

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 559**

51 Int. Cl.:

**A01N 61/00** (2006.01)

**A01N 65/00** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008 E 08843247 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2211624**

54 Título: **Utilización de sustancias húmicas como activadores de agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en plantas**

30 Prioridad:

**10.10.2007 FR 0758196**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.04.2013**

73 Titular/es:

**TIMAC AGRO INTERNATIONAL (100.0%)  
27 AVENUE FRANKLIN ROOSEVELT  
35400 SAINT MALO, FR**

72 Inventor/es:

**LEMENAGER, DIANE;  
BACAICOA, EVA;  
GARCIA-MINA, JOSEMARIA y  
YVIN, JEAN-CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 399 559 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

- 5 Utilización de sustancias húmicas como activadores de agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en plantas
- La presente invención tiene por objeto esencialmente una nueva utilización de las sustancias húmicas, naturales o sintéticas.
- 10 Más específicamente, la presente invención se refiere a la utilización de una composición que comprende sustancias húmicas como activadores de la expresión génica que codifica los agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en las plantas. La utilización de esta composición tiene una aplicación particularmente ventajosa cuando las plantas se encuentran en condiciones del que disponen de suficiente hierro.
- 15 Entre los minerales esenciales, el hierro desempeña un papel importante en los procesos biológicos fundamentales tales como el crecimiento, el desarrollo, la fotosíntesis y la respiración de los vegetales.
- La reacción del hierro con el oxígeno conlleva su gran insolubilidad y una toxicidad potencial, lo que hace que su utilización sea difícil para los organismos aeróbico. Su concentración en el suelo en una forma asimilable para las plantas es, por lo tanto, muy a menudo un factor que limita la producción vegetal.
- 20 La carencia de hierro de las plantas puede alterar considerablemente su fisiología, y representa pues uno de los problemas más importantes que tienen que resolver los agricultores para los cultivos desarrollados en suelos básicos y calcáreos.
- 25 Al contrario, un exceso de hierro ferroso soluble, como por ejemplo el que se encuentra en suelos ácidos, puede llevar a una toxicidad ferrosa debida a la reacción del hierro con las formas reducidas del oxígeno y a la producción de especies radicalarias.
- 30 Por lo tanto, existe una ventana óptima de concentración de hierro para que una planta funcione correctamente y adopte un crecimiento normal. Esta concentración óptima es objeto de numerosas regulaciones que controlan los sistemas activos de adquisición de hierro del suelo por las raíces, así como su transporte y distribución a todos los órganos de la planta.
- 35 A nivel de sus raíces, las plantas disponen de sistemas activos que permiten absorber el hierro del suelo. En las plantas denominadas "no gramíneas", la asimilación de hierro se basa en un mecanismo con tres etapas: (i) una HT-ATPasa de raíces libera protones, lo que permite la acidificación del suelo y la solubilización de hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), (ii) una reductasa férrica reduce el hierro férrico a hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), y (iii) este último se transporta por el interior de las plantas mediante un transportador altamente específico de hierro.
- 40 En condiciones de carencia de hierro, la expresión génica que codifica la quelato-reductasa y el transportador específico de hierro está considerablemente inducida en la epidermis de las raíces. Si la regulación de estos genes por el estado en cuanto a hierro está bien documentada, los elementos sensores, las vías de transducción de la señal y las regiones promotoras implicadas siguen sin ser muy conocidas.
- 45 El aporte de quelatos de hierro de síntesis con capacidad de complejarse con el hierro y de volverlo asimilable para las plantas es el medio de uso más común para corregir las carencias de hierro. Sin embargo, estos productos pueden plantear problemas medioambientales y de salud.
- 50 Las sustancias húmicas son capaces de complejarse con los metales presentes en el suelo, y en particular, el hierro. La formación de estos complejos permite volver los metales estén disponibles para los procesos nutricionales de las plantas, ya que evitan que los metales no se precipiten en forma de óxidos, hidróxidos o carbonatos que son insolubles y, por lo tanto, inaccesibles para las raíces de las plantas.
- 55 Una alternativa sería poder estimular los mecanismos naturales que las plantas poseen para aumentar la eficacia de la absorción del hierro presente en el suelo.
- Es en este contexto que los inventores han constatado, de una forma totalmente inesperada, que la utilización de una composición que comprende sustancias húmicas permite activar la expresión génica que codifica los agentes moleculares que están naturalmente implicados de forma específica en la absorción de hierro en las plantas.
- 60 En particular, las sustancias húmicas son capaces de activar la respuesta natural de las plantas que se encuentran en condiciones del que disponen de suficiente hierro.
- 65 Si otras moléculas, tales como el etileno o el óxido nítrico, pueden aumentar la respuesta de las raíces de las plantas en condiciones de carencia de hierro, no son capaces de inducir sin embargo esta respuesta en condiciones en las

que disponen de hierro suficiente.

Por lo tanto, existen dos categorías de moléculas capaces de actuar sobre la absorción de hierro en las plantas: las que pueden restaurar una absorción de hierro con el fin de evitar las consecuencias de una carencia (simple retorno a un nivel normal de absorción) pero que son incapaces de actuar en condiciones en las que hay suficiente hierro, y las que son capaces de restaurar la absorción de hierro en condiciones de carencia de hierro y de continuar a estimularla en condiciones en las que hay suficiente hierro, es decir, que son capaces de continuar activando la respuesta natural de las plantas para absorber hierro en exceso más allá del nivel estrictamente necesario.

Los inventores han demostrado de este modo que las sustancias húmicas pertenecen a esta segunda categoría de moléculas cuya utilización en condiciones en las que hay suficiente hierro permite conferir un cierto número de ventajas asociadas a las plantas.

De hecho, el "exceso de absorción" de hierro por parte de las plantas después de la utilización de sustancias húmicas confiere unas ventajas para la propia planta, en particular como un mejor crecimiento, una fotosíntesis mejorada, una resistencia incrementada a las patologías. Además, los diferentes efectos de las sustancias húmicas permiten mejorar el rendimiento de los cultivos y mejorar el contenido en hierro de las semillas de las plantas. Por otro lado, la utilización de las sustancias húmicas, de acuerdo con la invención, permite obtener plantas que poseen una ventaja nutricional puesto que están enriquecidas con hierro.

Las sustancias húmicas constituyen los elementos principales del humus que representa la materia orgánica natural del suelo. De composición heterogénea y compleja, estas sustancias pueden subdividirse en diferentes fracciones (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, humina) y en sub-fracciones (ácido glucídico, ácido úlmico, ácido apocrénico, ácido himatomelánico, etc.) en función de diferentes criterios, tales como su acidez, su color, su solubilidad, etc.

