

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 012**

51 Int. Cl.:

A01N 37/42 (2006.01)

A01N 37/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007** **E 07789018 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 2066176**

54 Título: **Mejoras relacionadas con la protección de las plantas**

30 Prioridad:

13.07.2006 GB 0613901

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

17.09.2013

73 Titular/es:

**PLANT BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
NORWICH RESEARCH PARK, COLNEY LANE
NORWICH, NORFOLK NR4 7UH, GB**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, MICHAEL RICHARD;
PAUL, NIGEL DUNCAN;
TAYLOR, JANE ELIZABETH;
CROFT, PATRICIA y
MOORE, JASON PAUL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 423 012 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

Mejoras relacionadas con la protección de las plantas

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a la protección de las plantas, en particular, al uso de composiciones para el tratamiento de semillas para tratar semillas, para proteger las plantas frente a plagas.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Las enfermedades de los cultivos están producidas por microorganismos patógenos de las plantas, (por ejemplo, hongos, bacterias o virus) que pueden infectar la planta en diversas etapas del desarrollo, desde la semilla latente a la planta madura. El ataque de diferentes patógenos da como resultado enfermedades muy diferentes, desde la muerte del tejido rápida y a gran escala hasta infecciones crónicas a largo plazo. Las plagas de los cultivos abarcan una amplia gama de animales, pero la mayor parte son invertebrados, que incluyen nematodos y artrópodos tales como insectos o ácaros. Estas plagas se alimentan de los tejidos de las plantas, atacando diferentes plagas a diferentes tejidos de diferentes maneras. Por ejemplo, por una parte, los nematodos pueden sorber los contenidos de las células individuales de la raíz mientras que las grandes plagas de insectos pueden masticar grandes extensiones de follaje.

[0003] Dejando de lado prácticas de cultivo tales como la rotación e higienización de cultivos, la mayor parte de la protección de los cultivos ha dependido de la aplicación de agentes (pesticidas, que es el término utilizado contra plagas y enfermedades) que son directamente tóxicos para los microbios que producen la plaga o enfermedad. Por ejemplo, las plagas pueden tratarse utilizando insecticidas o nematocidas, las enfermedades tratarse con agentes antimicrobianos, tales como fungicidas o bactericidas. Dependiendo del sitio de la infección o ataque, los pesticidas se pueden aplicar al cultivo de numerosas formas, que incluyen las pulverizaciones foliares, fungicidas para suelos o tratamientos de semillas. Con respecto al procedimiento de aplicación, los pesticidas convencionales pueden actuar mediante contacto directo con la plaga o el patógeno, o la planta puede absorberlos y completar su función cuando se consumen los tejidos de la planta (por ejemplo, pesticidas sistémicos).

[0004] Cuando se usan pesticidas conocidos como tratamientos para semillas, las semillas se revisten con agentes que se diseñan para inhibir o interferir directamente con patógenos o plagas y estos se secan sobre las semillas. Dichos tratamientos se desean principalmente para proporcionar protección directa frente a los patógenos o plagas que se transmiten a través del suelo que atacan las semillas, plántulas o raíces. En la mayoría de los casos, la protección observada es transitoria y se deteriora a medida que el agente protector se degrada, diluye o localiza en el suelo y las raíces a medida que progresa el crecimiento.

[0005] Una desventaja de los pesticidas conocidos es que muchos son también tóxicos para las especies no diana, dando como resultado reducciones en la biodiversidad e incluso perjuicios a especies beneficiosas tales como insectos polinizantes o predatorios. Además, existen riesgos para el consumidor relacionados con la posible toxicidad para seres humanos de algunos pesticidas conocidos.

[0006] Se ha utilizado la modificación genética como una alternativa a los pesticidas en la Gestión Integrada de Plagas (IPM), que combina prácticas de cultivo con el uso de parásitos o predadores de plagas como medio de control biológico. Sin embargo cada una de las mismas tiene desventajas.

[0007] Una solución adicional para el control de plagas intenta hacer uso de los sistemas de defensa naturales de las plantas. Las plantas responden a una amplia gama de estímulos ambientales. Las respuestas incluyen aquellas que proporcionan protección contra las plagas (por ejemplo, herbívoros tales como insectos) y patógenos (por ejemplo, hongos, bacterias, virus, etc.). Las respuestas de la planta a la plaga o al ataque de patógenos se lleva a cabo mediante una cadena de acontecimientos que vinculan el reconocimiento inicial del estímulo a cambios en las células de la planta que conducen en último extremo a la protección. De esta manera, en respuesta a la herida y al estímulo de la plaga/patógeno, existen acontecimientos locales y sistémicos inducidos, con rutas de transducción de la señal que se producen en el sitio local, señal(es) sistémicas que comunican los acontecimientos locales en torno a la planta, y rutas de transducción de la señal que se producen en células distantes que son respuestas a la(s) señal(es) sistémica(s).

[0008] Las moléculas de señalización de las plantas juegan un papel central en estas respuestas inducidas a

los estímulos ambientales, debido a que actúan como señales moleculares intermediarias que vinculan el ataque al(a los) efecto(s) finales internos en la planta. Por ejemplo, en una variedad de especies vegetales, se sabe que se acumula ácido jasmónico de forma transitoria tras una herida o ataque por parte de un herbívoro, y está vinculado a la activación de genes sensibles a la herida. Otro ejemplo es durante las interacciones entre plantas y patógenos, donde se sabe que el ácido siálico aumenta en cantidad y se considera que es un regulador central de la resistencia local y sistémica adquirida (SAR) y la activación de genes relacionados con la defensa asociados con resistencia a la enfermedad.

[0009] Se ha aplicado ácido jasmónico (JA) como pulverizador foliar externo (y también como fungicida de la raíz) para inducir resistencia a plagas de insectos en cultivos tales como tomate (*Solanum lycopersicum*) y parra. Sin embargo, dichas aplicaciones foliares (y la raíz) de JA o sus derivados son propensas a producir un daño directo al cultivo, produciendo, por ejemplo, fitotoxicidad, y son demasiado caras para ser comercialmente viables.

[0010] El documento US5977060 da a conocer el uso de la proteína Harpin de *Erwinia amylovora* para inducir respuestas hipersensibles y de resistencia adquirida sistémica en cultivos para proporcionar protección a la enfermedad frente a hongos que se propagan a través del suelo, nematodos y algunos insectos que atacan a las plántulas jóvenes en crecimiento. Sin embargo, la protección proporcionada frente a insectos mediante el remojo de las semillas parece limitarse a los áfidos, es decir, los artrópodos que se alimentan de la savia. El remojo se aplica antes de la siembra y parece que podría proporcionar protección real a la planta posponiendo el remojo de las semillas en las siembras, aplicando eficazmente la proteína directamente en las siembras. Harpin tiene también la desventaja de que es el resultado de una manipulación genética que puede limitar mucho su uso en muchas zonas.

[0011] Se conoce el uso de ácido jasmónico como un remojo de las semillas aplicado a la germinación de semillas de guisante y melón, pero solo con el objetivo de proporcionar protección frente a la enfermedad fúngica. La protección transmitida a las plantas era limitada y probablemente ha derivado de transferir directamente el ácido jasmónico a la simiente en germinación.

[0012] Por ejemplo, Buzi y col. (J. Phytopathology, Vol. 152, 2004, páginas 34-42) se refieren a la inducción de resistencia frente a una enfermedad transmitida a través del suelo en melón mediante tratamientos de semillas con acibenzolar-S-metilo y metil jasmonato.

[0013] El documento WO 2005/074710 se refiere al tratamiento de semillas de guisante germinadas con composiciones que pueden incluir ácido metil jasmónico.

[0014] El documento WO 2005/018319 se refiere a procedimientos para inhibir el crecimiento de organismos patógenos, particularmente hongos, bacterias y/o insectos, en tejidos de plantas aplicando un regulador de la auxina o del crecimiento de las plantas (PGR), que afecta al nivel de auxina en el tejido de la planta.

[0015] El documento JP 2003034607 se refiere al tratamiento de semillas con microorganismos y un inductor, que puede ser ácido jasmónico, para proporcionar resistencia frente a la enfermedad transmitida a través de las semillas y no se refiere a la inducción de resistencia a la plaga.

[0016] El documento RU 2153794 se refiere a la preparación del grano para un almacenamiento prolongado del mismo frente a deterioro debido a hongos, utilizando una mezcla de ácido propiónico y ácidos jasmónicos para formar una película sobre la superficie de la semilla de maíz.

[0017] El documento ES 2 129 371 se refiere a un procedimiento en el cual se puede tratar la semilla de maíz con una composición germicida (por ejemplo, un antifúngico) que incluye, entre otras, una baja concentración de ácido jasmónico como un aditivo opcional en una película en el exterior de la semilla.

[0018] El documento US 2005/0260182 se refiere a procedimientos para proteger plantas frente al ataque de un patógeno vegetal y a procedimientos para inhibir el crecimiento bacteriano, el crecimiento fúngico, la infección vírica, el crecimiento de organismos parásitos, y el crecimiento de células cancerosas utilizando antibióticos del péptido coronamicina.

[0019] Amruthesh K.N. y col. (European Journal Of Plant Pathology, 111(2), 125-137, 2005) y Zinov'eva, S. V. y col. (Doklady Akademii Nauk , 347(5), 711-713, 1996) se refiere al uso de ácidos grasos insaturados para inducir resistencia a la enfermedad en plantas.

[0020] El documento WO02055480 se refiere a la aplicación de coronalon y los compuestos relacionados para inducir resistencia a los patógenos, incluyendo insectos. Coronalon es un análogo artificial (sintetizado químicamente) de coronatina que es un análogo de los conjugados de JA-aminoácidos, y que tiene actividad biológica similar, aunque no idéntica, a JA. Sin embargo, el coronalon se ha aplicado para el crecimiento de las plantas, y, de esta manera, esta divulgación es poco diferente a la de un pulverizador foliar de JA.

[0021] El documento WO0141568 da a conocer el uso de pulverizadores de Cis-Jasmona para inducir emisiones volátiles de plantas que repelen plagas de insectos y atraen insectos beneficiosos. De nuevo, esto se aplica directamente a plantas en crecimiento.

[0022] De acuerdo con esto, la presente invención está destinada a resolver al menos una desventaja asociada con la técnica anterior tanto se discuta en el presente documento como en otros.

Resumen de la invención

[0023] De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición de tratamiento de semillas para tratar una semilla no germinada a fin de inducir un mecanismo de resistencia en la planta frente a una o más plagas de invertebrados herbívoros en una planta en crecimiento de la que procede dicha semilla con el fin de restringir el daño a la planta originado por dichas plagas,

en el que la composición de tratamiento de semillas comprende un agente de tratamiento seleccionado entre ácido jasmónico (JA) o sus sales de jasmonato; éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-aminoácido L (unido mediante amida); ácido 12-oxofitodienoico; coronatina (una amida del ácido coronafánico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina; ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina, coronalon éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico; o sus combinaciones.

