

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen L-carnitina y extracto de algas marinas para mitigar el estrés abiótico en las plantas

5 Campo técnico

Esta divulgación se relaciona generalmente con el campo de los procedimientos y las composiciones para mitigar el estrés abiótico en las plantas.

10 Antecedentes de la técnica

Actualmente se usan varias estrategias para mitigar los efectos de diferentes formas de estrés abiótico en las plantas. Muchos de estos están dirigidos a mitigar físicamente el efecto de factores estresantes específicos, por ejemplo, la aplicación de agua o material de protección para hacer frente a las temperaturas extremas o la intensidad de la luz. Otros enfoques implican la ingeniería genética de plantas para que sean más resistentes al estrés, tal como la salinidad elevada o las temperaturas extremas.

Estos tipos de medidas pueden requerir mucha mano de obra y, en consecuencia, ser costosas, solo pueden ser útiles para mitigar los efectos de factores estresantes específicos y/o solo pueden ser aplicables a especies de plantas específicas.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de procedimientos, compuestos y composiciones alternativos que sean eficaces para mitigar el impacto del estrés abiótico en las plantas, al mismo tiempo que sean sostenibles, rentables y fáciles de usar a través de las prácticas agrícolas actuales.

Divulgado en la presente memoria, la presente invención supera las deficiencias anteriores en la técnica al proporcionar nuevas composiciones y procedimientos para el tratamiento y mitigación de estrés abiótico en plantas.

30 Sumario de la invención

Un procedimiento para prevenir o mitigar los efectos del estrés abiótico en una planta con la condición de que incluye administrar a la planta, una semilla de la planta, o al medio de cultivo de la planta, una cantidad efectiva de una combinación que comprende L-carnitina y un extracto de algas marinas.

También se proporciona una composición bioestimulante de plantas que tiene como ingredientes activos L-carnitina y un extracto de algas marinas.

En una realización, el procedimiento comprende administrar 50-800 g de L-carnitina por tonelada de semilla y administrar 50-800 g de extracto de algas marinas por tonelada de semilla.

En algunas realizaciones, el alga utilizada para producir el extracto es de la clase *Phaeophyceae*, en algunas realizaciones de la especie *Ascophyllum nodosum*. El extracto de algas marinas puede producirse mediante el uso de una extracción por hidrólisis alcalina.

En algunas realizaciones, la combinación consiste o consiste esencialmente en L-carnitina y extracto de algas marinas y, opcionalmente, agua.

En algunas realizaciones, la planta es un cereal o leguminosa, opcionalmente, trigo, maíz o soja.

En algunas realizaciones, la relación en peso de la L-carnitina al extracto de algas marinas utilizado en la composición o el procedimiento está entre 10:1 y 1:10, opcionalmente entre 2:1 y 1:2, en algunas realizaciones, aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la composición es una composición acuosa que contiene de 100 a 250 g/l de extracto de algas marinas y de 100 a 250 g/l de L-carnitina.

También se proporciona un tratamiento de semillas que incluye una composición como se define en la presente memoria. En una realización, la L-carnitina y el extracto de algas marinas están ambos en forma de partículas.

También se proporciona un kit que incluye un primer envase que contiene L-carnitina y un segundo envase que contiene extracto de algas marinas y las instrucciones para combinar la L-carnitina y el extracto de algas marinas para producir una cantidad efectiva de una composición bioestimulante de plantas. La composición bioestimulante de plantas es adecuadamente una composición bioestimulante de plantas como la definida anteriormente.

En uso, el procedimiento, el bioestimulante o la composición de semillas pueden prevenir o mitigar uno o más de los indicios de estrés abiótico identificados en la presente memoria.

65 Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 proporciona un ejemplo de vigor mejorado 21 días después de la siembra en las semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con el extracto de *Ascophyllum nodosum* (ANE), L-carnitina (CAR), o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 1.
- 5 La Figura 2 proporciona un ejemplo de vigor mejorado 42 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia, de acuerdo con el Ejemplo 1.
- 10 La Figura 3 proporciona un ejemplo de aumento del peso fresco foliar 50 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se someten a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 1.
- 15 La Figura 4 proporciona un ejemplo de aumento del peso fresco de la raíz 50 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se someten a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 1.
- 20 La Figura 5 proporciona un ejemplo de aumento de la altura de la planta 22 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por salinidad (riego con 8 g/l de NaCl) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 25 La Figura 6 proporciona un ejemplo de aumento de la altura de la planta 35 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por salinidad (riego con 8 g/l de NaCl) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 30 La Figura 7 proporciona un ejemplo de aumento del contenido relativo de clorofila (SPAD) 29 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se someten a estrés por salinidad (riego con 8 g/l de NaCl) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 35 La Figura 8 proporciona un ejemplo de aumento del vigor de la planta 43 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por salinidad (riego con 8 g/l de NaCl) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 40 La Figura 9 proporciona un ejemplo de aumento de la biomasa foliar fresca 50 días después de la siembra en semillas de trigo de invierno (cv. Marius) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se someten a estrés por salinidad (riego con 8 g/l de NaCl) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 45 La Figura 10 proporciona un ejemplo de aumento del vigor de la planta 51 días después de la siembra en semilla de soja (cv. Mungo) tratada con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 3.
- 50 La Figura 11 proporciona un ejemplo de aumento del peso fresco foliar 51 días después de la siembra en semillas de soja (cv. Mungo) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se sometieron a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 3.
- 55 La Figura 12 proporciona un ejemplo de aumento del peso seco foliar 51 días después de la siembra en semillas de soja (cv. Mungo) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se someten a estrés por sequía (riego reducido al 50 %) cuatro días después de la emergencia en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 3.
- 60 La Figura 13 proporciona un ejemplo de aumento de la longitud de la raíz 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por sequía (riego reducido al 75 %) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 4.
- 65 La Figura 14 proporciona un ejemplo de aumento de la eficiencia fotosintética (Φ_i2) 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por sequía

(riego reducido al 75 %) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 4.