El siguiente esquema es una posible representación de las propiedades físico-químicas de las sustancias húmicas, de acuerdo con Stevenson, F. J., 1994. Humus Chemistry, Segunda Edition, Wiley, New York.

### Sustancias húmicas (polímeros pigmentados)

Ácidos fúlvicos		Ácidos húmicos		Humina
Amarillo claro	Marrón amarillo	Marrón oscuro	Gris-negro	Negro
aumento de la intensidad del color				→
aumento del grado de polimerización				→
2000	aumento del peso molecular			300.000 →
45%	aumento del contenido de carbono			62% →
48%	disminución del contenido de oxígeno			30% →
1400	disminución de intercambio de acidez			500 →
disminución del grado de solubilidad				→

De este modo, los ácidos húmicos representan una fracción de las sustancias húmicas que no es soluble en el agua en condiciones ácidas (pH < 2) pero soluble en valores de pH superiores.

Los ácidos fúlvicos representan, en cuanto a ellos, una fracción soluble en agua, sean cuales sean los valores del pH.

La humina representa la fracción de las sustancias húmicas que no es soluble en agua, sea cual sea el valor del pH.

En el marco de la presente invención, el término "condición de carencia de hierro" representa las condiciones en las que las plantas presentan signos exteriores o síntomas de carencia de hierro, tales como clorosis férrica (amarilleo de las hojas).

De este modo, el término "condición de suficiencia de hierro" significa unas condiciones en las que las plantas no presentan los síntomas de carencia de hierro mencionadas anteriormente.

La presente invención tiene por objeto la utilización de una composición que comprende sustancias húmicas como activador de la expresión génica que codifica los agentes moleculares que están específicamente implicados en la absorción de hierro en las plantas. La utilización de una composición de este tipo permite estimular la absorción de hierro en las plantas en condiciones de suficiencia de hierro.

De acuerdo con la invención, puede utilizarse cualquier materia orgánica rica en sustancias (SH) húmicas. En el marco de la presente invención, la materia orgánica utilizada deberá contener al menos un 5% de sustancias húmicas (peso/peso).

Entre las materias orgánicas naturales, en particular se pueden utilizar las leonarditas, los lignitos, las turbas, el compost de residuos orgánicos.

5 Cualquier materia orgánica de síntesis que contenga sustancias húmicas también puede utilizarse en el marco de la presente invención.

10 Las materias orgánicas que contienen sustancias húmicas pueden utilizarse tal cual o bien pueden extraerse previamente las sustancias húmicas antes de su utilización. Las sustancias húmicas en particular pueden extraerse y/o purificarse mediante procedimientos de sobra conocidos por los expertos en la materia (Stevenson, 1994, Humus Chemistry, Segunda Edición, Wiley, New York).

Preferentemente, se utiliza una composición que comprende sustancias húmicas que se han extraído previamente de la materia orgánica.

15 Por otro lado, las sustancias húmicas pueden proceder de un procedimiento de síntesis (Hanninen *et al.* 1987, The Science of the Total Environment, 62, 201-210) o de transformación de sustancias húmicas naturales, en particular, por hemisíntesis.

20 La materia orgánica natural preferente, de acuerdo con la invención, es la leonardita. De este modo, se utilizan preferentemente sustancias húmicas extraídas de la leonardita o bien se utiliza directamente la leonardita como materia orgánica natural que contiene sustancias húmicas.

25 De acuerdo con la invención, se puede utilizar cualquiera de las fracciones de las sustancias húmicas. Preferentemente, se utilizan los ácidos húmicos y/o los ácidos fúlvicos, y de una manera aún más preferente los ácidos húmicos. La composición utilizada, de acuerdo con la invención, puede comprender en concreto la fracción marrón y/o gris de los ácidos húmicos.

30 De acuerdo con un modo de realización particularmente preferente, las sustancias húmicas se presentan en forma de sales ácidas húmicas. Entre las sales preferentes, en particular se pueden citar, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de sodio, las sales de potasio. Preferentemente, se utilizan en particular las sales potásicas de ácidos húmicos.

35 En la composición que se ha utilizado, de acuerdo con la invención, las sustancias húmicas se presentan ventajosamente en una cantidad que oscila de un 5 a un 70% (peso/peso), preferentemente de un 10 a un 70% (peso/peso), o bien incluso de un 15 a un 50% (peso/peso).

40 La composición que comprende las sustancias húmicas también puede contener uno o varios nutrientes minerales (como por ejemplo, nitrógeno, urea, fosfato de diamonio, sulfato de amonio, potasa y fósforo), uno o varios compuestos bioestimulantes de las plantas, como por ejemplo azúcares, oligosacáridos, polisacáridos (por ejemplo, el quitosán), auxinas (ácido indolacético y derivados, triptófano), citoquininas (zeatina y derivados, isopentiladenina y derivados, isopentiladenosina y derivados, adenosina, adenina, isopentil-alcohol), giberelinas, etileno, o precursores del etileno, poliaminas, óxido nítrico o precursores dadores de óxido nítrico, nucleótidos cíclicos o compuestos que tienen la capacidad de aumentar la concentración intra-celular de nucleótidos cíclicos, aminoácidos, brasinoesteroides, salicilatos y ligno-sulfatos, o bien incluso extractos de algas que comprendan compuestos de este tipo.

En particular, la composición utilizada, de acuerdo con la invención, contiene L-triptófano además de las sustancias húmicas.

50 En general, estos nutrientes minerales estarán presentes en el interior de la composición en una cantidad de 1 a un 50% (peso/peso), y preferentemente en una cantidad de 1 a un 10% (peso/peso).

55 Además de las sustancias húmicas, cualquier compuesto adicional contenido en la composición que se utiliza, de acuerdo con la invención, está presente en las cantidades que habitualmente se utilizan y que son compatibles con el cultivo de las plantas.

60 La fabricación de la composición que comprende las sustancias húmicas utilizadas, de acuerdo con la invención, se realiza mediante una simple mezcla de los compuestos, bien en fase líquida acuosa u orgánica, o bien en fase sólida. Preferentemente, las sustancias húmicas se utilizarán en fase líquida acuosa, como el agua. Esta mezcla puede realizarse a cualquier temperatura y presión, y preferentemente a 25 °C y a 1 atmósfera de presión.

65 La composición que comprende las sustancias húmicas se puede presentar en forma de un producto líquido o sólido, insoluble en el agua o parcial o totalmente soluble en agua, y preferentemente soluble en agua. Entre las formas sólidas, la composición puede presentarse, por ejemplo, en forma de polvo o de granulados.

En el caso de una forma líquida, la composición comprende preferentemente de un 5 a un 15% (peso/peso) de sustancias húmicas, y en el caso de forma sólida, preferentemente de un 5 a un 70% (peso/peso) de sustancias húmicas.