[0024] Tal como se usa en el presente documento, el término "plagas" excluye "enfermedad". Específicamente excluidos del término "plagas" están los patógenos que incluyen hongos, bacterias y virus. Incluidos en el término "plagas" están invertebrados que incluyen nematodos, moluscos y artrópodos tales como insectos y ácaros.

[0025] Las plagas son invertebrados herbívoros, las plagas pueden comprender nematodos y/o moluscos y/o artrópodos herbívoros. Las plagas pueden comprender plagas que se alimentan del follaje. Las plagas pueden comprender plagas que se alimentan de la savia. El mecanismo que induce la resistencia de la planta puede actuar de esta manera restringiendo el daño de la planta debido a las plagas que se alimentan de la savia y el follaje. De forma alternativa, o adicionalmente, las plagas pueden comprender plagas que se alimentan de otras partes de la planta y el mecanismo que induce la resistencia de la planta puede actuar frente a dichas plagas. El procedimiento/composición de tratamiento puede proporcionar protección frente a la enfermedad, que incluye patógenos, tales como hongos, bacterias y virus, así como frente a plagas.

[0026] Tal como se usa en el presente documento, el término "composición de tratamiento de semillas" incluye composiciones de revestimiento de semillas y composiciones para remojo de semillas.

[0027] De forma adecuada, la composición de tratamiento de semillas comprende un remojo de la semilla. El uso puede, de esta manera, comprender, el tratamiento de una semilla sumergiendo ésta en la composición de tratamiento de semillas.

[0028] La composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento seleccionado entre ácido jasmónico (JA) o: sus sales de jasmonato, tales como, por ejemplo, jasmonato de potasio o de sodio, éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-L-aminoácido (unidos a amida), tales como, por ejemplo, el conjugado con isoleucina L o los conjugados con L-valina, L-leucina y L-fenilalanina, ácido 12-oxofitodienoico; coronatina (una amida de ácido coronafánico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina; ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina; coronalon éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]3-metil-pentanoico; o sus combinaciones.

[0029] De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido jasmónico o sus sales de jasmonato, tales como, por ejemplo, jasmonato de potasio o de sodio; éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-L-

aminoácido (unido a amida), tales como, por ejemplo, el conjugado con L-isoleucina o los conjugados con L-valina, L-leucina y L-fenilalanina; ácido 12-oxo-fitodienoico; coronatina (una amida del ácido coronafácico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina, ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina; coronalon éster metílico del ácido (2-[6(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico, o sus combinaciones.

5 **[0030]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende un único agente de tratamiento seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido jasmónico o sus sales de jasmonato, tales como, por ejemplo, jasmonato de potasio o de sodio, éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido
10 jasmónico-L-aminoácido (unidos a amida), tales como, por ejemplo, el conjugado con L-isoleucina o los conjugados con L-valina, L-leucina y L-fenilalanina; ácido 12-oxo-fitodienoico, coronatina (una amida de ácido coronafácico con ácido 1-oxo-indanoil-isoleucina; y coronalon (éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico).

15 **[0031]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende ácido jasmónico (JA) como agente de tratamiento. De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende ácido jasmónico (JA) como el único agente de tratamiento.

20 **[0032]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende metil jasmonato (MeJA) como agente de tratamiento. La composición de tratamiento puede comprender metil jasmonato (MeJA) como el único agente de tratamiento.

25 **[0033]** Se cree que ácido jasmónico (JA) es un regulador ubicuo de las respuestas al ataque de insectos herbívoros en plantas. Se entiende que forman parte de una ruta de señalización para la defensa de la planta a larga distancia y cuando se aplica de forma exógena (a los tejidos foliares o a las raíces) puede inducir respuestas relacionadas con la defensa a los artrópodos y otras plagas con el fin de reducir el daño realizado en el momento del ataque y la probabilidad de un futuro ataque. Se entiende que la ruta octadecanoide que conduce a la biosíntesis de JA está vinculada a la activación de las respuestas de defensa de las plantas.

30 **[0034]** Sin embargo, dada la comprensión actual de la inducción de las defensas de las plantas frente al ataque de las plagas, se esperaría que aplicando compuestos que inducen los sistemas de defensa de la semilla se podría proteger el crecimiento de la planta del ataque de la plaga durante un periodo extendido. La transición de la semilla a la planta en crecimiento implica una mayor reprogramación metabólica y la producción de tejidos no presentes en la semilla, incluso en una forma meristemática. A pesar de esto, las respuestas de defensa mediadas por ácido
35 jasmónico frente a los insectos herbívoros que pueden inducirse por la presente invención pueden ser sorprendentemente eficaces. De forma también sorprendente, la posterior germinación de las semillas tratadas puede ser inhibida de forma sustancial mediante el procedimiento de tratamiento.

40 **[0035]** De forma sorprendente, los presentes inventores han encontrado que aplicar una composición de tratamiento a las semillas puede inducir elementos de las defensas naturales que se dirigen a las plagas de las plantas germinadas procedentes de las semillas tratadas. Esto puede ser el caso durante bastante tiempo después de la germinación, lo que no es algo siempre esperado. Esto puede ser así incluso cuando el agente de tratamiento se aplica a bajas concentraciones a la semilla y puede dar como resultado un control persistente de la plaga durante muchas semanas, mucho tiempo después de que el compuesto activo se ha degradado de forma natural. De forma
45 inesperada, se ha encontrado que cuando se aplica a la semilla no germinada, puede inducirse protección en la planta en crecimiento posterior.

50 **[0036]** De forma adecuada, la resistencia frente a la plaga está producida por un mecanismo de defensa que está regulado por la ruta de la oxilipina (conocida también como la ruta del jasmonato o la ruta octadecanoide).

[0037] De forma adecuada, la composición de tratamiento de semillas comprende una composición acuosa. La composición de tratamiento puede comprender un disolvente no acuoso, de manera adecuada un alcohol, por ejemplo etanol.

55 **[0038]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento, por ejemplo, ácido jasmónico, a una concentración de al menos 10 μM , por ejemplo 1 mM o más. La composición de tratamiento puede comprender un agente de tratamiento, por ejemplo, ácido jasmónico, a una concentración de entre 10 μM , y 50 mM, de manera adecuada de entre 0,1 mM y 15 mM, por ejemplo, de entre 1 mM y 5 mM. La composición de tratamiento puede comprender un agente de tratamiento en una cantidad de hasta 10 mM.

- 5 **[0039]** La composición de tratamiento puede comprender un agente de tratamiento en una cantidad de al menos 0,1 mM, por ejemplo, al menos: 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM; 3,5 mM; 4,0 mM; 4,5 mM; 5,0 mM; 6,0 mM; 7,0 mM; 8,0 mM; 9,0 mM; o 10 mM.
- [0040]** La composición de tratamiento puede comprender un agente de tratamiento en una cantidad no mayor de 15 mM, por ejemplo, no mayor de: 14 mM, 13 mM, 12,5 mM, 12,0 mM, 11,5 mM, 11,0 mM, 10,5 mM, 10,0 mM, 9,5 mM, 9,0 mM, 8,0 mM, 7,0 mM o 6,0 mM.
- 10 **[0041]** La composición de tratamiento puede comprender un disolvente no acuoso, de forma adecuada un alcohol, en una concentración de al menos 1 mM. La composición de tratamiento puede comprender un disolvente no acuoso, de forma adecuada un alcohol, en una concentración de entre 1 mM y 100 mM, de manera adecuada entre 10 mM y 100 mM, por ejemplo, entre 30 mM y 50 mM.
- 15 **[0042]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende agua y un agente de tratamiento y, de manera adecuada también, un disolvente no acuoso, de forma adecuada alcohol. De manera adecuada, al menos un 95% en peso, por ejemplo, al menos un 99% en peso de la composición de tratamiento puede consistir en agua, un agente de tratamiento y alcohol. De forma adecuada, la composición de tratamiento consta de agua, un agente de tratamiento y alcohol. La composición de tratamiento puede consistir en agua, etanol y ácido jasmónico.
- 20 **[0043]** El uso comprende aplicar una composición de tratamiento de semillas a una semilla no germinada que puede ser una semilla latente.
- [0044]** De forma adecuada, el uso comprende aplicar una composición de tratamiento de semillas en condiciones que impiden la germinación. La composición de tratamiento de semillas se puede aplicar a una semilla en condiciones de temperatura baja y/u oscuridad.
- 25 **[0045]** De forma adecuada, la composición de tratamiento de semillas se aplica a una semilla a una temperatura de 10^o C o menos, por ejemplo 9^o C, 8^o C, 7^o C, 6^o C, 5^o C o 4^o C o menos. De forma adecuada, la semilla se retiene a dicha temperatura mediante el procedimiento de tratamiento.
- 30 **[0046]** De forma adecuada, el uso comprende mantener una semilla en un estado sin germinación durante el tratamiento mediante el uso de temperaturas frías, de forma adecuada de menos de 10^o C pero mayores que el punto de congelación de la composición de tratamiento.
- 35 **[0047]** De forma adecuada, el uso comprende poner una semilla en contacto con una composición de tratamiento de semillas durante un periodo de 1 hora o más, de forma adecuada durante un periodo de al menos 6 horas, por ejemplo, al menos 12 horas. De manera adecuada, el uso comprende poner una semilla en contacto con una composición de tratamiento de semillas durante entre 1 hora y 72 horas, de forma adecuada, durante entre 6 horas y
- 40 48 horas, por ejemplo, alrededor de 24 horas.
- [0048]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende un líquido aplicado a la semilla, por ejemplo, una semilla mojada. De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende ácido jasmónico aplicado como un líquido.
- 45 **[0049]** De forma alternativa, se puede aplicar la composición de tratamiento como un granulado, polvo, suspensión o vapor. El agente de tratamiento puede comprender, por ejemplo metil jasmonato aplicado como vapor.
- 50 **[0050]** Si se aplica como un polvo, la composición de tratamiento puede comprender un agente de adherencia. Si se aplica como una suspensión, la suspensión puede comprender tanto un polvo humectable, polvo dispersable en agua o suspensiones de microencapsulación/cápsula. Si se aplica como un líquido, entonces, un concentrado puede requerir dilución antes de la aplicación a la semilla. Los revestimientos de semillas derivados de ácido jasmónico o jasmonato pueden, por ejemplo, aplicarse fácilmente como un líquido, pero podrían aplicarse también como un granulado o suspensión si se diluyen suficientemente con una carga tal como arcilla para evitar una aplicación en
- 55 exceso.
- [0051]** Para revestir semillas con una composición de tratamiento, la composición puede mezclarse mecánicamente con las semillas para asegurar una cobertura uniforme y puede valorarse cualquier humedad para evitar estimular la estimulación prematura de la germinación. Las variantes del procedimiento de revestimiento

pueden implicar aplicar algunos tratamientos diferentes a la semilla al mismo tiempo mediante la formulación (en la que estos tratamientos son compatibles con respecto a sus medios de aplicación o aplicar algunos tratamientos diferentes de forma consecutiva para desarrollar una serie de capas de tratamiento en un procedimiento conocido como granulación. Uno de algunos polímeros bien conocidos u otros revestimientos se pueden aplicar para sellar la semilla contra el empolvado, y si se necesita, colorear también la semilla para la identificación.