5 La Figura 15 proporciona un ejemplo de reducción de la extinción no fotoquímica (NPQt, un indicador del nivel de estrés en la planta) 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por sequía (riego reducido al 75 %) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 4.

10 La Figura 16 proporciona un ejemplo de aumento del flujo de electrones lineales (LEF) de los fotosistemas de la planta 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por sequía (riego reducido al 75 %) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 4.

15 La Figura 17 proporciona un ejemplo de aumento de la eficiencia fotosintética (Phi2) 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por salinidad (10 ml de 58 g/l de NaCl) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 5.

20 La Figura 18 proporciona un ejemplo de aumento del flujo lineal de electrones (LEF) de los fotosistemas de la planta 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por salinidad (10 ml de 58 g/l de NaCl) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 5.

25 La Figura 19 proporciona un ejemplo de reducción de la extinción no fotoquímica (NPQt, un indicador del nivel de estrés en la planta) 10 días después de la siembra en semillas de maíz (cv. H140354) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por salinidad (10 ml de 58 g/l de NaCl) tres días después de la siembra, en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 5.

30 La Figura 20 proporciona un ejemplo de reducción de la extinción no fotoquímica (NPQt, un indicador del nivel de estrés en la planta) 10 días después de la siembra en semillas de trigo (cv. Skyfall, SEED-0035) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por frío en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 6. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75; los bigotes se extienden a puntos de datos que están a menos de 1,5 veces el intervalo intercuartílico del primer/tercer cuartil.

35 La Figura 21 proporciona un ejemplo de reducción de la extinción no fotoquímica (NPQt, un indicador del nivel de estrés en la planta) 17 días después de la siembra en semillas de soja (cv. Marula, SEED-003) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por salinidad en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 7.1. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75; los bigotes se extienden a puntos de datos que están a menos de 1,5 veces el intervalo intercuartílico del primer/tercer cuartil.

40 La Figura 22 proporciona un ejemplo de aumento del peso del brote 17 días después de la siembra en semillas de soja (cv. Marula, SEED-003) tratadas con ANE, CAR o sus combinaciones cuando se somete a estrés por salinidad en comparación con un control con estrés y sin estrés de acuerdo con el Ejemplo 7.2. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75; los bigotes se extienden a puntos de datos que están a menos de 1,5 veces el intervalo intercuartílico del primer/tercer cuartil.

50 Descripción detallada de la invención

55 Como se usa en la presente memoria, "estrés abiótico" se refiere al impacto negativo de los factores no vivos en las plantas; estos factores pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a: extremos de calor y frío, estrés hídrico por sequía o inundación, intensidad de luz alta o baja, salinidad elevada y toxicidad del suelo. Por lo tanto, las consecuencias del estrés abiótico son típicamente aquellas consecuencias que impactan negativamente en el rendimiento y la calidad de los cultivos.

60 Como se usa en la presente memoria, "plantas" puede referirse a cualquier organismo del reino de las Plantas. En las realizaciones preferidas, la planta es una planta terrestre. En algunas realizaciones, un cultivo. A menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, se entenderá que administrar un compuesto o composición como se describe en la presente memoria a una planta comprende administrar el compuesto o composición a cualquier parte de la planta y en cualquier etapa de crecimiento, por ejemplo, a una semilla, raíces u hojas de una planta.

65 Como se usa en la presente memoria, un "bioestimulante" se refiere a un producto compuesto de sustancias, microorganismos y/u otros materiales capaces de estimular los procesos de nutrición independientemente de su contenido de nutrientes, ya sea en la planta o en el entorno de cultivo que la rodea, que mejoran la salud de la planta, la eficiencia del uso de la nutrición, la tolerancia al estrés abiótico y/o la calidad del cultivo.

Como se usa en la presente memoria, "mitigar los efectos del estrés abiótico" se refiere a reducir, revertir o prevenir uno o más indicios de estrés abiótico mejor que una planta de control o parte de la misma (es decir, una planta o parte de la misma que ha estado expuesta al mismo estrés abiótico pero que no ha estado en contacto con las composiciones de la presente invención).

Los procedimientos para identificar y medir indicios de estrés abiótico en plantas son conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir evaluaciones visuales de la vitalidad de la planta, tal como una reducción en el número o tamaño de las plantas o partes de las mismas, una reducción en la germinación de semillas o emergencia, o una reducción en las tasas de crecimiento o vigor de las plántulas; evaluación gravimétrica del rendimiento de biomasa, tales como peso fresco o seco de brotes o raíces; evaluaciones basadas en escáneres ópticos de partes de plantas, tales como el escaneo de hojas o sistemas de raíces y determinaciones algorítmicas del área de la hoja o la longitud de las raíces; evaluaciones fisiológicas o bioquímicas, tales como la estabilidad de la membrana celular o el contenido relativo de agua de la hoja; y evaluaciones fotosintéticas de los niveles de estrés de las plantas mediante el uso de procedimientos basados en la reflectancia o la espectroscopia, tales como la determinación de la eficiencia fotosintética, el flujo lineal de electrones, la extinción no fotoquímica y los niveles relativos de clorofila.

Como se usa en la presente memoria, una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para mitigar los efectos del estrés abiótico, que puede evaluarse mediante el uso de uno o más de los indicios discutidos anteriormente. La cantidad efectiva variará según el tipo y la afección de la planta, así como también la naturaleza y duración del factor estresante abiótico (o factor estresante abiótico esperado en el caso de un tratamiento preventivo).

Como se usa en la presente memoria, "medio de crecimiento" se usa genéricamente para referirse al sustrato sobre el que se ancla o crece una planta, y puede incluir medios de suelo o hechos por el hombre, que incluyen, por ejemplo, medios adecuados para aplicaciones hidropónicas, tales como lana de roca o vermiculita.