- 5 Cuando la composición utilizada, de acuerdo con la invención, se presenta en forma sólida, comprende ventajosamente un agente fluidizante, como por ejemplo la sepiolita. Cuando la sepiolita se incorpora a la composición utilizada, de acuerdo con la invención, está presente en una cantidad que oscila de un 10 a un 50% (peso/peso).
- 10 De manera preferente, la composición se presenta en una forma particularmente bien adaptada a una distribución fácil y homogénea para el cultivo de plantas.

15 La composición se utiliza preferentemente mediante la aplicación a nivel de las hojas y/o raíces de las plantas que hay que tratar, mediante cualquier medio de distribución apropiado, como por ejemplo mediante pulverización en el caso de una formulación líquida. Preferentemente, la composición que comprende las sustancias húmicas se aplica a nivel de la región de las raíces de las plantas. La composición que comprende las sustancias húmicas también puede introducirse en el sistema de irrigación, en el agua y/o en el abono (fertilizante). En el caso de una formulación sólida, ésta puede distribuirse por toda la superficie del suelo o preferentemente localizarse en la región de las raíces de las plantas a tratar.

20 Generalmente, la composición se puede utilizar a razón de 5 a 50 litros por hectárea para una formulación líquida y de 100 a 750 kg por hectárea para una formulación sólida.

25 En particular, la composición se utiliza preferentemente en cantidades que oscilan de 5 a 30 litros por hectárea para una formulación líquida que contiene un 15% (peso/peso) de sustancias húmicas en forma de sales potásicas. En particular, se utilizan cantidades de aproximadamente 100 kg a 500 kg por hectárea en el caso de una formulación sólida que contiene un 30% (peso/peso) de sustancias húmicas. El experto en la materia sabrá adaptar las cantidades a utilizar en función del modo de aplicación elegido. En particular, las cantidades inferiores se utilizan preferentemente cuando la composición se aplica en la región de las raíces, mientras que las cantidades superiores se utilizan ventajosamente cuando la composición se aplica por toda la superficie del suelo. Por otro lado, las sustancias húmicas se utilizan en una sola aplicación o bien en varias aplicaciones con 15 días de separación.

30 La actividad de las sustancias húmicas sobre la absorción de hierro en las plantas se describirá más detalladamente en los siguientes ejemplos, y que se refieren a las figuras adjuntas en las que:

35 La figura 1 es una representación gráfica en forma de histograma del contenido relativo en ARNm de quelato-reductasa (*CsFRO1*; figura 1A) y del transportador específico de hierro IRT1 (*CsIRT1*, figura 1B) en las raíces de las plantas de pepino en contacto con una composición que comprende 2, 5, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup>C de sustancias (SH) húmicas. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de tres determinaciones de tres extracciones de raíces diferentes. Las barras de error representan el cálculo de error REST con la ayuda de las series de Taylor y la significación estadística a un nivel de 0,05 ( $p < 0,05$ ) por ensayo aleatorio se indica con un asterisco encima del histograma.

40 La figura 2 es una representación gráfica en forma de histogramas de la actividad quelato-reductasa (figura 2) de las raíces de plantas de pepino en contacto con una composición que comprende 2, 5, 100 y 250 mg L<sup>-1</sup>C de sustancias (SH) húmicas. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de tres determinaciones de tres extracciones de raíces diferentes. Unas letras diferentes encima del histograma indican que los valores son significativamente diferentes a un nivel de 0,05 ( $p < 0,05$ ), de acuerdo con el ensayo Tuckey-b.

45 La figura 3 representa la tasa de absorción de hierro por las raíces de las plantas de pepino expuestas a diferentes dosis de una composición que comprende sustancias (SH) húmicas. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de tres experiencias. (La pendiente de cada curva que corresponde a la velocidad de absorción de hierro por las plantas se indica en la tabla de la figura).

50 La figura 4 es una representación gráfica en forma de histogramas del contenido de hierro y clorofila (unidad SPAD) de las hojas de plantas de lechuga tratadas con una composición que comprende sustancias (SH) húmicas, comparado con el de las hojas de las plantas de control sin tratar.

55 La figura 5 representa la eficacia de la fotosíntesis (fotosistema II (A): fotosíntesis neta (B) de las plantas de lechuga tratadas con una composición que comprende sustancias (SH) húmicas, comparada con la obtenida con las plantas de control sin tratar.

60 La figura 6 es una representación gráfica del peso en seco de las hojas de las plantas de lechuga después del tratamiento con una composición que comprende sustancias (SH) húmicas, comparado al de las plantas de control sin tratar.

### Ejemplos

65 En estos ejemplos se estudian diferentes aspectos de los efectos en las plantas de una composición que comprende sustancias húmicas, tales como la expresión génica y de la actividad de los principales agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en plantas, la absorción y el contenido de hierro, la fisiología y el crecimiento

de las plantas tratadas.

A continuación, se describen ejemplos de composiciones que pueden utilizarse, de acuerdo con la invención (los % se expresan en peso/peso):

- 5
- una composición líquida que contiene un 15% de sales potásicas de ácidos húmicos procedentes de la leonardita.
  - una composición líquida que contiene un 15% de sales potásicas de ácidos húmicos procedentes de la leonardita y un 1% de L-triptófano.
- 10
- una composición sólida que contiene un 45% de sales potásicas de ácidos húmicos procedentes de la leonardita, un 15% de urea, un 10% de fosfato de diamonio y un 30% de sepiolita.
  - una composición sólida que contiene un 50% de leonardita y un 50% de sulfato de amonio.

### **Ejemplo 1 – Preparación de una composición que comprende sustancias (SH) húmicas**

#### **Extracción y purificación de los ácidos húmicos**

Los ácidos húmicos se extraen y purifican (AHP) a partir de la leonardita con la ayuda del método recomendado por la IHSS (*International Humic Substances Society “Sociedad internacional de Sustancias Húmicas”*). Se mezclan 10 g de leonardita sin secar con 200 ml de NaOH 0,1 M en un recipiente de 250 ml. Después de 45 horas de agitación a 25 °C en la oscuridad, el sobrenadante que contiene el extracto húmico no fraccionado se separa de la fracción sólida centrifugándolo a 7650 g durante 30 minutos. La extracción se realiza en una atmósfera inerte (N<sub>2</sub>). Los AHP se obtienen por acidificación de una alícuota del extracto alcalino que contiene los ácidos húmicos con ácido clorhídrico (HCl) a 6 M hasta obtener un pH de 1,5. Después de 12 horas, la muestra acidificada se centrifuga a 7650 g durante 30 minutos con el fin de separar los ácidos húmicos precipitados del sobrenadante que contiene los ácidos fúlvicos y los otros compuestos orgánicos solubles en ácido. Tras lavarlo con agua para eliminar la contaminación Cl<sup>-</sup>, los AHP se liofilizan.