[0052] De forma adecuada, el uso comprende humedecer una semilla de forma parcial o completa, lo más adecuado de forma completa, sumergiendo una semilla en una composición de tratamiento. De manera adecuada, el uso comprende sumergir una semilla en una composición de tratamiento de tal manera que la semilla se ponga en contacto con la composición durante un periodo de al menos 1 hora tal como se ha detallado anteriormente.

[0053] De forma adecuada, el uso comprende secar una semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento a la semilla. El uso puede comprender dejar que la semilla se seque naturalmente. De forma alternativa, el uso comprende aplicar calor para secar la semilla. De forma adecuada, secar la semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento y antes de la germinación no impide la inducción de los mecanismos de resistencia de la planta.

[0054] El uso puede comprender lavar una semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento a la semilla. El uso puede comprender lavar la semilla con agua. El uso puede comprender sumergir de forma parcial o completa, lo más adecuado de forma completa, la semilla en agua. El uso puede comprender lavar la semilla entre la etapa de aplicar la composición de tratamiento a la semilla y una etapa de secar la semilla. De forma adecuada, lavar la semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento y antes de que la germinación no impida la inducción de los mecanismos de resistencia de la planta.

[0055] De forma adecuada, se puede almacenar una semilla tratada durante al menos 24 horas antes de que se siembre. De forma adecuada, una semilla tratada puede almacenarse sustancialmente de la misma manera que la semilla no tratada antes del uso. Una semilla tratada puede almacenarse durante al menos 24 horas antes de que se inicie la germinación, de forma adecuada al menos 72 horas, por ejemplo, una semana o más. Una semilla tratada puede, por ejemplo, almacenarse durante un mes o más antes de sembrarse y de iniciarse la germinación. De forma adecuada, almacenar la semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento y antes de la germinación no impide la inducción de los mecanismos de resistencia de la planta. Una semilla tratada puede, de esta manera, almacenarse durante una semana o más antes de que se inicie la germinación sin impedir la inducción de los mecanismos de resistencia de la planta.

[0056] De forma adecuada, una semilla tratada de acuerdo con la invención procede de una planta monocotiledónea o dicotiledónea. De forma adecuada, una semilla tratada de acuerdo con la invención procede de un cultivo hortofrutícola o agrícola. El cultivo puede ser un cultivo en crecimiento para fines comerciales.

[0057] De forma adecuada, el uso comprende aplicar una composición de tratamiento de tal manera que la resistencia frente a las plagas en una planta en crecimiento procedente de una semilla tratada esté producida por mecanismos de defensa que están regulados por la ruta de la oxilipina (conocida también como la ruta del jasmonato o la ruta octadecanoide).

[0058] Se indujo el mecanismo de resistencia debido al tratamiento de la semilla. No se indujo la resistencia frente a las plagas únicamente por arrastre de la composición en la planta germinada procedente de la semilla tratada. Se indujo el mecanismo de resistencia debido al tratamiento de la semilla más bien que debido a la composición de tratamiento procedente de la semilla en una planta en germinación.

[0059] De forma adecuada, una planta germinada procedente de una semilla tratada de acuerdo con el uso puede presentar resistencia al daño de la plaga al menos 1 semana después de la germinación, de forma adecuada al menos 2 semanas, por ejemplo; 3; 4; 5; 6; 7 u 8 semanas o más después de la germinación.

[0060] De forma adecuada, una planta germinada procedente de una semilla de acuerdo con el uso puede presentar mayor resistencia al daño de la plaga que otra planta germinada de otra forma equivalente procedente de una semilla no tratada

[0061] De forma adecuada, una planta germinada procedente de una semilla tratada de acuerdo con el uso puede actuar reduciendo la supervivencia de una plaga y/o reduciendo el daño a la planta de la plaga y/o reduciendo la reproducción de una plaga.

[0062] La composición de tratamiento de semillas puede inducir un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en una planta en crecimiento procedente de dicha semilla que restringe la supervivencia de la plaga y/o el número de plagas y/o el crecimiento de la plaga y/o la reproducción de la plaga.

5

[0063] De forma adecuada, una planta localizada en la proximidad de una planta germinada procedente de una semilla tratada de acuerdo con el uso puede reducir también el riesgo de daño de la planta por las plagas. De forma adecuada, la producción de compuestos de señalización volátiles de la planta producidos por una planta procedente de una semilla tratada de acuerdo con la invención puede proporcionar resistencia frente al daño de la plaga en plantas casi sin tratar.

10

[0064] De forma adecuada, no existen problemas asociados con la fitotoxicidad en plantas germinadas procedentes de las semillas tratadas.

15 **[0065]** De forma adecuada, no existen problemas asociados con la germinación de las semillas tratadas.

[0066] De forma adecuada, el uso evita sustancialmente el uso produciendo efectos perjudiciales sobre las plantas, o el rendimiento o la calidad para producir la planta es el crecimiento para producir, el crecimiento procedente de la semilla tratada. De forma adecuada, el uso es tal que la fitotoxicidad en una planta en crecimiento procedente de una semilla tratada se evita sustancialmente.

20

[0067] Se describe en el presente documento una semilla a partir de la cual puede crecer una planta resistente al daño de la plaga, en el que la semilla comprende una semilla tratada con una composición de tratamiento de semillas para inducir un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en una planta en crecimiento procedente de dicha raíz con el fin de restringir el daño a la planta debido a plagas.

25

[0068] La semilla es una semilla no germinada. De forma adecuada, la semilla comprende una semilla no germinada capaz de una posterior germinación.

30 **[0069]** Se describe en el presente documento una composición de tratamiento de semillas que induce un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en una planta en crecimiento procedente de dicha semilla tratada con el fin de restringir el daño a la planta debido a plagas.

[0070] La composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento seleccionado entre ácido jasmónico (JA) o sus sales de jasmonato, tales como, por ejemplo, jasmonato de potasio o de sodio; éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-L aminoácido (unidos a amida), tales como, por ejemplo, el conjugado con L-isoleucina o los conjugados con L-valina, L-leucina y L-fenilalanina; ácido 12-oxo-fitodienoico; coronatina (una amida del ácido coronafácico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina; ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina; coronalon éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico); o sus combinaciones.

35

40

[0071] De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento seleccionado entre el grupo que consiste en ácido jasmónico o sus sales de jasmonato, tales como, por ejemplo, jasmonato de potasio o de sodio; éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-L aminoácido (unidos a amida), tales como, por ejemplo, el conjugado con L-isoleucina o los conjugados con L-valina, L-leucina y L-fenilalanina; ácido 12-oxo-fitodienoico; coronatina (una amida del ácido coronafácico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina; ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina; coronalon éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico); o sus combinaciones.

45

50

[0072] De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende ácido jasmónico (JA) como agente de tratamiento.

55 **[0073]** De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende una composición acuosa. La composición de tratamiento puede comprender un disolvente no acuoso, de forma adecuada un alcohol, por ejemplo, etanol.

[0074] De forma adecuada, la composición de tratamiento comprende agua y un agente de tratamiento y de manera adecuada también un disolvente no acuoso, de forma adecuada un alcohol. De manera adecuada, la

composición de tratamiento consiste esencialmente en agua, un agente de tratamiento y un disolvente no acuoso. De forma adecuada, la composición de tratamiento consiste esencialmente en agua, un agente de tratamiento y alcohol.

5 [0075] Se describe en el presente documento un procedimiento para proporcionar una planta con resistencia al daño debido a plagas, comprendiendo el procedimiento aplicar una composición de tratamiento de semillas a una semilla y posteriormente hacer crecer una planta procedente de dicha semilla, en el que la composición de tratamiento induce un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en dicha planta en crecimiento procedente de dicha semilla tratada para restringir el daño a la planta debido a plagas.

10

[0076] De forma adecuada, dicha planta comprende una mayor resistencia a las plagas que una planta en crecimiento de otra forma equivalente procedente de una semilla no tratada.

15 [0077] De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición de tratamiento de semillas para tratar una semilla con el fin de inducir un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en una planta en crecimiento procedente de dicha semilla de tal manera que se restrinja el daño a la planta debido a plagas, tal como se ha descrito anteriormente.

20 [0078] De forma adecuada, la resistencia frente a las plagas está producida por un mecanismo de defensa que está regulado por la ruta de la oxilipina (conocida también como la ruta del jasmonato o la ruta octadecanoide).

25 [0079] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una composición de tratamiento de semillas tal como se ha descrito anteriormente, para tratar una semilla con el fin de inducir un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas en una planta en crecimiento procedente de dicha semilla a fin de restringir la supervivencia de la plaga y/o el número de plagas y/o el crecimiento de la plaga y/o la reproducción de la plaga.

30 [0080] De forma adecuada, la resistencia frente a las plagas está producida por un mecanismo de defensa que está regulado por la ruta de la oxilipina (conocida también como la ruta del jasmonato o la ruta octadecanoide),

30

Breve descripción de los dibujos

35 [0081] La presente invención se ilustrará ahora por medio de ejemplos con referencia a los dibujos que la acompañan en los que:

35

La Fig. 1. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre el daño de las arañas rojas a plantas de tomate;

40

La Fig. 2. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre poblaciones de araña roja;

40

La Fig. 3. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la producción de huevos en poblaciones de araña roja;

45

La Fig. 4. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la alimentación de orugas de *Manduca sexta*;

45

La Fig. 5. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre las poblaciones de *Myzus persicae* en pimiento dulce (*Capsicum annuum*);

50

La Fig. 6. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre poblaciones de araña roja en plantas casi sin tratar;

50

La Fig. 7. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la reproducción de la araña roja en plantas casi sin tratar;

55

La Fig. 8. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre las poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel");

La Fig. 9. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la alimentación de orugas de *Spodoptera*

exempta sobre maíz;

La Fig. 10. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la alimentación de orugas de *Spodoptera exempta* sobre maíz;

5

La Fig. 11. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") cuando las semillas tratadas se sembraron después de dos meses de almacenamiento;

10 La Fig. 12. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la germinación de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") 7 días después de la siembra;

La Fig. 13. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la altura de la planta de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cosechas semanales;

15

La Fig. 14. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre el número de frutos por planta de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cosechas semanales;

La Fig. 15. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre el peso del fruto seco de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cosechas semanales.

20

La Fig. 16. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con MeJA sobre las poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel");

25 **Descripción detallada de la invención**

Preparación de disoluciones de ácido jasmónico (JA) y metil jasmonato (MeJA)

30 **[0082]** Se prepararon disoluciones de ácido jasmónico (JA) y metil jasmonato (MeJA) inmediatamente antes del tratamiento de las semillas.