Como se usa en la presente memoria, "L-carnitina" (ácido β -hidroxi- γ -N-trimetilaminobutírico) es un derivado del aminoácido lisina. Se aisló por primera vez de la carne en 1905 y tiene un papel fundamental en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga para la producción de energía en los tejidos animales. Los usos comerciales de la L-carnitina incluyen como suplemento dietético y como refuerzo de espuma en algunos productos cosméticos.

Los aminoácidos naturales que incluyen carnitina, fenilalanina, lisina, etc. pueden obtenerse mediante extracción, fermentación, reacción enzimática y síntesis. Los procedimientos para la fabricación sintética de L-carnitina son conocidos por los expertos en la técnica, y la L-carnitina está disponible comercialmente a partir de una variedad de fuentes.

Las algas marinas se han usado como insumos agrícolas durante cientos de años. Se usó por primera vez como enmienda del suelo donde las algas marinas se incorporaban a los medios de cultivo y los microbios del suelo las descomponían. Más recientemente, han servido como materia prima para la producción de "extracto de algas marinas" que se usa como bioestimulante. Especies tales como *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea potatorum*, *Ecklonia Maxima*, *Ulva Lactuca* y *Gelidium robustum* se han usado en la fabricación de bioestimulantes de plantas y, en algunas realizaciones, pueden usarse en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, "extracto de algas marinas" se refiere a productos obtenidos de algas marinas, preferentemente macroalgas rojas, marrones o verdes, a través de un procedimiento que extrae y concentra compuestos bioestimulantes. Los procedimientos para obtener extractos de algas marinas son conocidos por los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, *EL Boukhari MEM, Barakate M, Bouhia Y, Lyamlouli K. Trends in Seaweed Extract Based Biostimulants: Manufacturing Process and Beneficial Effect on Soil-Plant Systems. Plants 2020, 9, 359. doi : 10.3390/plants9030359*. Además, en algunas realizaciones, el extracto de algas marinas puede prepararse a partir de una combinación de especies de algas marinas.

El procesamiento/extracción de algas marinas puede realizarse mediante el uso de solventes, ácidos, bases, enzimas o medios mecánicos eventualmente en cualquier combinación. Preferentemente, el procesamiento/extracción se realiza al poner en contacto las algas con una solución acuosa que comprende un agente de extracción alcalino.

Para los fines de la presente invención, la base es preferentemente una base inorgánica seleccionada de: NaOH, KOH, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , o cualquiera de sus combinaciones. La concentración de disolvente alcalino varía del 1 % al 10 % p/p, más específicamente del 2 % al 5 % p/p.

Preferentemente, la temperatura de la etapa de extracción varía preferentemente entre 20 °C y 100 °C y el tiempo de extracción varía de 30 minutos a 18 horas a presiones que oscilan de 1 a 6 bar.

La etapa de extracción puede ir seguida de una etapa adicional de separación/eliminación de los componentes no solubilizados cuando se desee usar únicamente el extracto en la formulación. La etapa de eliminación/separación se realiza preferentemente por decantación, filtración o centrifugación. Alternativamente, puede usarse una suspensión que comprenda tanto los componentes extraídos como los componentes no extraídos.

De acuerdo con una realización preferente, el extracto de algas usado en la invención se prepara a partir de las algas marinas pardas *Ascophyllum nodosum*. El extracto resultante puede estar en forma de líquido soluble, concentrado líquido o polvo soluble en agua.

5 En la presente memoria se proporciona una composición bioestimulante de plantas que comprende una cantidad efectiva de al menos un aminoácido betaína y un extracto de algas marinas y, en particular, la L-carnitina y preferentemente un extracto de algas marinas de la clase *Phaeophyceae*, más preferentemente de la especie *Ascophyllum nodosum*. En algunas realizaciones, los ingredientes activos de la composición bioestimulante se limitan a L-carnitina y el extracto de algas marinas, preferentemente *Ascophyllum nodosum*. En algunas realizaciones, la
10 composición bioestimulante consiste o consiste esencialmente en L-carnitina y el extracto de algas marinas, preferentemente *Ascophyllum nodosum* y, opcionalmente, agua. En este contexto, "ingrediente activo" puede entenderse como ingredientes que tienen un efecto bioestimulante observable, es decir, que previenen o mitigan los efectos del estrés abiótico, que pueden identificarse o medirse en base a uno o más indicios identificados en la presente memoria, a diferencia de, por ejemplo, los excipientes que ya sea por su naturaleza o como resultado de las
15 cantidades traza presentes en la combinación, no tienen tal efecto observable.

La eficacia de la combinación de ANE y L-carnitina para mitigar los efectos del estrés abiótico es evidente a partir de los Ejemplos. En vista de la evidencia de eficacia, se realizaron experimentos adicionales para evaluar el efecto sinérgico de ANE y L-carnitina en la mitigación del estrés abiótico. Como se detalla en los Ejemplos, había evidencia
20 que apoyaba el efecto sinérgico cuando las plantas estaban sujetas a diferentes formas de estrés abiótico, que incluyen frío y salinidad.

En una realización, la composición bioestimulante puede estar en forma de polvo que contiene el aminoácido betaína, preferentemente L-carnitina, y un polvo de extracto de algas marinas. La composición puede dispersarse en un medio líquido para facilitar la aplicación.
25

En algunas realizaciones, la relación en peso de una combinación de L-carnitina al extracto de algas marinas en la composición o usado en el procedimiento proporcionado está entre 10:1 y 1:10, en algunas realizaciones entre 2:1 y 1:2. En algunas realizaciones, se usan cantidades aproximadamente iguales en peso de L-carnitina y el extracto de algas marinas.
30

En algunas realizaciones, la composición bioestimulante que contiene L-carnitina y *Ascophyllum nodosum* el extracto puede estar en forma de líquido, que puede ser particularmente adecuado para aplicación foliar o remojo de raíces.