Se prepara una composición líquida que contiene un 15% de sales potásicas de ácidos húmicos procedentes de leonardita de la siguiente manera: los ácidos húmicos purificados se disuelven en una proporción de un 15% peso/peso en agua, posteriormente se someten a un tratamiento básico por KOH 0,1 M hasta alcanzar un pH 10.

### **Ejemplo 2 – Efectos de las sustancias húmicas en la expresión génica de los principales actores moleculares específicos de la absorción de hierro en las plantas**

Los dos agentes moleculares sometidos a ensayo en este ejemplo que están implicados específicamente en la absorción de hierro en las plantas son la quelato-reductasa FRO1 y el transportador específico de hierro, *Iron Regulated transporter 1* (IRT1).

El efecto de las sustancias húmicas en la expresión génica que codifica estas proteínas así como la actividad de estas proteínas se estudian en las plantas tratadas con una composición que comprende sustancias húmicas y comparadas a las que se obtienen en las plantas de control cultivadas sin aportarles sustancias húmicas.

Se ponen a germinar semillas de *Cucumis sativus* L. (variedad *Ashley*) en la oscuridad sobre papel filtro húmedo con CaSO<sub>4</sub> 1 mM. Las plantas de 7 días se trasplantan a un medio hidropónico en un recipiente de cristal negro de 900 ml que contiene una solución nutritiva ventilada, como describe Romera *et al.*, 1999, *Annals of Botany* 83:51-55. La solución nutritiva contiene 40 µM de hierro en forma de quelato EDTA. El pH de la solución nutritiva se lleva a 6 con el fin de evitar la descomposición de los quelatos EDTA-hierro y la precipitación de hierro (*i.e.* condición de suficiencia de hierro). No se ha observado ninguna precipitación de las especies inorgánicas de hierro a lo largo del experimento. Las plantas se cultivan en invernadero a 25/15 °C día/noche, a 40-60% de humedad y con luz natural durante un período de exposición de 14 horas.

Después de 21 días de cultivo, se han constituido diferentes grupos: un grupo de control de plantas que reciben únicamente la solución nutritiva y cuatro grupos de plantas que se tratan con la composición que comprende sustancias húmicas a razón de 2, 5, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> C (mg equivalente de carbono por litro). La composición del ejemplo 1 que contiene un 15% de sustancias húmicas se diluye en la solución nutritiva hasta alcanzar las diferentes concentraciones, partiendo de la base del contenido de carbono de los ácidos húmicos que es de aproximadamente un 58% (el análisis del contenido de carbono es de sobre conocido en el estado de la técnica: oxidación del carbono por permanganato en el medio básico o por dicromato en medio ácido (Stevenson, 1994, *Humus Chemistry*, Segunda Edición, Wiley, New York).

Después de 4, 20, 48, 72 y 96 horas de tratamiento, las plantas se cosechan y el material vegetal se utiliza para los diferentes análisis. 48 horas antes de cada cosecha, las plantas se estabilizan en una cámara de crecimiento (irradiación: 250 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante un período de exposición de 14/10 h día/noche, a una temperatura media de 23/21 °C día/noche y una humedad relativa del 60-75%. Además, las plantas reciben 6 h de luz antes de la cosecha.

La expresión génica que codifica la quelato-reductasa (CsFRO1) y el transportador de hierro, Iron Regulated Transporter 1 (CsIRT1), que están implicados específicamente en la toma de hierro en las plantas se estudia con RT-PCR en tiempo real de la siguiente manera:

5 Análisis de los transcritos ARNm con RT-PCR

10 Las raíces apicales (2-3 cm) se cosechan y trituran en nitrógeno líquido antes de sacarles el ARN. Los ARN totales se extraen a partir de 60 mg de triturado utilizando 350 µl de tampón de lisis guanidina-HCl del kit ARN de plantas Nucleospin® (Macherey-Nagel, Alemania), y 3,5 µl de β-mercaptoetanol con la ayuda de un “robot” triturador/homogeneizador durante 45 segundos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una ADNasa digiere los ácidos nucleicos extraídos y los ARN resultantes se cuantifican mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm. La eliminación del ADN se verifica con una PCR en tiempo real que contiene 50 ng de ARN totales (sin previa transcriptasa inversa) y unos cebadores específicos de la α-tubulina (CsTua1; véase Tabla 1).

15 La ausencia de contaminación proteica se confirma con una relación de 260/280 nm superior a 1,8. La integridad de los ARN se verifica mediante electroforesis en gel de agarosa formaldehído 1% con Sybr Gold. La ausencia de inhibidores en los 250 ng de muestras de ARN se verifica también mediante el ensayo SPUD con Sybr green, como se describe en Nolan *et al.*, 2006, Analytical Biochemistry, 351, 308-310.

20 La primera cadena de ADNc se prepara en 20 µl de reacción que contiene 1 µg de ARN con una transcriptasa inversa RNasa H+ MMLV, una mezcla de oligo(dT) y unos cebadores aleatorios, con la ayuda de un kit de síntesis de ADNc iScript® (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA). La transcripción inversa se realiza durante 5 minutos a 25 °C, después de 30 minutos a 42 °C y finaliza con 5 minutos a 85 °C. La calidad de los ADNc se verifica con la relación de amplificación en 5' y 3' (realizando una PCR en tiempo real con unos cebadores específicos de la α-tubulina (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8; CsTua 4 en 5' y SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 CsTua 6 en 3'; véase Tabla 1).

30 La PCR en tiempo real se realiza a 50 ng de ADNc, utilizando el supermix iQ Sybr green que contiene un ADN polimerasa “hot-start” ITaq en un iCycler iQ (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA). Las parejas de cebadores utilizados para amplificar el ADNc que codifica la Fe<sup>3+</sup> quelato-reductasa de *Cucumis sativus* (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; CsFRO1) y el ADNc que codifica el transportador de hierro de *Cucumis sativus* (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; CsIRT1), así como la α-tubulina (gen de referencia, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; CsTua1) se diseñan con la ayuda del programa de ordenador Beacon Premier Biosoft y se sintetizan mediante Sigma-Genosys (UK). Las secuencias de los cebadores utilizados se recapitulan en la siguiente tabla 1.