[0083] Para preparar la disolución de ácido jasmónico, se disolvieron 250 mg de JA en 1 ml de etanol y se prepararon hasta un volumen de 400 ml con agua desionizada para dar una disolución de JA 3 mM en etanol 42,8 mM tal como sigue:

35

1. Se registró la masa de ácido jasmónico en un vial de 250 mg de JA (Sigma-Aldrich) de la etiqueta del vial.

2. Se retiró la etiqueta y se usó acetona para eliminar también toda la cola de la parte externa del vial.

40 3. Tras dejar el vial secar durante 5 minutos se pesó con precisión de mg.

4. Se llenó un matraz de 500 ml de volumen con agua desionizada hasta la línea.

45 5. Se retiraron 5 ml de agua del matraz aforado utilizando una pipeta Gilson de 1000 µl y a continuación 100 ml más utilizando una pipeta analítica de 100 ml.

6. Se añadió 1 ml de etanol al vial de JA utilizando una pipeta Gilson de 1000 µl, se cambió el tapón del vial y se agitó el vial para disolver el JA. Es necesario el uso de etanol ya que JA no se disolvió directamente en agua.

50 7. A continuación se transfirió el contenido del vial al matraz de 500 ml de volumen utilizando una pipeta Gilson de 1000 µl.

8. Se añadió 1 ml de agua desionizada al vial vacío utilizando una pipeta Gilson de 1000 µl, se cambió el tapón del vial y se agitó de nuevo el vial vigorosamente.

55

9. A continuación se transfirió el contenido del vial al matraz de 500 ml de volumen utilizando una pipeta Gilson de 1000 µl.

10. Se repitieron las etapas 8 y 9, 3 veces más.

11. Se colocó el tapón al matraz aforado (conteniendo ahora 400 ml de líquido y 250 mg de JA) y se agitó vigorosamente.

5 12. Se secó el vial hasta peso constante en un horno a 150° C y se registró su peso.

13. Se calculó la concentración de JA en el matraz aforado a partir de la diferencia de peso entre las dos pesadas del vial.

10 **[0084]** Se preparó una disolución de JA 1,5 mM diluyendo la disolución de JA 3 mM 2 veces con agua desionizada que contenía etanol 42,8 mM. Se preparó una variedad de concentraciones diferentes para el Ejemplo 9 de acuerdo con el procedimiento anterior con las cantidades modificadas adecuadamente.

15 **[0085]** Se preparó una disolución de MeJA 3,0 mM utilizando sustancialmente el mismo procedimiento tal como se ha descrito anteriormente pero usando MeJA en lugar de JA. Para producir la disolución de MeJA se disolvieron 269 mg de MeJA en 1 ml de etanol y se prepararon hasta un volumen de 400 ml con agua desionizada para dar una disolución de MeJA 3 mM en etanol 42,8 mM.

Tratamiento de la semilla – Visión general

20

[0086] Se trataron semillas de tomate, pimienta, maíz y trigo con disoluciones de JA 3 mM o JA 1,5 mM o con metil jasmonato 3 mM (MeJA) o con agua desionizada que contenía etanol 42,8 mM (control) mediante inmersión completa de hasta 40 semillas en una placa Petri de disolución envuelta en aluminio durante un periodo de 24 horas a 4° C en un frigorífico. Se utilizó una temperatura de 4° C para evitar la degradación de las disoluciones de ácido jasmónico y para evitar la germinación de las semillas.

[0087] A continuación se retiraron las semillas de la disolución de tratamiento y se lavaron en 1 litro de agua desionizada durante 5 minutos para eliminar el revestimiento de JA o MeJA de la parte externa de las semillas.

30 Crecimiento y estímulo de las plantas de tomate, pimienta, maíz y trigo – Visión general

[0088] Las semillas de tomate se sembraron en bloques de lana mineral y se hicieron crecer en mantillo de turba en invernaderos a 12° C-28° C bajo luz artificial en un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 48, 56 o 70 días.

35

[0089] Las semillas de pimienta se sembraron en un mantillo de turba y se hicieron crecer en invernaderos sin calentar en condiciones ambientales en el verano.

40 **[0090]** Las semillas de trigo y maíz se sembraron en un mantillo de turba y se hicieron crecer en invernaderos sin calentar con iluminación suplementaria (lámparas SON-T de 600 W, durante 16 horas por día), en el otoño.

45 **[0091]** A continuación se estimularon las plantas de tomate con *Tetranychus urticae* (araña roja de dos manchas), a las que se dejó alimentarse durante 9 días, orugas de *Manduca sexta* (esfíngido del tabaco) a las que se dejó alimentarse durante 4 días o *Myzus persicae* (áfido), a las que se dejó alimentarse durante 10 o 12 días. En cada caso, estos organismos se restringieron a la planta sobre la cual se habían colocado originalmente. Se estimularon plantas de pimienta con *Myzus persicae* (áfido), a las que se dejó alimentarse durante 2 semanas, se estimularon maíz y plantas de trigo con orugas de *Spodoptera exempta* a las que se dejó alimentarse durante 2 días (maíz) o 3 días (trigo).

50 **[0092]** Se midió el efecto del *Tetranychus urticae* sobre las plantas por medio del recuento del número de ácaros vivos y muertos en cada planta y del número de huevos de ácaros presente utilizando un microscopio de disección.

[0093] Se determinó el efecto de *Myzus persicae* sobre las plantas mediante el recuento de la población de áfidos en cada planta en un microscopio de disección con un aumento x 10.

55

[0094] Se determinó el efecto de *Manduca sexta* o *Spodoptera exempta* en plantas mediante la medida del área comida de la hoja, utilizando la medida realizada por un medidor del área de la hoja.

Ejemplo 1

5 [0095] Se trataron las semillas de una variedad de tomate híbrido F1 comercial de Reino Unido (cv Carousel) tanto con ácido jasmónico 1,5 mM como 3,0 mM de (JA) y etanol 42,8 mm en H₂O desionizada durante un periodo de 24 horas a 4° C en la oscuridad. A continuación se retiraron las semillas de la solución y se lavaron en H₂O desionizada para retirar el revestimiento de JA de la parte externa de la semilla. A continuación las semillas se pusieron a germinar de una manera comercial utilizando bloques de lana mineral y se hicieron crecer en condiciones de invernadero adecuadas para este cultivo. Se estimularon las plantas con arañas rojas de dos manchas (*Tetranychus urticae*) 7 semanas después del tratamiento, una plaga común del cultivo, actuando aquí como un “modelo herbívoro”.

10

[0096] El daño visual producido por el ataque de la araña roja /el punteado pálido característico de la superficie de la hoja debido a la actividad de alimentación de la plaga) se redujo sustancialmente (Figura 1 – Control y JA 3,0 mM solo). La resistencia observada inducida fue significativa incluso 8 semanas después de la aplicación del JA a las semillas.

15

[0097] Se ha observado que hubo una significativa reducción en la población de arañas rojas de dos manchas (*Tetranychus urticae*) sobre las hojas de las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA en comparación con las poblaciones sobre las plantas del control (Figura 2). Las plantas del control se colocaron alejadas al menos 10 metros de cualquier planta tratada con JA y los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- El error estándar del promedio.

20

[0098] Se ha observado además que hubo una reducción significativa en la tasa de reproducción de las arañas medida por la producción de huevos (Figura 3), en comparación con las plantas del control. Las plantas del control se colocaron al menos 10 metros lejos de cualquier planta tratada con JA y los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio.

25

[0099] La Fig. 2., muestra el efecto de los tratamientos de semillas con JA sobre poblaciones de araña roja, en que las leyendas son como sigue:

30 X2 = Concentración de JA en el tratamiento de la semilla (mM); e

Y2 = Número de arañas vivas

35 [0100] La Fig. 3. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la producción de huevos en poblaciones de araña roja, en que las leyendas son como sigue:

X3 = Concentración de JA en el tratamiento de semillas (mM); e

Y3 = Huevos producidos por una hembra adulta

40

Ejemplo 2

45 [0101] Se trataron las semillas de una variedad de tomate híbrido comercial de Reino Unido (cv. Carousel) con ácido jasmónico (JA) 1,5 mM y las plantas se hicieron crecer en condiciones adecuadas para este cultivo (tal como se ha descrito en el ejemplo 1). Ocho semanas después del tratamiento de las semillas, las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas se estimularon con un insecto herbívoro masticador de hojas colocando por igual dos tercios de orugas de la polilla de *Manduca sexta* (esfíngido de tabaco) en la quinta hoja. El área de la hoja que permanece tras la alimentación fue significativamente mayor en plantas que crecían a partir de semillas tratadas con JA que los controles (Figura 4). Además, las orugas que se alimentaban de las hojas de plantas que crecían a partir de semillas tratadas con JA crecieron un 20% menos que las que se alimentaban de los controles. Las semillas del control se trataron con la disolución de etanol adecuada pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio.

50 [0102] La Fig. 4. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la alimentación de orugas de *Manduca sexta*, en que las leyendas son como sigue:

X4 = Semillas tratadas con C = Control y tratadas con JA = ácido jasmónico; e

55

Y4 = Área de la hoja tras la alimentación (cm²)

Ejemplo 3

5 **[0103]** En experimentos en que las semillas de pimienta dulce (*Capsicum annuum*, cv Biscayne) se trataron con ácido jasmónico (JA) 1,5 mM, y las plantas crecieron en condiciones adecuadas para este cultivo (tal como se ha descrito en la Visión general). Ocho semanas después del tratamiento de las semillas, las plantas que crecían a partir de las semillas tratadas se estimularon con el áfido *Myzus persicae*. Se dejó que los áfidos se alimentaran de las plantas durante dos semanas y a continuación se midió el crecimiento de la población de áfidos durante este
10 periodo. Hubo una reducción significativa ($p < 0,001$) en la tasa de crecimiento de la población de áfidos en las plantas en crecimiento a partir de las semillas tratadas con JA (Figura 5). Las semillas del control se trataron con la disolución de etanol adecuada, pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio, y se ajustaron las líneas a las curvas de crecimiento, que proporcionan tasas de crecimiento de la población de 0,19 +/-
15 0,011 para los controles y 0,11 +/- 0,016 para las tratadas con JA.

[0104] La Fig. 5. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA en poblaciones de *Myzus persicae* en pimienta dulce (*Capsicum annuum*), en que las leyendas son como sigue:

20 X5 = Días después de introducir los áfidos; y

Y5 = Número de áfidos con C = Control y JA = tratadas con ácido jasmónico

Ejemplo 4

25 **[0105]** En experimentos en que se hicieron crecer plantas de tomate (cv Carousel) en las mismas condiciones y se expusieron al mismo estímulo con arañas rojas de dos manchas (*Tetranychus urticae*) tal como se ha descrito en el ejemplo 1, hubo una significativa reducción en la población de *T. urticae* en plantas que no habían recibido tratamiento con JA pero que habían crecido al lado de plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas
30 tanto con ácido jasmónico (JA) 1,5 o 3,0 mM. Se observó el efecto en comparación con los controles localizados al menos 10 metros más lejos. (Figura 6). Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio.