35 En alguna realización, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden formularse como un concentrado acuoso que contiene extracto de algas marinas, preferentemente *Ascophyllum nodosum* extracto, en un intervalo de 100 a 250 g/l en combinación con L-carnitina en 100 a 250 g/l.

En algunas realizaciones, las composiciones que se describen en la presente memoria pueden usarse como tratamiento de semillas. Las formulaciones y tecnologías de tratamiento de semillas están disponibles comercialmente y los procedimientos para aplicar tratamientos de semillas son conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir la aplicación directa de un tratamiento de semillas a la semilla mediante el uso del equipo de tratamiento de semillas disponible comercialmente.
40

45 De acuerdo con el alcance de las afecciones, una cantidad efectiva suele variar de 50-800 g de L-carnitina por tonelada de semilla y de 50-800 g de extracto de algas marinas, preferentemente extracto de *Ascophyllum nodosum*, por tonelada de semilla para tratamiento de semillas.

En una realización preferente, la composición descrita en la presente memoria para su uso como tratamiento de semillas puede formularse como un concentrado acuoso que contiene extracto de *Ascophyllum nodosum* en un intervalo de 100 a 250 g/l en combinación con L-carnitina de 100 a 250 g/l.
50

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden contener excipientes de formulación adecuados conocidos por los expertos en la técnica y que están disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, los excipientes de formulación se seleccionan adecuadamente, pero no exclusivamente, de tensioactivos, agentes humectantes y dispersantes, adhesivos/aglutinantes, anticongelantes, antiespumantes, conservantes, coadyuvantes reológicos y, si corresponde, colorantes.
55

Los tratamientos descritos en la presente también pueden ser preventivos, por ejemplo, los procedimientos y las composiciones proporcionados en la presente memoria pueden proporcionarse como un tratamiento de semillas antes de un evento estresante esperado, como una ola de frío o una ola de calor para mitigar los efectos del estresante.
60

Si bien en sus realizaciones más amplias, los procedimientos, compuestos y composiciones descritos en la presente memoria pueden usarse en el cultivo de cualquier planta, en algunas realizaciones, pueden usarse en el cultivo de plantas comercialmente importantes, que pueden incluir, sin limitarse a, cereales (que incluyen maíz, trigo, alfalfa, cebada, centeno, avena), hortalizas (que incluyen pimiento, tomate, lechuga, zanahorias, patatas) y otros cultivos
65

importantes, tales como algodón, arroz, soja, canola, colza.

Todos los documentos a los que se hace referencia en la presente memoria se incorporan por referencia, sin embargo, se debe tener en cuenta que cualquier patente, publicación u otro material de divulgación, en su totalidad o en parte, que se incorpora por referencia en el presente se incorpora solo en la medida en que el material incorporado no se opone a las definiciones, declaraciones u otro material de divulgación establecido en esta divulgación. Como tal, y en la extensión necesaria, la divulgación expresa que se expone en la presente memoria suplanta cualquier material conflictivo que se incorpora como referencia en la presente descripción.

Se debe entender que numerosas modificaciones a los mismos aparecerán para los expertos en la técnica. Por consiguiente, la descripción anterior y las figuras adjuntas deben tomarse como ilustrativos de la invención y no en un sentido limitativo. Además debe entenderse que se pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siguen, en general, los principios de la invención y que incluyen tales desviaciones de la presente divulgación que se incluyen dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica para la que se refiere la invención y que puede aplicarse a las características esenciales expuestas previamente en la presente memoria, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: ensayo de estrés por sequía en trigo de invernadero.

La semilla de trigo de invierno (cv. Marius) se trató con un volumen de aplicación total de 10 ml/kg con agua (grupos de tratamiento de control sin estrés y de control con estrés), o una solución acuosa de *Ascophyllum nodosum* (ANE) a 1 ml/kg, o una solución acuosa de clorhidrato de L-carnitina (CAR) a 0,3 g/kg, o combinaciones de extracto de *Ascophyllum nodosum* a 1 ml/kg con 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 g/kg de clorhidrato de L-carnitina. La semilla de trigo tratada se sembró en suelo en macetas con 10 repeticiones biológicas por grupo de tratamiento en un diseño de bloques completos aleatorizado. Cuatro días después de la emergencia total, se impuso estrés por sequía a todos menos al grupo de tratamiento de control sin estrés a través de un régimen de riego reducido en un 50 % en relación con el riego total recibido por el grupo de control sin estrés.

Como se evidencia en la Figura 1 y la Tabla 1, el vigor de la planta (evaluado en una escala de 0-10, donde 0 son plantas sin follaje y 10 representa pleno vigor, siendo el vigor de follaje estándar del cultivo en condiciones normales) se incrementó hasta en un 17,6 % en comparación con el control con estrés en las plantas tratadas con semillas con ANE a 1 ml/kg y CAR a 0,4 g/kg a los 21 días después de la siembra. A los 42 días después de la siembra, esta diferencia había aumentado a 20,8 % en comparación con el control con estrés, como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 2.

Tabla 1

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	8,45	19,0
Con estrés	7,10	0,0
ANE 1 ml/kg	7,25	2,1
CAR 0,3 g/kg	7,60	7,0
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	7,50	5,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	8,05	13,4
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	8,25	16,2
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	8,35	17,6

Tabla 2

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	8,95	19,3
Con estrés	7,50	0,0
ANE 1 ml/kg	8,40	12,0
CAR 0,3 g/kg	8,35	11,3
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	8,76	16,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	8,59	14,5
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	8,53	13,7
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	9,06	20,8

La mejora del vigor de la planta proporcionada por el tratamiento de semillas con la combinación de ANE y CAR se tradujo en un aumento del rendimiento de biomasa evaluado 50 días después de la siembra, con un aumento de hasta 22,1 % en el peso fresco foliar (Figura 3, Tabla 3) y un aumento de 62 % en el peso de la raíz fresca en las plantas tratadas con semillas con ANE a 1 ml/kg y CAR a 0,4 g/kg (Figura 4, Tabla 4).