35

**Tabla 1**

Definición de la secuencia objetivo (gen)	Número de acceso Genbank	Longitud del amplicón (pb)	Nombre de los cebadores		Secuencia de los cebadores
ADNc entero de la reductasa férrica de <i>Cucumis sativus</i> .	AY590765	152	CsFRO1	sentido	5'-AGCGGCGGCAGTGAATC-3' (SEQ ID NO: 1)
				antisentido	5'-GTTTGGAGGAGGTGGAGGAA GG-3' (SEQ ID NO: 2)
ADNc entero del transportador con fuerte afinidad de hierro de <i>Cucumis sativus</i> .	AY590764	259	CsIRT1	sentido	5'-TTCGCAGCAGGTATCATTCTC G-3' (SEQ ID NO: 3)
				antisentido	5'-CACCACTACTACAGGAACT C-3' (SEQ ID NO: 4)

Definición de la secuencia objetivo (gen)	Número de acceso Genbank	Longitud del amplicón (pb)	Nombre de los cebadores		Secuencia de los cebadores
ADNc parcial de la $\alpha$ -tubulina de <i>Cucumis sativus</i> (gen tua).	AJ715498	129	Cstua1	sentido	5'-ACCGTTGGAAAGGAAATTGTG-3' (SEQ ID NO: 5)
				antisentido	5'-GGAGCCGAGACCAGAACC-3' (SEQ ID NO: 6)
		141	Cstua4	sentido	5'-ACTACACCGTTGGAAAGGAAATTG-3' (SEQ ID NO: 7)
				antisentido	5'-AAAGGAGGGAGCCGAGACC-3' (SEQ ID NO: 8)
		149	Cstua6	sentido	5'-GACATTGAGCGACCTAACTAC-3' (SEQ ID NO: 9)
				antisentido	5'-AACTGGATTCTGGGATATGGG-3' (SEQ ID NO: 10)

5 El programa de PCT en tiempo real consiste en una activación del ADN polimerasa iTaq a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (etapa de desnaturalización de 10 segundos a 95 °C, etapa de hibridación de 10 segundos a 62 °C y etapa de elongación de 10 segundos a 72 °C durante las que se registran los valores de fluorescencia). Para confirmar los productos de la PCR, se realiza una curva de desnaturalización térmica calentando las muestras de 72 °C a 98 °C en etapas de 0,1 °C con un tiempo de parada de 10 segundos en cada temperatura durante el cual se registran los valores de fluorescencia. La temperatura de desnaturalización térmica de los productos se determina con la ayuda del programa informático *iCycler iQ Optical System* (versión 3, 10 Laboratorios Bio-Rad).

15 La eficacia de reacción de la PCR (entre 1,99 y 2,02) se determina en la pendiente de la curva estándar realizada mediante una serie de diluciones de la mezcla de los ADNc a ensayar, y esto con cada pareja de cebadores específicos en el gen de interés. La expresión génica objetivo se normaliza con respecto a la expresión de la  $\alpha$ -tubulina. La expresión relativa (x-veces) del gen objetivo normalizado se calcula con la ayuda del programa informático *Relative Expression Software Tool-Multiple Condition Solver* (programa informático REST-MCS-beta, versión de agosto 2006), en comparación con las plantas de control, considerando los valores de eficacia, de acuerdo con los modelos matemáticos propuestos por Pfaffl *et al.*, 2002, *Nucleic Acid Research* 30 (9), e36.

20 Los resultados de la expresión génica que codifica los principales agentes moleculares específicos de la absorción de hierro, tras la aportación de sustancias húmicas se representan en la figura 1 (expresión transcripcional de la enzima quelato-reductasa FRO1 (A) y expresión transcripcional del transportador de hierro Iron Regulated Transporter 1 (B)).

25 **Ejemplo 3 – Efectos de las sustancias húmicas en la actividad enzimática de los principales actores moleculares específicos de la absorción de hierro en las plantas**

30 Las plantas se cultivan y tratan con la composición que comprende las sustancias húmicas, tal como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Ensayo quelato-reductasa en raíces enteras

35 La reducción del  $Fe^{3+}$ -EDTA por parte de las raíces de las plantas de pepino se mide, tal y como se describe en Pinton *et al.*, 1999, *Plant and Soil* 210, 145-157, con la ayuda de un reactivo batofenantrolina disulfanato (BPDS). Brevemente, las raíces de una planta única (1 g) se incuban en 5 ml de una solución nutritiva que contiene  $Fe^{3+}$ -EDTA 0,387 mM y BPDS a 0,286 mM (pH 5,5) en la oscuridad a 25 °C. Después de 30 minutos, la absorbancia de la solución se mide a 535 nm y la cantidad de  $Fe^{3+}$  reducido se calcula por la concentración de complejos  $Fe^{2+}$ -BPDS formados, utilizando un coeficiente de extinción de 22,1  $mM^{-1} cm^{-1}$ .

La reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  se mide 4, 24, 48, 72 y 96 horas después de añadir la composición que comprende las sustancias húmicas a 2, 5, 100 y 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  C.

5 La actividad quelato-reductasa se expresa con respecto al peso (PF) en fresco de las raíces y los resultados se representan en la figura 2.

De este modo, los resultados presentados en las figuras 1 y 2 demuestran que las sustancias húmicas son capaces de activar la expresión génica y la actividad de los principales agentes moleculares que están específicamente implicados en la absorción de hierro en las plantas.

10

#### **Ejemplo 4 – Efectos de las sustancias húmicas en la tasa de absorción de hierro por las plantas**

Las plantas se cultivan y se tratan con la composición que comprende las sustancias húmicas, tal como se describe en los ejemplos 1 y 2.

15

La concentración de hierro se mide en las muestras correspondientes a las 4, 24, 48, 72 y 96 horas después de añadir la composición que comprende las sustancias húmicas.

20

Las hojas se secan en la estufa a 40 °C durante 48 horas. A continuación, se trituran con un triturador de titanio. 0,5 g de triturado se digieren en botes de teflón “bombas de digestión” con 2 ml de peróxido de hidrógeno 30% y 8 ml de ácido nítrico 65%. La digestión se realiza durante 30 minutos a 200 °C en un microondas Ethos de Milestone. Las digestiones se calibran a 25 ml con agua destilada de calidad MilliQ.

25

La concentración de hierro se mide con ICP-OES (Termo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL). La potencia de la fuente de radiofrecuencia utilizada es de 1150 W, el flujo de nebulización de la muestra es de 0.58 l/min con un flujo de gas auxiliar de 0.50 l/min. La muestra se introduce con un flujo constante de 1.85 ml/min. Su detección a 240.488 nm; 259.940 nm y 261.187 nm se realiza después de 10 segundos de integración.

30

El cálculo de la concentración se hace gracias a una curva de calibración de una serie de diluciones de una solución patrón conocida, y se expresa en función del peso en seco (0.5 g) y del factor de dilución (25 ml). La concentración obtenida mg/l es el resultado de la media de tres medidas.