35 **[0106]** Se observó también que existía una significativa reducción en la tasa reproductora de la araña (medida por la producción de huevos) en las plantas que no habían recibido tratamiento con JA, pero que habían crecido al lado de plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas tanto con ácido jasmónico (JA) 1,5 o 3,0 mM. Se observó de nuevo el efecto en comparación con los controles localizados al menos 10 metros más lejos (Figura 7). Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio.

40 **[0107]** La Fig. 6 muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre las poblaciones de araña roja en plantas casi no tratadas, en que las leyendas son como sigue:

X6 = Tratamiento, con VC = control virgen, N1,5 = próximo al tratamiento de semillas 1,5 mM y N3,0 = próximo al tratamiento de semillas 3,0 mM, e

45 Y6 = Número de arañas vivas

[0108] La Fig. 7 muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la reproducción de la araña roja en plantas casi no tratadas, en que las leyendas son como sigue:

50 X7 = Tratamiento, con VC = control virgen, N1,5 = próximo al tratamiento de semillas 1,5 mM y N3,0 = próximo al tratamiento de semillas 3,0 mM; e

Y7 = Huevos producidos por una hembra adulta

55 **Ejemplo 5**

[0109] Se trataron semillas de una variedad de tomate híbrido F1 comercial de reino Unido (cv. Carousel) con ácido jasmónico (JA) 3,0 mM y etanol 42,8 mM en H₂O desionizada durante un periodo de 24 horas a 4^o C en la

oscuridad. A continuación se retiraron las semillas de la solución y se lavaron solo en H₂O desionizada para eliminar el revestimiento de JA en la parte externa de la semilla, y se hicieron crecer las plantas en las condiciones adecuadas para este cultivo (tal como se ha descrito en la Visión general). Diez semanas después de la siembra, se estimularon las plantas con el áfido *Myzus persicae*. Se dejó que se alimentaran los ácidos en las plantas durante 5 doce días y se comparó la población de áfidos con las plantas del control. Hubo una significativa reducción ($p < 0,05$) en la población de áfidos sobre las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA (Figura 8). Se trataron las semillas del control con la disolución de etanol adecuada pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 15 réplicas +/- el error estándar del promedio.

10

[0110] La Fig. 8., muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre las poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel"), en que las leyendas son como sigue:

X8 = Días después del primer ataque de áfidos; e

15

Y8 = Número de áfidos (tratados como % del control)

Ejemplo 6

20 **[0111]** Se trataron las semillas de maíz cv. Earligold con ácido jasmónico (JA) 1,5 mM, y las plantas crecieron en el invernadero (tal como se ha descrito en el Ejemplo 1). En la etapa de la borla (aproximadamente 10 semanas después del tratamiento de la semilla), se estimularon las plantas con un insecto herbívoro masticador de hojas colocando dos orugas de la mariposa *Spodoptera exempta* sobre una hoja completamente abierta. Se dejó que las orugas se alimentaran en las plantas durante 2 días y a continuación se midió el área de las hojas comidas. El área 25 de la hoja consumida por las orugas fue un 38% menor en plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA que con los controles (significativo a $p < 0,05$). Cuando se expresan como el área de hoja consumida por peso unitario de orugas, la reducción en las plantas en crecimiento procedente de las semillas tratadas con JA fue incluso más pronunciada (40%, $p < 0,001$, Figura 9). Se trataron las semillas del control con la disolución de etanol adecuada pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las 30 semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 12 réplicas +/- El error estándar del promedio.

[0112] La Fig. 9 muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la siembra por orugas de *Spodoptera exempta* en maíz, en que las leyendas son como sigue.

35 X9 = Tratamiento, con C = Control y JA = tratadas con ácido jasmónico; e

Y9 = Área de la hoja consumida por g de peso fresco de oruga.

Ejemplo 7

40

[0113] Se trataron semillas de la variedad de trigo comercial (cv. Einstein) con ácido jasmónico (JA) 1,5 mM, y se hicieron crecer las plantas en el invernadero (tal como se ha descrito en el Ejemplo 1). 7 semanas después del tratamiento de las semillas, se estimularon las plantas con un insecto herbívoro masticador de hojas colocando dos orugas de la mariposa *Spodoptera exempta* en cada planta. Se dejó que las orugas se alimentaran sobre las plantas 45 durante 3 días y a continuación se midió el área de las hojas comidas. El área de la hoja consumida por las orugas fue un 60% menor en las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA que los controles (significativo a $p < 0,01$, Figura 10). Se trataron las semillas del control con la disolución de etanol adecuada pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas +/- el error estándar del promedio.

50

[0114] La Fig. 10 muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la siembra por orugas de *Spodoptera exempta* en trigo, en que las leyendas son como sigue:

X10 = tratamiento, con C = Control y JA = tratadas con ácido jasmónico; e

55

Y10 = Área de la hoja comida (cm²)

Ejemplo 8

[0115] Se trataron semillas de una variedad de tomate híbrido F1 comercial de Reino Unido (cv Carousel) con ácido jasmónico (JA) 3,0 mM y etanol 42,8 mM en H₂O desionizada durante un periodo de 24 horas a 4° C en la oscuridad. Como en los ejemplos anteriores, se retiraron a continuación las semillas de la disolución y se lavaron solo en H₂O desionizada para eliminar el revestimiento de JA en la parte externa de la semilla, pero, a diferencia de los ejemplos anteriores, las semillas tratadas se secaron a continuación y se almacenaron secas en un refrigerador a 4° C durante dos meses antes de la siembra. Después de la siembra, se hicieron crecer las plantas en condiciones adecuadas para este cultivo (tal como se ha descrito en la Visión general). Diez semanas después de la siembra, se estimularon las plantas con el áfido *Myzus persicae*. Se dejó que se alimentaran los áfidos sobre las plantas durante diez días y se comparó la población de áfidos con las plantas del control. Hubo una significativa reducción ($p < 0,05$) en la población de áfidos sobre las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA (Figura 11). Se trataron las semillas del control con la disolución de etanol adecuada pero se mantuvieron cercanas a las plantas en crecimiento procedentes de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 15 réplicas +/- el error estándar del promedio.

[0116] La Fig. 11. Muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") cuando se sembraron las semillas tratadas tras dos meses de almacenamiento, en que las leyendas son como sigue:

X11 = Días después del primer ataque de áfidos; y

Y11 = Número de áfidos (tratados como % del control).

Ejemplo 9

[0117] Se retrasó la germinación de semillas de una variedad de tomate híbrido F1 comercial de Reino Unido (cv. Carousel) en aproximadamente un día cuando las semillas se trataron tanto con ácido jasmónico (JA) 1,5 mM como 3,0 mM y etanol 42,8 mM en H₂O desionizada durante un periodo de 24 horas a 4° C en la oscuridad. Estos tratamientos no tuvieron efectos significativos sobre el porcentaje final de la germinación. Cuando se trataron las semillas con un intervalo más amplio de concentraciones de ácido jasmónico (JA) entre 0,001 y 50 mM en las mismas condiciones, el porcentaje final de la germinación se redujo significativamente solo por las concentraciones en exceso de 10 mM (Figura 12). Los datos ilustrados son promedios de 10 réplicas de poblaciones +/- el error estándar del promedio, y se ajustó la línea a la respuesta de la dosis.

[0118] La Fig. 12. muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la germinación de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") 7 días después de la siembra, en que las leyendas son como sigue: X12 = concentración de JA (escala log en mM); e Y12 = germinación de la semilla (%) después de 7 días.

Ejemplo 10

[0119] En los estudios a largo plazo de crecimiento y rendimiento en los que se cosecharon las plantas a intervalos semanales, el tratamiento de las semillas con JA 1,5 mM o 3,0 mM, como en el Ejemplo 9, no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento vegetativo o reproductor, o el rendimiento comercial del tomate, pepino o pimienta. Por ejemplo, los datos ilustrados para el tomate (cv Carousel) no mostraron significativos efectos sobre la altura de la planta (Figura 13), número de frutos (Figura 14) o peso en seco de los frutos (Figura 15) en cada cosecha semanalmente. Los datos son promedios de 8 réplicas de plantas +/- el error estándar del promedio, y la línea se ajustó a la respuesta al crecimiento. Ni la respuesta al crecimiento ajustada ni el análisis bilateral de la varianza (tratamiento x cosecha) mostraron ninguna diferencia significativa entre las plantas del control y las que crecen procedentes de las semillas tratadas con JA.

[0120] La Fig. 13. Muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre la altura de la planta de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cada cosecha semanalmente, en que las leyendas son como sigue:

X13 = Cosecha (semanas); e

Y13 = Altura de la planta (cm) con C = Control y JA = tratamiento con ácido jasmónico.

[0121] La Fig. 14 muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre el número de frutos por planta de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cada cosecha semanalmente, en que las leyendas son como sigue:

X14 = Cosecha (semanas); e

Y14 = Número de frutos con C = Control y JA = tratamiento con ácido jasmónico

5

[0122] La Fig. 15, muestra los efectos de los tratamientos de semillas con JA sobre el peso en seco del fruto del tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel") en cada cosecha semanalmente, en que las leyendas son como sigue:

X15 = Cosecha (semanas); e

10

Y15 = Peso en seco del fruto (g) con C = Control y JA = tratamiento con ácido jasmónico.

Ejemplo 11

15 **[0123]** Se trataron semillas de una variedad de tomate híbrido F1 comercial de Reino Unido (cv. Carousel) con metil jasmonato (MeJA) 3,0 mM y etanol 42,8 mM en H₂O desionizada durante un periodo de 24 horas a 4° C en la oscuridad. A continuación se retiraron las semillas de la disolución y se lavaron en H₂O desionizada para eliminar solo el revestimiento de MeJA de la parte externa de la semilla, y las plantas crecieron en las condiciones adecuadas para este cultivo (tal como se ha descrito en la Visión general). Diez semanas después del tratamiento de las semillas, las plantas que crecían a partir de las semillas tratadas se estimularon con el áfido *Myzus persicae*. Se dejó que los áfidos se alimentaran sobre las plantas durante doce días y se midió la población de áfidos a intervalos durante este periodo. En comparación con las plantas del control, hubo una significativa reducción ($p < 0,05$) en la población de áfidos sobre las plantas que crecían a partir de las semillas tratadas con MeJA (Figura 16). Se trataron las semillas del control con la disolución de etanol adecuada, pero se mantuvieron cercanas a las plantas que crecían a partir de las semillas tratadas con JA. Los datos ilustrados son promedios de 12 réplicas +/- el error estándar del promedio.

[0124] La Fig. 16. Muestra los efectos de los tratamientos de semillas con MeJA sobre poblaciones de *Myzus persicae* en tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel"), en que las leyendas son como sigue:

30

X16 = Días tras el estímulo con áfidos; e

Y16 = Número de áfidos (tratados como % del control)

35 **Resumen de los ejemplos**

[0125] Con respecto a los ejemplos 1 a 11, se observó que plantas de tomate, pimienta dulce, maíz y trigo que crecían a partir de semillas tratadas estaban protegidas frente a insectos y otras plagas cuando se estimulaban hasta 10 semanas después de la siembra (Tabla 1).