Tabla 3

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	18,77	107,6
Con estrés	9,04	0,0
ANE 1 ml/kg	9,83	8,7
CAR 0,3 g/kg	9,94	9,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	10,64	17,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	10,59	17,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	10,78	19,2
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	11,04	22,1

Tabla 4

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	4,39	100,9
Con estrés	2,18	0,0
ANE 1 ml/kg	3,02	38,2
CAR 0,3 g/kg	3,66	67,5
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	3,12	42,8
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	3,42	56,5
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	3,11	42,3
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	3,54	62,0

Ejemplo 2: Ensayo de estrés por salinidad en trigo de invernadero.

La semilla de trigo de invierno (cv. Marius) se trató con un volumen de aplicación total de 10 ml/kg con agua (grupos de tratamiento de control sin estrés y de control con estrés), o una solución acuosa de *Ascophyllum nodosum* (ANE) a 1 ml/kg, o una solución acuosa de clorhidrato de L-carnitina (CAR) a 0,3 g/kg, o combinaciones de extracto de *Ascophyllum nodosum* a 1 ml/kg con 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 g/kg de clorhidrato de L-carnitina. La semilla de trigo tratada se sembró en suelo contenido en macetas con 10 repeticiones biológicas por grupo de tratamiento en un diseño de bloques completos aleatorizado. Cuatro días después de la emergencia total, se impuso estrés por salinidad a todos menos al grupo de tratamiento de control sin estrés mediante riego con agua salina (8 g/l de NaCl) durante el resto del ensayo. El grupo de tratamiento de control sin estrés se regó con agua no salina.

Como se evidencia en la Figura 5 y la Tabla 5, la altura de la planta aumentó hasta en un 10,9 % en comparación con el control con estrés en las plantas tratadas con semillas con ANE a 1 ml/kg y CAR a 0,4 g/kg a los 22 días después de la siembra. A los 35 días después de la siembra, el aumento de altura en este grupo de tratamiento había aumentado a 23,3 % en comparación con el control con estrés (Figura 6, Tabla 6).

Tabla 5

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	27,75	7,6
Con estrés	25,80	0,0
ANE 1 ml/kg	26,10	1,2
CAR 0,3 g/kg	27,55	6,8
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	27,75	7,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	28,10	8,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	28,40	10,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	28,60	10,9

Tabla 6

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	35,30	10,7
Con estrés	31,90	0,0
ANE 1 ml/kg	33,85	6,1
CAR 0,3 g/kg	37,39	17,2
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	37,33	17,0
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	36,80	15,4
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	38,16	19,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	39,33	23,3

A los 29 días después de la siembra, el contenido relativo de clorofila de la planta (SPAD) mostró un aumento de 25,5 % en el mismo grupo de tratamiento en comparación con el control con estrés (Figura 7, Tabla 7). [Se observó un efecto mitigador similar en la tasa y/o capacidad fotosintética como lo demuestra SPAD en plantas de maíz sujetas a estrés por frío bajo un protocolo similar a los Ejemplos 6 y 7, a continuación.] El aumento de la tolerancia al estrés de las plantas también se reflejó en el evaluación del vigor de la planta a los 43 días después de la siembra, con un incremento de hasta 16.6 % sobre el control con estrés (Figura 8, Tabla 8). A los 50 días después de la siembra, se observó un aumento de hasta un 42,7 % en la biomasa foliar fresca en las plantas tratadas con ANE a 1 ml/kg y CAR a 0,3 g/kg, lo que demuestra una fuerte inducción de tolerancia prolongada al estrés por salinidad con el tratamiento combinado de ANE y CAR (Figura 9, Tabla 9).

Tabla 7

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	37,46	24,3
Con estrés	30,14	0,0
ANE 1 ml/kg	35,52	17,8
CAR 0,3 g/kg	35,30	17,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	35,24	16,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	36,94	22,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	37,98	26,0
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	37,81	25,5

Tabla 8

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	8,95	13,3
Con estrés	7,90	0,0
ANE 1 ml/kg	8,40	6,3
CAR 0,3 g/kg	8,68	9,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	9,00	13,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	8,25	4,4
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	8,40	6,3
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	9,21	16,6

Tabla 9

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	17,5	113,4
Con estrés	8,2	0,0
ANE 1 ml/kg	9,0	9,8
CAR 0,3 g/kg	10,6	29,3
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	9,4	14,6
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	9,6	17,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	11,7	42,7
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	10,7	30,5

Ejemplo 3: Ensayo de estrés por sequía en soja de invernadero.

La semilla de soja (cv. Mungo) se trató con un volumen de aplicación total de 10 ml/kg con agua (grupos de tratamiento de control sin estrés y de control con estrés), o una solución acuosa de *Ascophyllum nodosum* (ANE) a 1 ml/kg, o una solución acuosa de clorhidrato de L-carnitina (CAR) a 0,3 g/kg, o combinaciones de extracto de *Ascophyllum nodosum* a 1 ml/kg con 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 g/kg de clorhidrato de L-carnitina. La semilla de soja tratada se sembró en suelo contenido en macetas con 10 repeticiones biológicas por grupo de tratamiento en un diseño de bloques completos aleatorizado. Cuatro días después de la emergencia total, se impuso estrés por sequía a todos menos al grupo de tratamiento de control sin estrés a través de un régimen de riego reducido en un 50 % en relación con el riego total recibido por el grupo de control sin estrés.