35

Los resultados obtenidos se representan en la figura 3. En cada tiempo indicado, la absorción de hierro se mide por la diferencia entre el hierro-EDTA en la solución al principio y al final de cada intervalo. La tasa de absorción de hierro por las raíces se expresa con respecto al peso en fresco de las raíces.

Estos resultados muestran que la aportación de las sustancias húmicas permite aumentar la tasa de absorción de hierro en las plantas.

40

#### **Ejemplo 5 – Efectos de las sustancias húmicas en el contenido de hierro y el crecimiento de las plantas**

Los efectos de la utilización de una composición que comprende sustancias húmicas en las plantas se estudia a diferentes niveles: el contenido de hierro de las hojas, el contenido de clorofila de las hojas, la eficacia de la fotosíntesis y el peso del sistema foliar.

45

Se cultivan plantas de lechuga en macetas de 3 litros que contienen perlita y se irrigan cada día con una solución completa de “hogland” que contiene un mínimo de 40  $\mu\text{M}$  de hierro disponible (3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.004 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.023 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.004 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.00015 mM  $\text{CuSO}_4$ , 0.00005 mM  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  y 1 g 200  $\text{mL}^{-1}$   $\text{Fe}^{3+}$ EDTA; bien para cada elemento: N 2 mM, P 0,10 mM, K 7,8 mM, Ca 0,18 mM, Mg 0,07 mM, Fe 40  $\mu\text{M}$ , Cu 0,3  $\mu\text{M}$ , Zn 0,7  $\mu\text{M}$ , Mn 7,29  $\mu\text{M}$ , B 11,3  $\mu\text{M}$ ).

50

Las plantas se tratan con la ayuda de una composición líquida que contiene un 15% de sales potásicas de ácidos húmicos procedentes de la leonardita, tal y como se describe en el ejemplo 1. Esta composición se aplica mediante irrigación de las raíces a razón de 2,5 litros por hectárea en una sola aplicación.

55

Las plantas se cultivan en invernadero a 25/15 °C día/noche, a 40-60% de humedad y a la luz natural durante un período de exposición de 14 horas.

60

Después de 34 días de cultivo en estas condiciones, se cosechan las plantas. Se toman las diferentes medidas y luego se comparan a las obtenidas con las plantas de control sin tratar con la composición que comprende las sustancias húmicas, tal y como se describe a continuación. Las medidas relativas al fotosistema II y a la fotosíntesis real se toman después de 13, 18, 27 y 34 horas de cultivo, de acuerdo con el método descrito por Jackson E., *et al.*, 1986, *The Analysis of Agricultural materials*. London, UK; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

65

Para medir el contenido de clorofila, la hoja se introduce en la pinza de medida del SPAD 502meter (Minolta, Osaka, Japan). El contenido relativo de clorofila se expresa en unidad SPAD y se determina por la medida de la

transmitancia de la hoja a dos longitudes de onda (600 nm y 700 nm). Este contenido hace referencia a la prueba experimental.

5 La eficacia de la fotosíntesis se mide con la ayuda de dos parámetros: la fotosíntesis neta que representa la concentración de CO<sub>2</sub> absorbido por las hojas de las plantas y el fotosistema II que mide la fluorescencia de la clorofila y da de este modo una indicación de la eficacia de la producción de energía a partir de la luz.

10 Para medir la fotosíntesis neta, la hoja se introduce en una cámara térmica del sistema CIRAS-2 PP que tiene las mismas condiciones experimentales de temperatura, humedad, CO<sub>2</sub> y luz que activan la fotosíntesis (PAR) que el invernadero. El valor de fotosíntesis neta se obtiene en proporción a la superficie foliar analizada y se expresa en μmol de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

15 En lo referente al fotosistema II, la eficacia fotosintética se evalúa con la ayuda de los parámetros de fluorescencia utilizados de forma convencional y tales como los describen Baker, N. R., Rosenqvist, E., 2004, J. Exp. Bot., 55, 1607-1621.

Por último, para medir el peso en seco de las hojas, éstas se secan en una estufa a 40 °C durante 48 h, después se pesan en una balanza analítica.

20 Los resultados se representan en las figuras 4 a 6.

25 El tratamiento de las plantas con la composición que comprende sustancias húmicas aumenta de forma significativa el contenido de hierro y de clorofila de las hojas. Este efecto también se asocia a un aumento significativo de la actividad fotosintética en las plantas tratadas.

El efecto positivo global de las sustancias húmicas en la asimilación de hierro y los procesos fisiológicos principales unidos al hierro (síntesis de clorofila y actividad fotosintética) conlleva un aumento significativo del peso en seco finalmente medido en las plantas que se han tratado con la composición que comprende las sustancias húmicas.

30 Estos resultados demuestran que la utilización de una composición que comprende sustancias húmicas permite mejorar el contenido de hierro y el crecimiento de las plantas.

#### LISTA DE SECUENCIAS

35 <110> TIMAC AGRO INTERNATIONAL  
Lemerger, Diane  
Bacaicoa, Eva  
García-Mina, José María  
Yvin, Jean-Claude

40 <120> Utilización de las sustancias húmicas como activadores de los agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en las plantas

45 <130> 1H294250 0001 WO PCT

<150> FR 07 58196  
<151> 2007-10-10

50 <160> 10

<170> Patentin versión 3.3

55 <210> 1  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> Cebador con sentido CsFRO1

<400> 1  
agcggcggca gtggaatc 18

65 <210> 2  
<211> 22  
<212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido CsFRO1  
 5  
 <400> 2  
 gttggagga ggtggaggaa gg 22  
 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador con sentido CsIRT1  
 15  
 <400> 3  
 ttcgcagcag gtatcattct cg 22  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido CsIRT1  
 25  
 <400> 4  
 caccactcac tacaggcaac tc 22  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador con sentido Cstua1  
 35  
 <400> 5  
 accgttggaaggaaattgt tg 22  
 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido Cstua1  
 45  
 <400> 6  
 ggagccgaga ccagaacc 18  
 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador con sentido Cstua4  
 55  
 <400> 7  
 actacaccgt tggaaggaa attg 24  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 60  
 65

# ES 2 399 559 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador antisentido Cstua4

5

<400> 8  
aaaggagga gccgagacc 19

<210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Cebador con sentido Cstua6

15

<400> 9  
gacattgagc gacctaacta c 21

20

<210> 10  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> Cebador antisentido Cstua6