40

Tabla 1				
Cultivo	Plaga	Semanas desde la siembra	Tratamiento	Ejemplo
Tomate	<i>Tetranychus urticae</i>	7	Ácido jasmónico 1,5 y 3 mM	1
Tomate	<i>Manduca sexta</i>	8	Ácido jasmónico 1,5 mM	2
Tomate	<i>Myzus persicae</i>	10	Ácido jasmónico 3 mM	5 y 8
Tomate	<i>Myzus persicae</i>	10	Metil jasmonato 3 mM	11
Pimienta dulce	<i>Myzus persicae</i>	8	Ácido jasmónico 1,5 mM	3
Maíz	<i>Spodoptera exempta</i>	10	Ácido jasmónico 1,5 mM	6
Trigo	<i>Spodoptera exempta</i>	7	Ácido jasmónico 1,5 mM	7

45 **[0126]** La Tabla 1 muestra los periodos de tiempo ensayados después que plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv "Carousel"), pimienta dulce (*Capsicum annuum*, cv Biscayne), maíz (cv. Earligold) y trigo (cv Einstein) que crecían a partir de semillas tratadas con ácido jasmónico o metil jasmonato se estimularan con diversas plagas y se encontrara que presentaban resistencia a las plagas.

[0127] Aplicando una composición de tratamiento que comprende un agente químico de señalización de la planta (agente de tratamiento) a una semilla, para inducir los mecanismos de resistencia naturales de la planta, por ejemplo, aquellos que actúan frente a plagas con el fin de reducir la supervivencia, la alimentación o la reproducción

de las plagas, se puede reducir el daño a los cultivos. Aplicando dicha composición antes de la germinación puede ser posible entonces generar los semilleros posteriores y las plantas maduras frente al ataque de las plagas en un caso sorprendente y de una manera eficaz. Dado el modo de acción de la composición de tratamiento, se cree que las realizaciones preferidas pueden tener un papel principal en las soluciones IPM y/o en la reducción de niveles del uso de pesticidas.

5
10 **[0128]** Las realizaciones preferidas de la invención pueden proporcionar protección eficaz para las posteriores plantas frente a artrópodos herbívoros y otras plagas. Dicha protección puede ser eficaz durante un periodo extendido de tiempo. De forma sorprendente, puede ser eficaz el tratamiento de la semilla sin germinar, lo que puede permitir almacenar la semilla durante periodos significativos entre el tratamiento y la siembra. Se pueden evitar de forma beneficiosa los problemas de la fitotoxicidad.

15 **[0129]** La atención se dirige a todos los artículos y documentos que se han presentado de forma simultánea con o de forma previa a esta memoria junto con esta solicitud y que están sujetos a inspección pública con esta memoria.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición de tratamiento de semillas para tratar una semilla no germinada a fin de inducir un mecanismo de resistencia de la planta frente a una o más plagas de invertebrados herbívoros en un crecimiento de la planta procedente de dicha semilla con el fin de restringir el daño a la planta debido a dichas plagas,
- en el que la composición de tratamiento de semillas comprende un agente de tratamiento seleccionado entre ácido jasmónico (JA) o sus sales de jasmonato; éster metílico del ácido jasmónico ('metil jasmonato'); conjugados de ácido jasmónico-L-aminoácido (unidos a amida); ácido 12-oxo-fitodienoico; coronatina (una amida de ácido coronafácico con ácido 2-etil-1-aminociclopropano carboxílico); coronafacoil-L-serina y coronafacoil-L-treonina; ésteres metílicos de 1-oxo-indanoil-isoleucina y 1-oxo-indanoil-leucina; coronalon éster metílico del ácido (2-[(6-etil-1-oxo-indano-4-carbonil)-amino]-3-metil-pentanoico); o sus combinaciones.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición de tratamiento incluye agua, el agente de tratamiento y alcohol.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la composición de tratamiento incluye ácido jasmónico (JA) o metil jasmonato (MeJA).
4. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye tratar la semilla no germinada con la composición de tratamiento y posteriormente lavar y/o secar y/o almacenar dicha semilla antes de la germinación.
5. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye tratar la semilla no germinada con la composición de tratamiento y posteriormente almacenar dicha semilla durante al menos 24 horas antes de que se inicie la germinación.
6. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la composición de tratamiento comprende una semilla mojada y el tratamiento comprende tratar la semilla mojàndola en la composición de tratamiento.
7. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la composición de tratamiento comprende agua, un agente de tratamiento y un disolvente no acuoso.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el disolvente no acuoso comprende etanol
9. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la composición de tratamiento comprende un agente de tratamiento a una concentración de entre 0,1 mM y 15 mM.
10. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende mantener la semilla en un estado sin germinación durante el tratamiento mediante el uso de temperaturas frías, y/o colocando la semilla en contacto con la composición de tratamiento de semillas durante 1 hora o más, y/o secando la semilla posteriormente a la aplicación de la composición de tratamiento de la semilla.
11. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la semilla tratada se almacena durante una semana o más antes de que se inicie la germinación.
12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende la composición de tratamiento de semillas para la semilla no germinada y posteriormente, hacer crecer una planta a partir de dicha semilla.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la planta proporcionada mediante el procedimiento presenta resistencia frente a las plagas producidas por los mecanismos de defensa que están regulados mediante la ruta de la oxilipina que se puede denominar también como la ruta del jasmonato o la ruta octadecanoide.
14. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el mecanismo de resistencia de la planta restringe la supervivencia de la plaga y/o el número de plagas y/o el crecimiento de la plaga y/o la reproducción de la plaga.

15. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que las sales de jasmonato se seleccionan entre jasmonato de potasio y jasmonato de sodio.

5 16. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el conjugado de ácido jasmónico-L-aminoácido (unido a amida) es un conjugado de ácido jasmónico-L-aminoácido (unido a amida) con L-isoleucina, L-valina, L-leucina o L-fenilalanina.