Como se evidencia en la Figura 10 y la Tabla 10, el vigor de la planta aumentó hasta en un 25 % en comparación con el control con estrés en las plantas tratadas con semillas con ANE a 1 ml/kg y CAR a 0,2 g/kg a los 51 días después de la siembra. En consecuencia, el peso fresco foliar de este grupo de tratamiento mostró un aumento de 34,4 % en comparación con el control con estrés (Figura 11, Tabla 11), y un aumento de 66,7 % en el peso seco foliar (Figura 12, Tabla 12). Esto demuestra la mitigación clara de los efectos reductores del rendimiento del estrés inducido por sequía que ofrece el tratamiento combinado de las semillas con ANE y CAR. Se observó un efecto protector similar sobre el peso de los brotes frescos a los 17 días después de la siembra para plantas de soja germinadas a partir de semillas tratadas con una combinación de 0,36 g de ANE y 0,30 g de L-carnitina sujetas a estrés por sequía bajo un protocolo separado.

Tabla 10

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	7,2	-5,3
Con estrés	7,6	0,0
ANE 1 ml/kg	8,6	13,2
CAR 0,3 g/kg	9,4	23,7
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	9,2	21,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	9,5	25,0
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	9,1	19,7
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	9,0	18,4

Tabla 11

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	39,0	-0,8
Con estrés	39,3	0,0
ANE 1 ml/kg	43,9	11,7
CAR 0,3 g/kg	49,1	24,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	42,0	6,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	52,8	34,4
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	47,2	20,1
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	47,7	21,4

Tabla 12

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	8,99	10,9
Con estrés	8,11	0,0
ANE 1 ml/kg	10,17	25,4
CAR 0,3 g/kg	12,64	55,9
ANE 1 ml/kg; CAR 0,1 g/kg	11,54	42,4
ANE 1 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	13,52	66,7
ANE 1 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	12,07	48,8
ANE 1 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	12,85	58,4

Ejemplo 4: Ensayo de estrés por sequía del maíz en sala de ambiente controlado.

La semilla de maíz (cv. H140354) se trató a un volumen de aplicación total de 10 ml/kg con agua (grupos de tratamiento de control sin estrés y de control con estrés), o una solución acuosa de *Ascophyllum nodosum* (ANE) a 2 ml/kg, o una solución acuosa de clorhidrato de L-carnitina (CAR) a 0,3 g/kg, o una combinación de extracto de *Ascophyllum nodosum* a 2 ml/kg y 0,3 g/kg de clorhidrato de L-carnitina. La semilla de maíz tratada se sembró en suelo

de campo dentro de envases de celdas colocados en bandejas de invernadero con 16 repeticiones biológicas por grupo de tratamiento en un diseño de bloques completos aleatorizado. Tres días después de la siembra, se impuso estrés por sequía a todos menos al grupo de tratamiento de control sin estrés a través de un régimen de riego reducido en un 75 % en relación con el riego total recibido por el grupo de control sin estrés, y se realizaron evaluaciones diez días después de la siembra.

Como se evidencia en la Figura 13 y la Tabla 13, el tratamiento de las semillas con ANE a 2 ml/kg y CAR a 0,3 g/kg resultó en un aumento del 30,6 % en la longitud de la raíz de maíz en comparación con el control con estrés a los 10 días después de la siembra. El tratamiento combinado de las semillas con ANE y CAR resultó además en un aumento del 43,2 % en el nivel de eficiencia fotosintética (eficiencia del fotosistema II, Φ_2) (Figura 14, Tabla 14), una reducción del 40,2 % en la extinción no fotoquímica (NPQ), que es la cantidad de luz entrante que se regula lejos de los procedimientos fotosintéticos para reducir el daño a la planta, y es un indicador del nivel de estrés de la planta (Figura 15, Tabla 15), y un aumento del 46,2 % en el flujo de electrones lineales (LEF) de los fotosistemas de las plantas (Figura 16, Tabla 16). La última medición en particular demostró un efecto sinérgico sorprendente e inesperado, donde ANE a 2 ml/kg resultó en un aumento del 18 % en LEF, CAR a 0,3 g/kg resultó en una disminución del 4,3 % en LEF, mientras que su tratamiento combinado resultó en un aumento del 46,2 %. Estos resultados demuestran una mayor capacidad para realizar la fotosíntesis y mantener el crecimiento de las raíces en las plantas de maíz expuestas al estrés por sequía, gracias al tratamiento combinado de las semillas con ANE y CAR.

Tabla 13

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	365,3	61,4
Con estrés	226,3	0,0
ANE 2 ml/kg	286,8	26,8
CAR 0,3 g/kg	263,3	16,4
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	295,4	30,6

Tabla 14

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	0,68	124,0
Con estrés	0,30	0,0
ANE 2 ml/kg	0,40	29,8
CAR 0,3 g/kg	0,32	5,7
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	0,44	43,2

Tabla 15

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	0,77	-70,0
Con estrés	2,57	0,0
ANE 2 ml/kg	1,60	-37,8
CAR 0,3 g/kg	2,32	-10,0
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	1,54	-40,2

Tabla 16

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	23,24	119,4
Con estrés	10,59	0,0
ANE 2 ml/kg	12,50	18,0
CAR 0,3 g/kg	10,14	-4,3
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	15,49	46,2

Ejemplo 5: Ensayo de estrés por salinidad del maíz en sala de ambiente controlado.