<400> 10  
aactggattc tgggatagg g 21

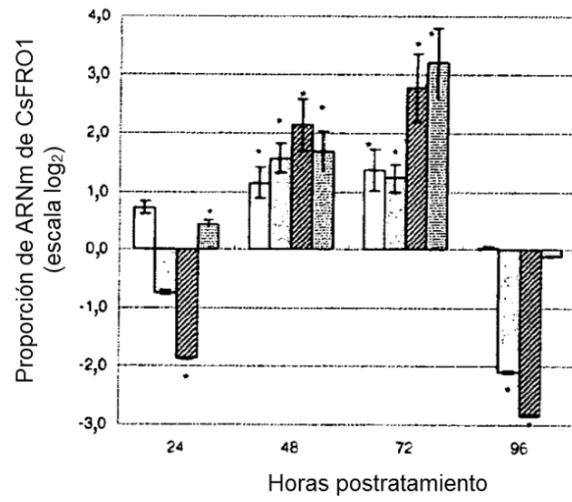
30

**REIVINDICACIONES**

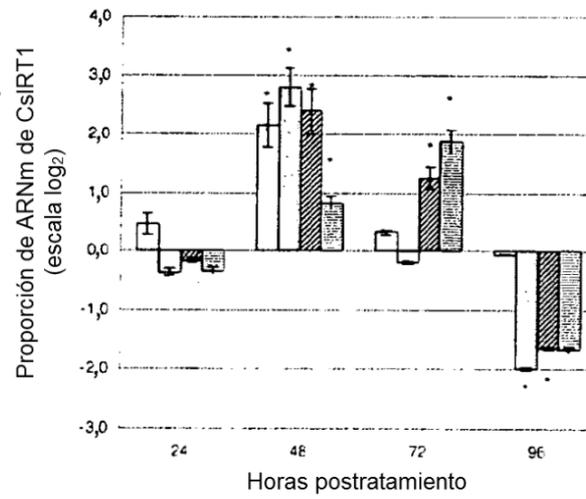
- 5 1. Utilización de una composición que comprende sustancias húmicas como activador de la expresión génica que codifica los agentes moleculares específicos de la absorción de hierro en las plantas, en condiciones de suficiencia de hierro.
2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las plantas son plantas “no gramíneas”.
- 10 3. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas se extraen de materias orgánicas naturales.
- 15 4. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas son el resultado de un procedimiento de síntesis o de la transformación de sustancias húmicas naturales.
- 20 5. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas son las de la leonardita.
6. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas son ácidos húmicos y/o ácidos fúlvicos.
- 25 7. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas están constituidas por la fracción marrón y/o por la fracción gris de los ácidos húmicos.
8. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las sustancias húmicas se presentan en forma de sales potásicas.
- 30 9. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicha composición contiene de un 5 a un 70% de sustancias húmicas.
- 35 10. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicha composición contiene uno o varios compuestos adicionales escogidos entre los nutrientes minerales y los compuestos bioestimulantes de las plantas.
- 40 11. Utilización de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** dicha composición contiene L-triptófano.
12. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicha composición se presenta en forma sólida o líquida, soluble, parcialmente soluble o insoluble en el agua.
- 45 13. Utilización de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizada por que** dicha composición se presenta en forma líquida.
14. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicha composición se utiliza en cantidades que oscilan de 5 a 50 litros por hectárea en el caso de una composición en forma líquida y que oscila de 100 a 750 kg por hectárea en el caso de una composición en forma sólida.

■ Control    □ 2 mg·L<sup>-1</sup> C    □ 5 mg·L<sup>-1</sup> C    ▨ 100 mg·L<sup>-1</sup> C    ▩ 250 mg·L<sup>-1</sup> C

**A**



**B**



**FIGURA 1**

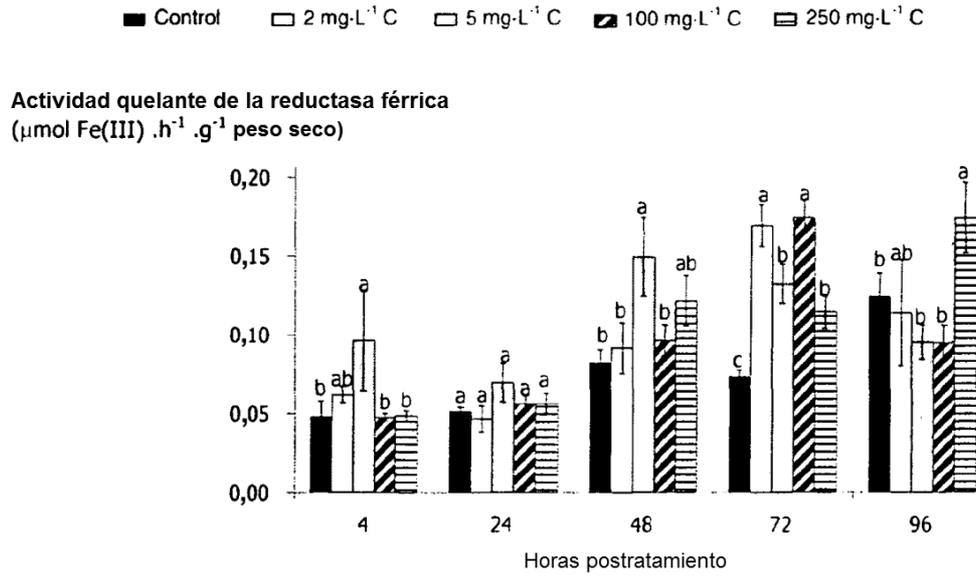
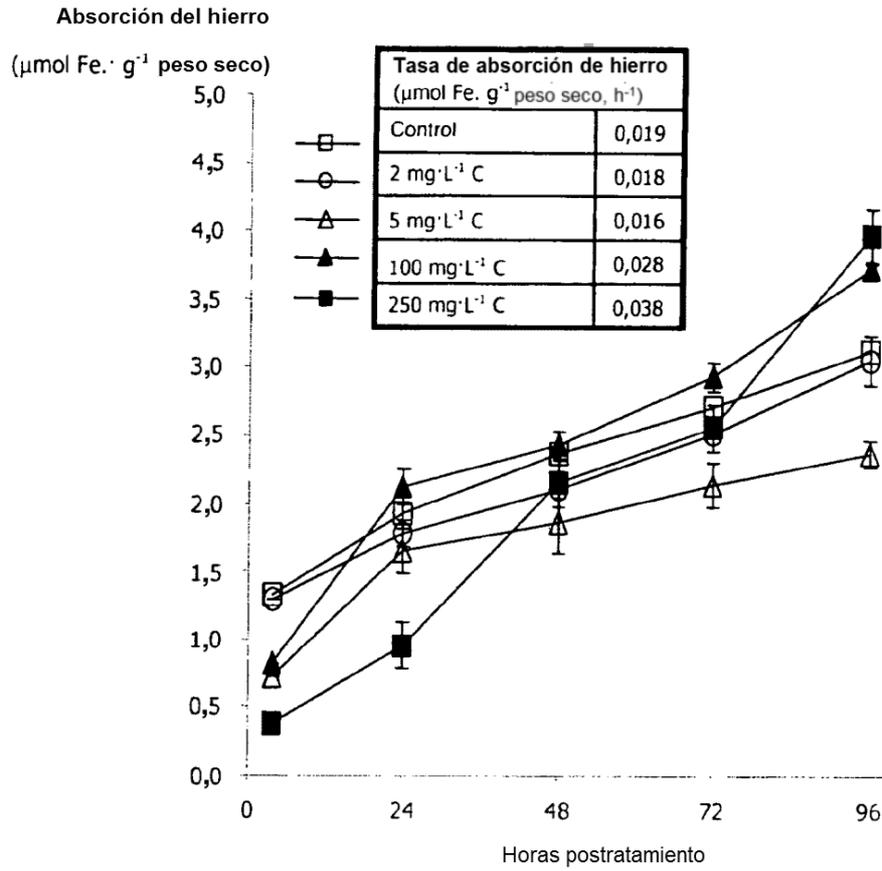


