTRÉS D24 (véase la Figura 4). Mientras que para la variedad temprana, los tratamientos de ISABION a 1 L/ha (D1) y 2 L/ha (D2) de líneas tolerantes al calor AA2359 (Figura 5), CNA1124 (Figura 6) y DAX3360 (Figura 7) mostraron un porcentaje significativamente mayor de viabilidad del polen en comparación con las no tratadas (NT) bajo D24 ESTRÉS, se observaron menores efectos del estrés térmico con la variedad tardía, línea tolerante al calor ITPJ8713 (Figura 8) en donde D24 ESTRÉS mostró una mayor viabilidad del polen que D24 (sin estrés térmico). Esto puede deberse al impacto de las condiciones meteorológicas en la variedad tardía. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento de la viabilidad del polen con los dos tratamientos de ISABION en comparación con el no tratado (NT).

15

20

25

30

35