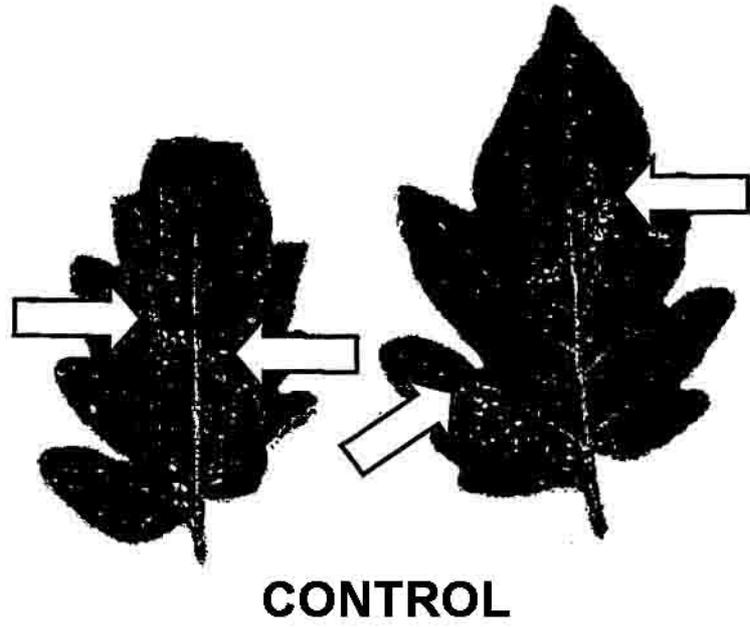


Figura 1

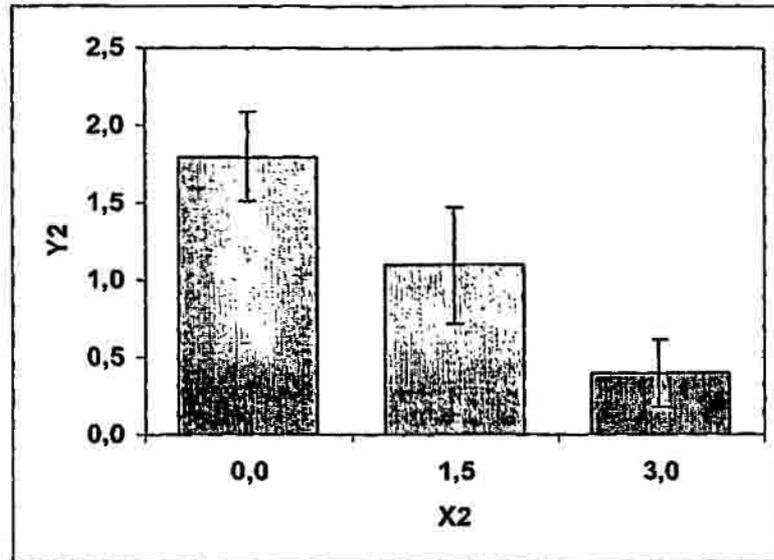


Figura 2

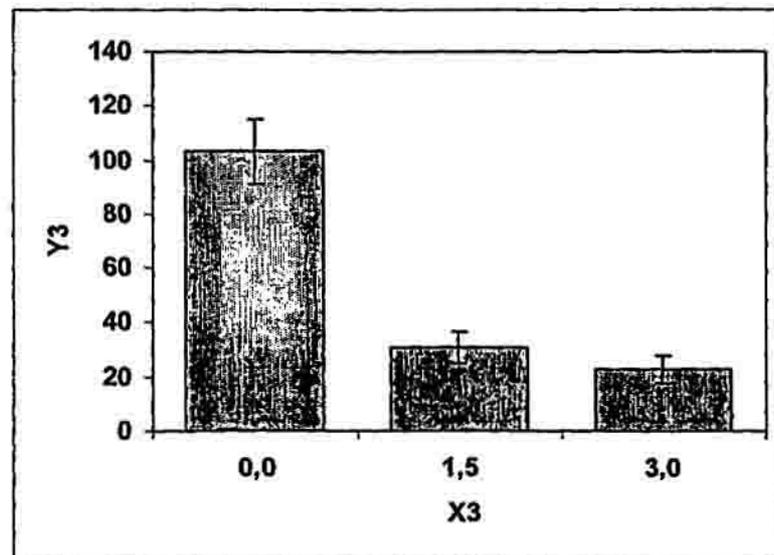


Figura 3

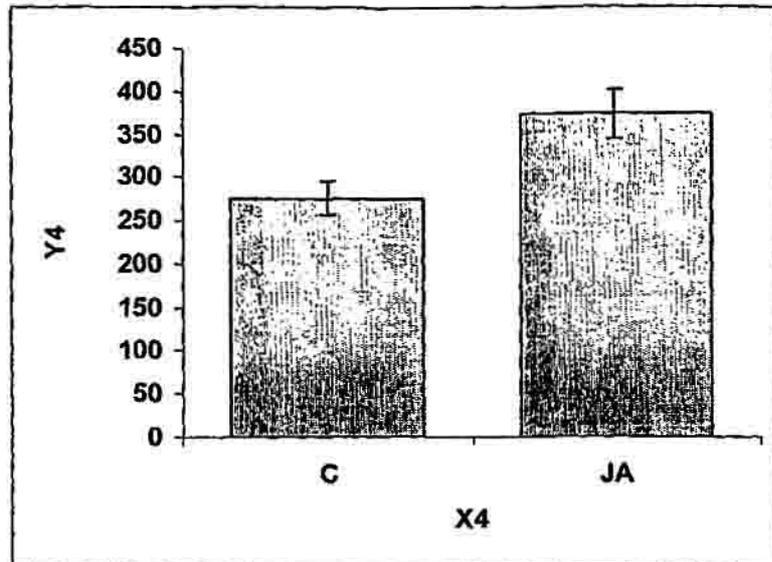


Figura 4

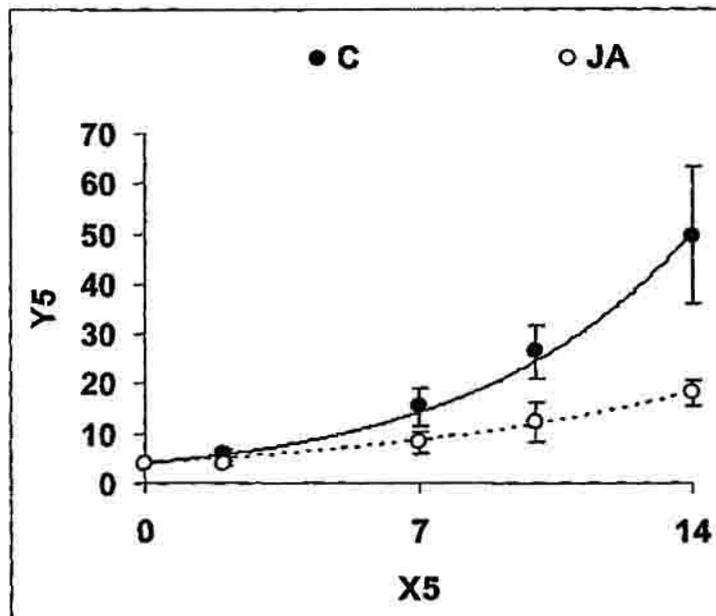


Figura 5

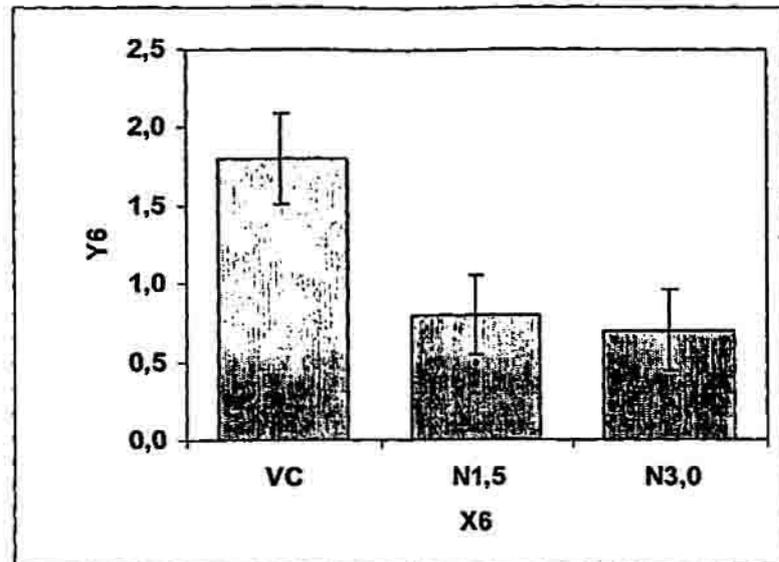


Figura 6

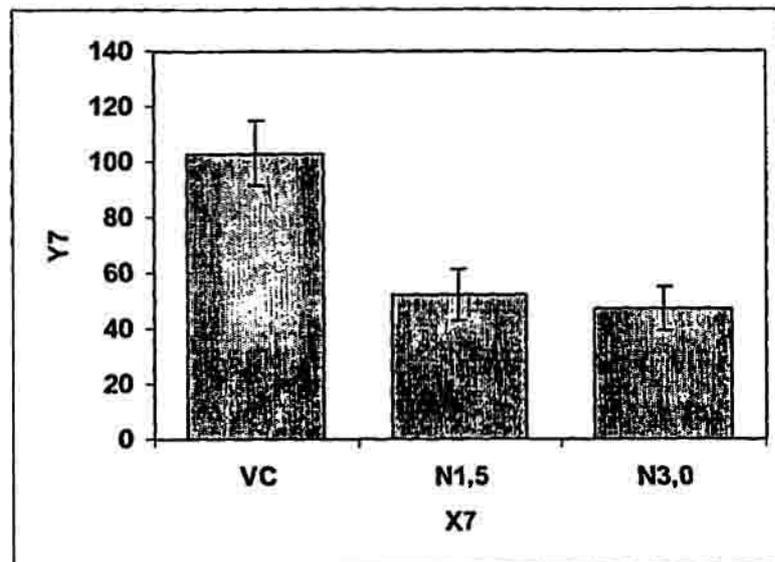


Figura 7

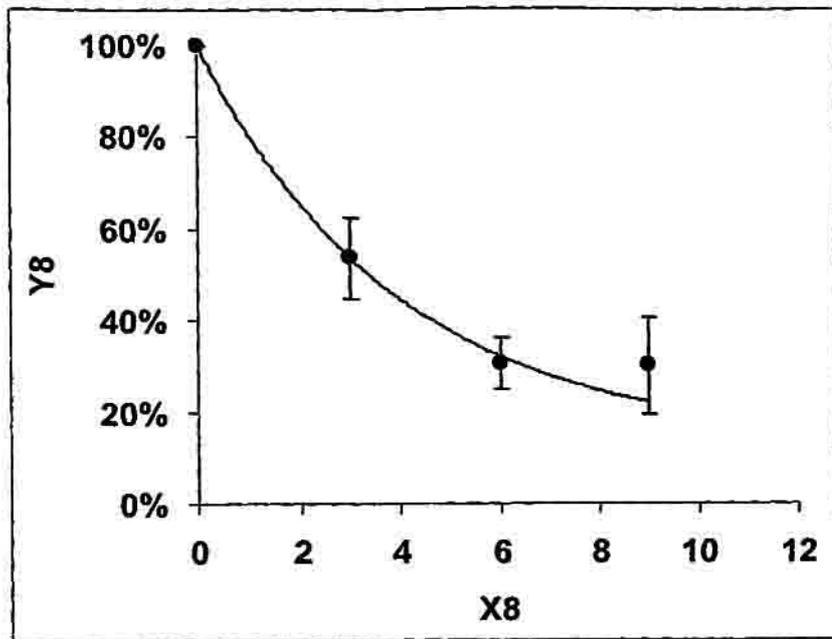


Figura 8