La semilla de maíz (cv. H140354) se trató con un volumen de aplicación total de 10 ml/kg con agua (grupos de tratamiento de control sin estrés y de control con estrés), o combinaciones de extracto de *Ascophyllum nodosum* (ANE) a 2 ml/kg con 0,2, 0,3 o 0,4 g/kg de clorhidrato de L-carnitina (CAR). La semilla de maíz tratada se sembró en suelo de campo dentro de envases de celdas colocados en bandejas de invernadero con 16 repeticiones biológicas por grupo

de tratamiento en un diseño de bloques completos aleatorizado. Cuatro días después de la siembra, se impuso estrés por salinidad a todos menos al grupo de tratamiento de control sin estrés mediante riego con agua salina (10 ml de 58 g/l de NaCl). El grupo de tratamiento de control sin estrés se regó con agua no salina. Las evaluaciones se realizaron once días después de la siembra.

Como se evidencia en la Figura 17 y la Tabla 17, el tratamiento combinado de las semillas con ANE 2 ml/kg y CAR 0,3 g/kg resultó en un aumento del 87,8 % en el nivel de eficiencia fotosintética (eficiencia del fotosistema II, Φ_2) en las plantas de maíz con estrés por sal. Se observó además un aumento de hasta 118,5 % en el flujo lineal de electrones (LEF) de los fotosistemas de la planta (Figura 18, Tabla 18), así como también una reducción de hasta 39,5 % en la extinción no fotoquímica (NPQ_t, un indicador del nivel de estrés de la planta) (Figura 19, Tabla 19).

Tabla 17

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	0,67	398,4
Con estrés	0,13	0,0
ANE 2 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	0,21	53,8
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	0,25	87,8
ANE 2 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	0,24	81,9

Tabla 18

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	18,89	431,1
Con estrés	3,56	0,0
ANE 2 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	7,77	118,5
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	6,81	91,5
ANE 2 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	7,54	112,2

Tabla 19

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	1,06	-95,0
Con estrés	21,05	0,0
ANE 2 ml/kg; CAR 0,2 g/kg	18,77	-10,8
ANE 2 ml/kg; CAR 0,3 g/kg	12,72	-39,5
ANE 2 ml/kg; CAR 0,4 g/kg	14,36	-31,8

Ejemplo 6: Trigo sujeto a estrés por frío.

Se realizó una investigación para evaluar el efecto del tratamiento de las semillas en la mitigación de los efectos de otra forma de estrés abiótico, concretamente, el estrés por frío.

Las soluciones de tratamiento de semillas se prepararon según la Tabla 20:

Grupo de tratamiento	Cantidad de ANE	Cantidad de Carnitina	Cantidad de agua
Sin estrés			10 ml
Con estrés			10 ml
0,36 g de ANE	2 ml		8 ml
0,30 g de Carnitina		2 ml	8 ml
0,36 g de ANE+0,30 g de Carnitina	2 ml	2 ml	6 ml

Se pipetearon 0,1 ml de solución de tratamiento en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml alrededor de los bordes y se añadieron 10 g de semilla de trigo (cultivo Skyfall, ref. SEED-0035). El vaso de precipitados se agitó a mano durante 1 min para cubrir las semillas, que luego se agitaban intermitentemente hasta que se secaban, si era necesario.

El ensayo se estableció de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se etiquetaron 32 envases de celdas 8-0-6 con etiquetas de colores para indicar cinco tratamientos con 4 envases de celdas para controles sin estrés y 7 para los 4 tratamientos restantes.
2. En un recipiente se mezclaron completamente 6 l de suelo de campo almacenado y 600 ml de agua.
3. Si el suelo estaba demasiado seco, se añadían 300 ml adicionales de agua o una cantidad adecuada.
4. Cada envase de celdas se llenó con tierra prehumedecida; empacado una vez golpeándolo en un mostrador; rematado y nivelado. Los envases de celdas llenas se colocaron en una bandeja plana de cuatro espesores en un diseño de bloques aleatorizado.
5. Se repitieron las etapas 3 a 4, en orden aleatorio entre los grupos de tratamiento y las réplicas.
6. Una vez que se llenaron todos los envases de celdas, se usó un sello para crear agujeros de profundidad uniforme en cada envase de celdas. Se plantaron tres semillas por celda a 1" y luego se cubrieron con tierra.
7. Cada bandeja se regó con 750 ml al retirar un envase de celdas y verter agua en el fondo de la bandeja. Se colocó un domo de plástico de 7" en cada bandeja, las cuales se cultivaron bajo las siguientes condiciones: 25/20 °C día/noche, 16/8 h, 70 % humedad, 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

Los controles sin estrés se regaron según fue necesario durante todo el ensayo. Los controles sin estrés se separaron del resto del ensayo. Las mediciones se tomaron 10 días después de la siembra.

Las plantas se expusieron a estrés por frío en la cámara de crecimiento (conviron) durante 4 días y se tomaron mediciones 10 después de la siembra. Condiciones ambientales: 13/8°C día/noche, fotoperiodo 16/8 h, 60 % humedad, 600 ppm y 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

Se obtuvo una estimación de la extinción no fotoquímica (NPQt), que es la cantidad de luz entrante que se regula lejos de los procesos fotosintéticos para reducir el daño a la planta mediante el uso del MultispeQ (B-4003-AA) del PhotosynQ, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las mediciones de fotosíntesis se midieron un total de 12-14 plantas por tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 21 y la Figura 20. El análisis de varianza paramétrico (ANOVA) se realizó mediante el uso de la función aov en el envase ggpubr, y las ensayos de comparación múltiple se realizaron con la prueba de Tukey (alfa = 0,1) mediante el uso de la función TukeyHSD en la estadística de envase en R.

Tabla 21

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	0,30	-26,6
Con estrés	0,42	0,0
0,36 g de ANE	0,30	-28,5
0,30 g de Carnitina	0,40	-4,8
0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina	0,37	-11,2

Para complementar la evidencia de eficacia observada, se realizó una evaluación de la sinergia. La sinergia se calculó mediante el uso de dos metodologías diferentes, las cuales encuentran respaldo en la literatura: 1) Ecuación III de Colby, S.R. 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. Weed Science 15:20-22. y 2) Ecuación 2 de Huang, Z. y K.A. Falco. 2021. Evaluación de sinergias para el crecimiento de las plantas mediante la teoría de la acción conjunta independiente. HortScience 56(5):623-626. doi: 10.21273/HORTSCI15731-21. Para evaluar la significación estadística de la diferencia entre las medias observadas y predichas se utilizó una prueba t de dos colas para una muestra.