FIGURA 2



**FIGURA 3**

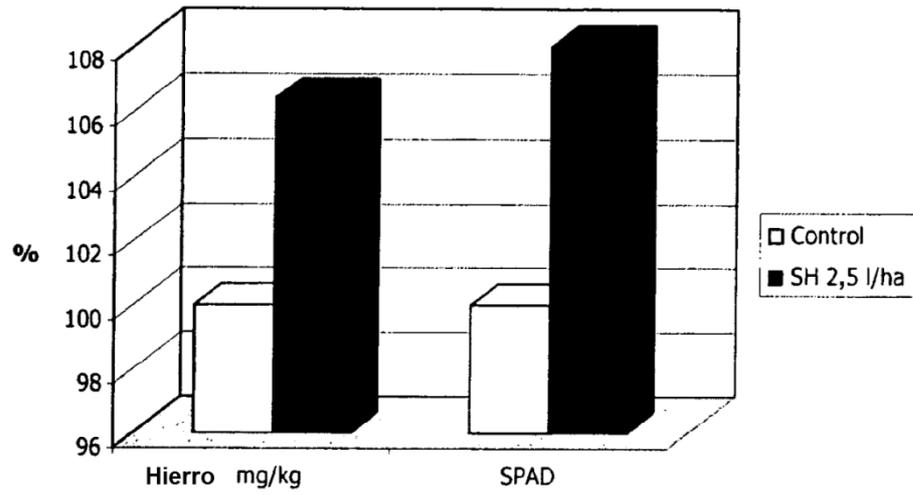
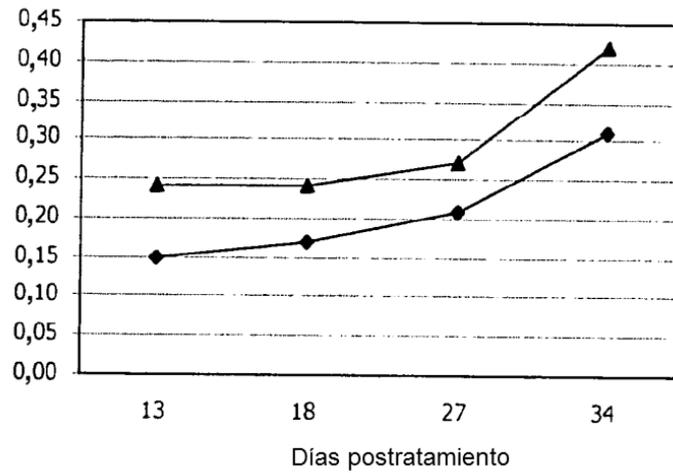


FIGURA 4

**A**

Fotosistema II



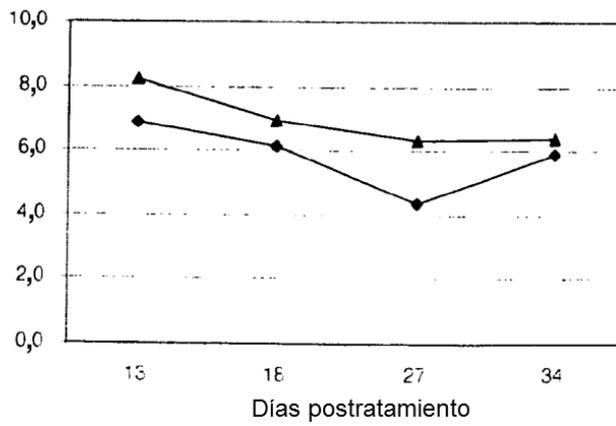
—◆— Control

—▲— SH 2,5 l/ha

**B**

Fotosíntesis neta

( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )



**FIGURA 5**

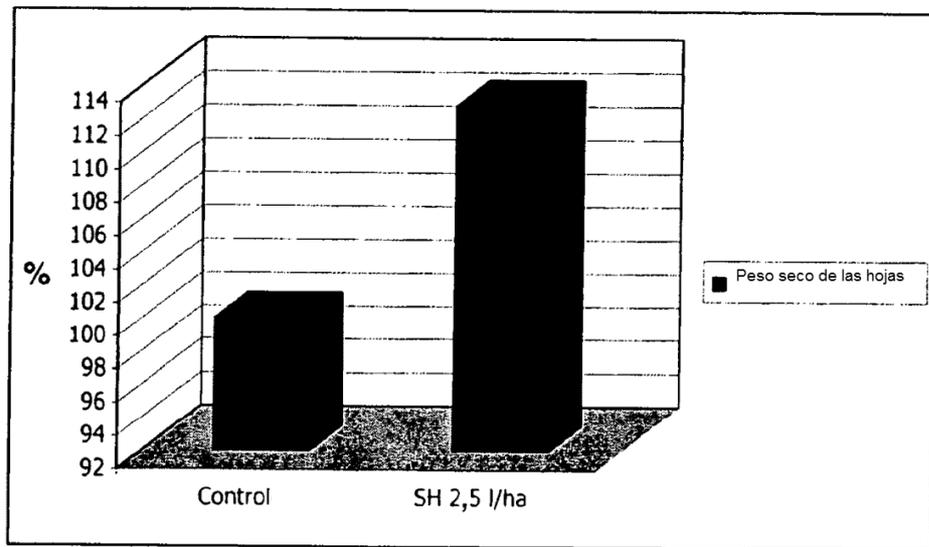


FIGURA 6