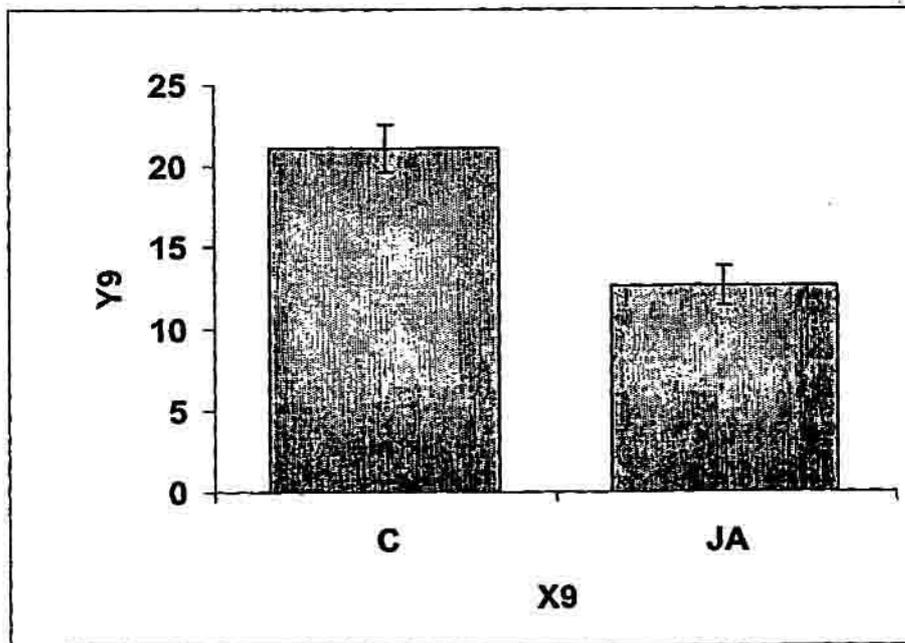


Figura 9

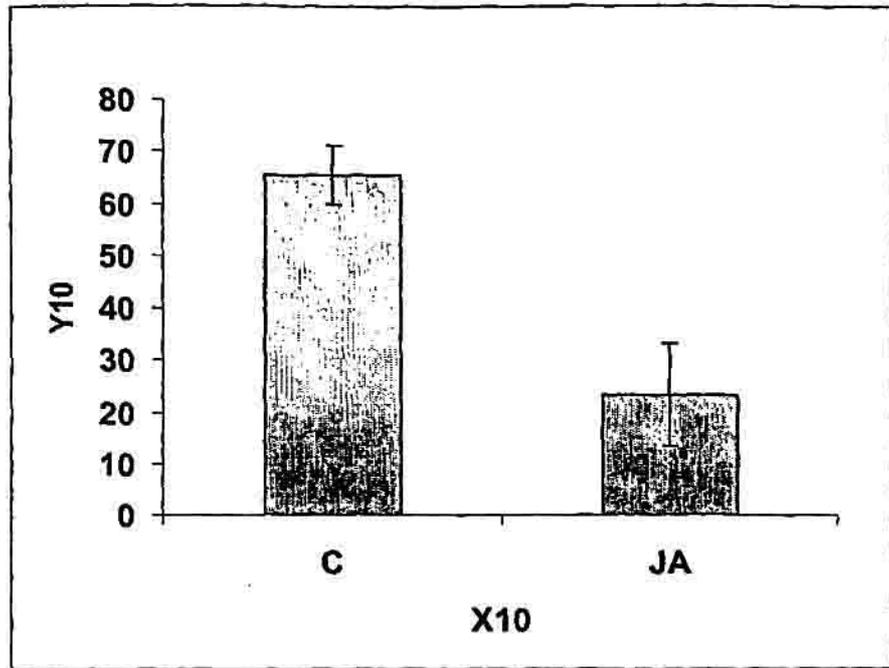


Figura 10

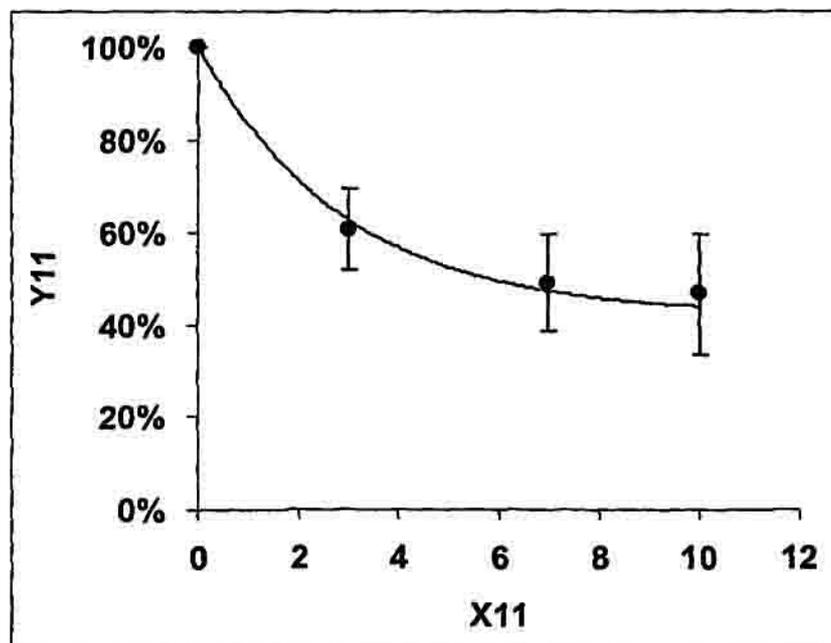


Figura 11

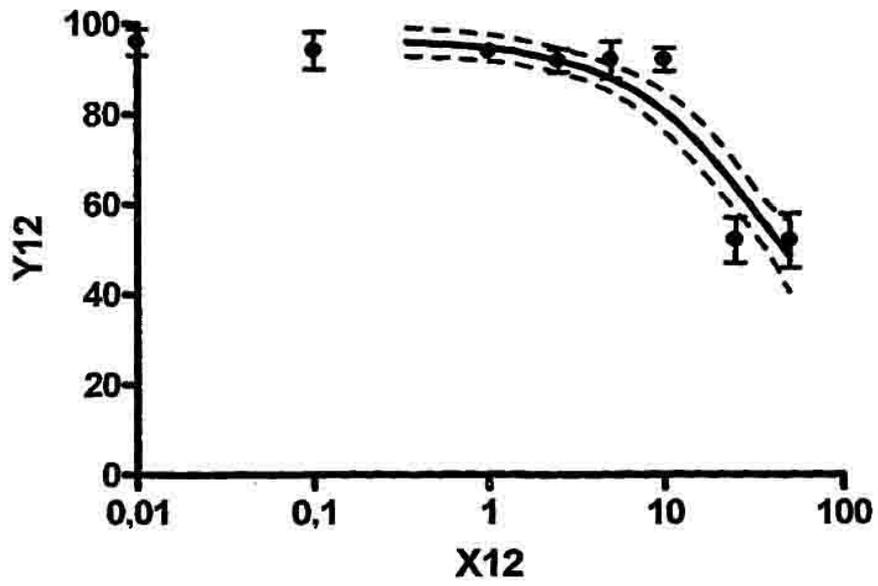


Figura 12

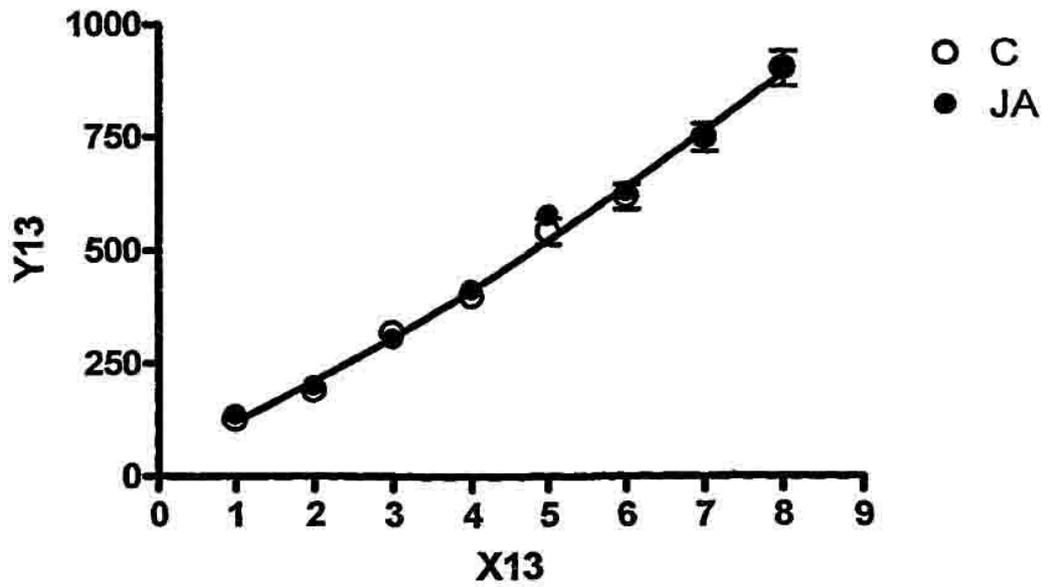


Figura 13

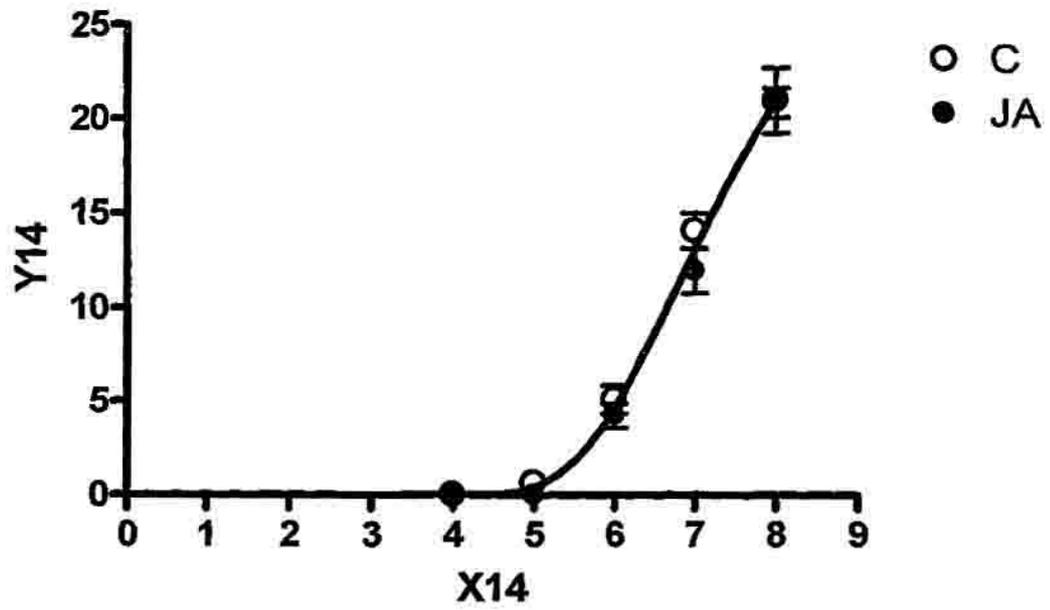


Figura 14

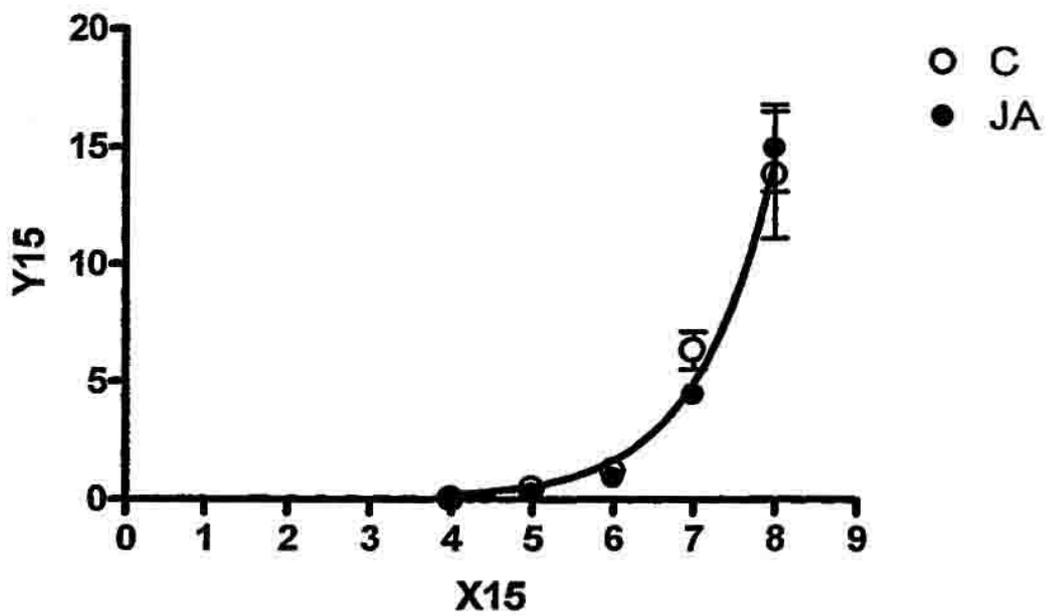


Figura 15

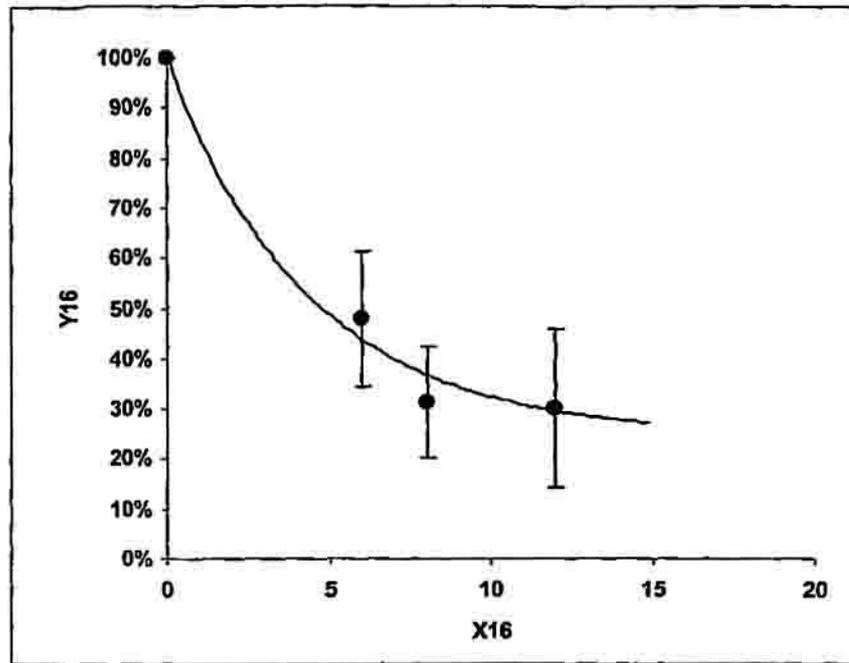


Figura 16