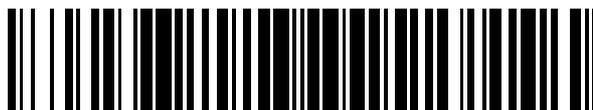


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 990**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 06740371 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1863352**

54 Título: **Resistencia al estrés abiótico en plantas**

30 Prioridad:

31.03.2005 US 666873 P

30.12.2005 US 755290 P

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

16.05.2014

73 Titular/es:

IMPROCROP U.S.A., INC. (100.0%)

3101 CATNIP HILL PIKE

NICHOLASVILLE, KY 40356, US

72 Inventor/es:

FRANK, GEOFF y

TOSUN, N

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 460 990 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

Resistencia al estrés abiótico en plantas

5 Esta solicitud reivindica las ventajas de las Solicitudes de Patente Provisionales de los EE.UU. con N^{os} de serie 60/666.873, presentada el 31 de marzo de 2005, y 60/755.290 presentada el 30 de diciembre de 2005.

Campo técnico

10 Esta invención se refiere al control del estrés abiótico en plantas. En particular, la invención se refiere a métodos y composiciones para la prevención o la reducción de los efectos perjudiciales del estrés abiótico tales como la exposición a una elevada salinidad del suelo. Los métodos de la invención comprenden la aplicación de composiciones que comprenden una preparación de pared celular de levadura a una planta para prevenir o reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico.

15

Antecedentes de la invención

El estrés abiótico puede definirse ampliamente como un grupo de factores no bióticos que pueden dar como resultado efectos perjudiciales en las plantas. Algunos ejemplos de estresantes abióticos incluyen un exceso de salinidad del suelo (así como otras condiciones adversas del suelo), sequía, viento intenso, metales pesados, herbicidas y temperaturas extremas. Dichos estresantes abióticos pueden promover la generación de especies de oxígeno reactivas en células fotosintéticas, y la muerte celular por estrés abiótico puede ser, por tanto, en parte el resultado de un daño oxidativo.

20 Como un ejemplo, las prácticas agrícolas y la mala gestión de la irrigación en regiones cálidas y secas dan como resultado a menudo suelos salinos y yesíferos con una baja productividad. De hecho, la salinización secundaria resultante de una mala gestión de la irrigación afecta aproximadamente al 20 % de las tierras irrigadas en todo el mundo. Por lo tanto, los estresantes abióticos tales como el estrés salino representan una limitación importante para la productividad del suelo. La mejora de los rendimientos de los cultivos en suelos sometidos a limitaciones de salinidad y a otros estresantes abióticos es un objetivo constante y una necesidad en la técnica.

25 Se han considerado varios métodos para reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico, incluyendo medios genéticos tales como la adición de transgenes para antioxidantes (para un ejemplo, véase C. Gisbert y col, *Plant Physiology* 2000, 123 (1), 393 - 402). Adicionalmente, se sabe que un desencadenante glucoproteico de respuesta al estrés de las paredes celulares de *Phytophthora megasperma* y los desencadenantes glucoproteicos derivados de extractos de levadura proporcionan diferentes respuestas en las células de tomate (C. W. Basse y col, *Plant Physiology* 1992, 98 (4), 1239 - 1247). Las mejoras resultantes estaban limitadas, sin embargo, debido a la complejidad del sistema antioxidante vegetal y a los numerosos demás elementos de la fisiología celular que contribuían a la (o restaban) tolerancia al estrés. Consecuentemente permanece una necesidad en la técnica de métodos y composiciones para mejorar la resistencia de las plantas a estresantes abióticos tales como una elevada salinidad del suelo. La presente invención proporciona métodos para la reducción o la prevención de los efectos perjudiciales del estrés abiótico en plantas, que comprenden la aplicación a las mismas de composiciones que comprenden una pared celular de levadura. La aplicación de las composiciones de la presente invención reduce o evita sorprendentemente los efectos perjudiciales en las plantas de los estresantes abióticos tales como la elevada salinidad del suelo.