Ambas metodologías sugirieron un efecto sinérgico.

Procedimiento 1: Acción Conjunta Independiente (Colby 1967 Porcentaje de Control)

El porcentaje de control predicho de acuerdo con el procedimiento Colby para la Acción Conjunta Independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina sobre NPQt es de 68,05. El resultado observado fue de 88,83, lo que arroja una relación de sinergia de 1,31. Esto es mayor que el resultado predicho, lo que significa que la combinación funcionó más lejos de 0 de lo esperado.

Procedimiento 2: Acción Conjunta Independiente (Huang y Falco 2021 Plant Growth)

La media predicha de acuerdo con el procedimiento de Huang y Falco para la acción conjunta independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de carnitina en NPQt es 0,28. El resultado observado fue de 0,37, que es un 30,53 % mayor que el resultado predicho.

Ejemplo 7: Soja sujeta a estrés por salinidad.

Complementando las investigaciones de eficacia de los Ejemplos 2 y 5, se realizó una investigación adicional para evaluar el efecto del tratamiento de semillas en la mitigación de los efectos del estrés por salinidad en las plantas de soja y específicamente para investigar la evidencia del efecto sinérgico.

Se usaron las mismas soluciones de tratamiento de semillas (Tabla 20) y protocolo de ensayo que en el Ejemplo 6, pero las semillas se plantaron a 1,5". Para recubrir las semillas, se pipetearon 0,3 ml de solución de tratamiento en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml alrededor de los bordes y se añadieron 30 g de semilla de soja. Se usó semilla de soja Marula (referencia SEED-003) de Prograin, sin ningún otro tratamiento.

Extinción no fotoquímica

Se obtuvo una estimación de NPQt mediante el uso del MultispeQ™ (B-4003-AA) de PhotosynQ, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las mediciones de fotosíntesis se midieron un total de 12-14 plantas por tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 22 y la Figura 21. Para el Ejemplo 7, se realizó un análisis de varianza paramétrico (ANOVA) mediante el uso de la función aov en el envase ggpubr, y se realizaron pruebas de comparación múltiple con la prueba de Tukey (alfa = 0,1) con la función TukeyHSD en la estadística de envase en R.

Tabla 22

Grupo de tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	0,59	-32,3
Con estrés	0,87	0,0
0,36 g de ANE	0,74	-14,5
0,30 g de Carnitina	0,76	-12,4
0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina	0,69	-20,6

La sinergia se evaluó mediante el uso de las dos metodologías descritas en el Ejemplo 6. Ambas metodologías sugirieron un efecto sinérgico.

Procedimiento 1: Acción Conjunta Independiente (Colby 1967 Porcentaje de Control)

El porcentaje de control predicho de acuerdo con el procedimiento Colby para la Acción Conjunta Independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina sobre NPQt es de 74,91. El resultado observado fue de 79,4, lo que arroja una relación de sinergia de 1,06. Esto es mayor que el resultado predicho, lo que significa que la combinación funcionó más lejos de 0 de lo esperado.

Procedimiento 2: Acción Conjunta Independiente (Huang y Falco 2021 Plant Growth)

La media predicha de acuerdo con el procedimiento de Huang y Falco para la acción conjunta independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de carnitina en NPQt es 0,65. El resultado observado fue de 0,69, que es un 6 % mayor que el resultado predicho.

Peso del brote

Se evaluó el peso de los brotes para evaluar si los efectos positivos observados en NPQt se reflejaron en un crecimiento de plantas más robusto. Se midió el peso de los brotes en siete envases de celdas por tratamiento. Si bien el tamaño de la muestra fue limitado, la combinación mostró un efecto positivo en el crecimiento consistente con los efectos positivos observados en NPQt.

Los resultados se muestran en la Tabla 23 y la Figura 22.

Tabla 23

Tratamiento	Media	Diferencia (%)
Sin estrés	1,62	-1,8
Con estrés	1,65	0,0
0,36 g de ANE	1,45	-11,7
0,30 g de Carnitina	1,69	3,0
0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina	1,69	2,5

La sinergia se evaluó mediante el uso de las dos metodologías descritas en el Ejemplo 6. Ambas metodologías sugirieron un efecto sinérgico.

Procedimiento 1: Acción Conjunta Independiente (Colby 1967 Porcentaje de Control)

El porcentaje de control predicho de acuerdo con el procedimiento de Colby para la Acción Conjunta Independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina sobre Peso del Brote Fresco es de 90,93. El resultado observado fue de 102,54, lo que arroja una relación de sinergia de 1,13. Esto es mayor que el resultado predicho, lo que significa que la combinación funcionó más lejos de 0 de lo esperado.

Procedimiento 2: Acción Conjunta Independiente (Huang y Falco 2021 Plant Growth)

La media predicha de acuerdo con el procedimiento de Huang y Falco para la acción conjunta independiente de la combinación de 0,36 g de ANE + 0,30 g de Carnitina en el peso de los brotes frescos es de 1,5. El resultado observado fue de 1,69, que es un 12,78 % mayor que el resultado predicho ($P = 0,14$).

Como puede verse, por lo tanto, los ejemplos descritos e ilustrados anteriormente pretenden ser solo ilustrativos. El alcance se indica en las reivindicaciones adjuntas.

Muchas otras características y combinaciones de las mismas relativas a las presentes mejoras aparecerán a los expertos en la técnica tras la lectura de la presente divulgación.