Sumario de la invención

30 De acuerdo con los propósitos de la presente invención según se describe en este documento, en un aspecto de la presente invención se proporciona un método para reducir los efectos del estrés abiótico en una planta, método que comprende la aplicación de una composición que comprende una pared celular de levadura en una cantidad eficaz para prevenir o reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico. La composición puede comprender al menos un mananoligosacárido derivado de levadura. La composición puede formularse para su aplicación como un aerosol foliar o como una impregnación del suelo.

35 La pared celular de levadura de la composición puede proceder de una especie de levadura seleccionada de entre el grupo de levaduras que consiste en *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota*. En una forma de realización, la composición de pared celular de levadura puede derivar de *Saccharomyces cerevisiae*. En otra forma de realización más, la pared celular de levadura deriva de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1026. La composición puede comprender adicionalmente al menos un extracto vegetal derivado de yuca, que puede obtenerse mediante corte, trituración, maceración, presión o molienda de al menos una porción de la planta de yuca y la obtención de un extracto líquido a partir de la misma.

40 El método de la presente invención es eficaz para proporcionar efectos protectores frente varios estresantes abióticos, que incluyen la exposición a una salinidad excesiva. El método es eficaz para proporcionar efectos protectores para cualquier cultivo vegetal, forraje, cultivo frutícola, cultivo hortícola o cultivo extensivo. En una forma

65

de realización, el método se lleva a cabo sobre un cultivo frutícola tal como una planta de tomate.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inducir resistencia al estrés abiótico en una planta, que comprende la aplicación de una composición que comprende una pared celular de levadura y de al menos un extracto vegetal derivado de yuca en una cantidad eficaz para prevenir o reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico. La pared celular de levadura y el extracto vegetal pueden ser sustancialmente como se ha descrito anteriormente, y pueden estar formulados como se conoce en la técnica para su aplicación como un aerosol foliar o como una impregnación del suelo.

10 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos anexos, que son incorporados en, y forman parte de, la memoria descriptiva, ilustran varios aspectos de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

- 15 la Figura 1 muestra el contenido relativo de agua (RWC) en hojas de planta de tomate bajo una exposición a salinidad (A = composición de pared celular de levadura más NaCl 100 mM, S = composición de pared celular de levadura, * = significativamente diferente de S a un $P < 0,05$);
la Figura 2 muestra la conductancia estomatal de las hojas de la planta de tomate durante la exposición al salino;
- 20 la Figura 3 muestra la fluorescencia de la clorofila (proporciones Fv/Fm) durante el estrés salino, demostrando el efecto protector de la presente composición de pared celular de levadura durante el estrés salino;
- 25 la Figura 4 muestra la actividad de la dismutasa de superóxido (SOD) en las hojas de la planta de tomate durante el estrés salino, y demuestra un aumento significativo en la actividad de la SOD en las hojas tratadas con la composición de pared celular de levadura en comparación con las hojas con estrés salino solo ($P < 0,05$);
la Figura 5 muestra la actividad de la catalasa (CAT) en hojas de la planta de tomate durante el estrés salino, y muestra un aumento en la actividad de la CAT en hojas tratadas con la composición de la presente invención;
- 30 la Figura 6 muestra la actividad de la peroxidasa de ascorbato (AP) en hojas de la planta de tomate durante el estrés salino, y muestra un aumento en la actividad de la AP con la aplicación de la composición de pared celular de levadura en el día 28 de estrés salino;
- 35 la Figura 7 muestra una mejora en la actividad de la peroxidasa (POX) en hojas con estrés salino tratadas con la presente composición en comparación con las hojas con estrés salino;
- 40 la Figura 8 muestra una reducción en el impacto del estrés por NaCl en la peroxidación lipídica de la planta del tomate (malondialdehído, MDA) mediante la aplicación de la presente composición;
- 45 la Figura 9 representa la longitud de la raíz y de los brotes de plantas de tomate expuestas a niveles variables de estrés salino (C = control de agua destilada; A1 = composición de pared celular de levadura a 600 $\mu\text{l L}^{-1}$; A2 = composición de pared celular de levadura a 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$; A3 = composición de pared celular de levadura a 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$; 35 = NaCl 35 mM; 35A1 = composición de pared celular de levadura a 600 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 35 mM; 35A2 = composición de pared celular de levadura a 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 35 mM; 35A3 = composición de pared celular de levadura a 1800 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 35 mM; 70 = NaCl 70 mM; 70A1 = composición de pared celular de levadura a 600 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 70 mM; 70A2 = composición de pared celular de levadura a 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 70 mM; 70A3 = composición de pared celular de levadura a 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 70 mM; 140 = NaCl 140 mM; 140A1 = composición de pared celular de levadura a 600 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 140 mM; 140A2 = composición de pared celular de levadura a 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 140 mM; 140A3 = composición de pared celular de levadura a 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$ + NaCl 140 mM);
la Figura 10 representa el RWC de plantas de tomate expuestas a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM);
- 50 la Figura 11 representa la eficacia fotosintética (Fv/Fm) de plantas de tomate expuestas a NaCl 140 mM;
- 55 la Figura 12 muestra la actividad de la SOD en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM);
la Figura 13 muestra la actividad de la CAT en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM);
la Figura 14 muestra la actividad de la AP en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM);
la Figura 15 muestra la actividad de la reductasa de glutatión (GR) en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM);
la Figura 16 representa el contenido de MDA en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM); y
la Figura 17 representa el contenido de prolina en hojas de la planta de tomate a niveles variables de estrés salino (NaCl 35, 70, 140 mM).

65 Ahora se hará referencia con detalle a la presente forma de realización preferida de la invención, un ejemplo de la cual se ilustra en los dibujos anexos.

Descripción detallada de la invención

Los siguientes ejemplos se presentan como apoyo y para ilustrar adicionalmente la invención según se describe en este documento.

5 De acuerdo con la anterior necesidad identificada en la técnica, la presente invención proporciona métodos para reducir o prevenir los efectos perjudiciales del estrés abiótico en plantas, que comprenden la aplicación a las mismas de composiciones que comprenden una pared celular de levadura. La composición puede opcionalmente incluir adicionalmente un extracto derivado de una planta de yuca.

10 A nivel de la planta completa, los estresantes abióticos tales como una toxicidad por Na⁺ resultantes de una excesiva salinidad del suelo provocan una variedad efectos indeseables, incluyendo la disminución en la velocidad de crecimiento, daños en las hojas y un aumento en la proporción entre raíces y brotes. A nivel del tejido vegetal / celular, los efectos de una excesiva salinidad del suelo incluyen un estrés por un déficit de agua, un aumento en la concentración de ciertos iones que da como resultado una toxicidad metabólica, y deficiencias nutricionales. Muchas plantas responden rápidamente a los estresantes abióticos tales como la sequía y la elevada salinidad del suelo con un cierre estomatal, lo que minimiza la pérdida de agua pero también conduce indeseablemente a una limitación en la fijación del CO₂ y a una reducción en la regeneración del NADP⁺.

20 También se cree que el estrés abiótico da como resultado un aumento en la producción vegetal de radicales libres (especies de oxígeno reactivas), que desestabilizan la normal homeostasis entre la producción de radicales libres y la detoxificación. Las especies de oxígeno reactivas (ROS) incluyen el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. Aunque estos radicales libres son subproductos normales de los procesos esenciales de la vida vegetal, también son entidades químicas altamente reactivas que pueden lesionar los sistemas vivos si no son rápidamente neutralizados por los sistemas de defensa antioxidante de las plantas. Las defensas antioxidantes de las plantas pueden ubicarse ampliamente en dos categorías: (1) antioxidantes que reaccionan con los radicales libres y los neutralizan, tales como peroxidasa, dismutasa de superóxido y catalasa; y (2) antioxidantes que regeneran los antioxidantes oxidados, tales como peroxidasa de ascorbato y reductasa de glutatión.

30 Se conocen las formulaciones basadas en paredes celulares de levadura y medios de fermentación como composiciones alimenticias vegetales. Dichas composiciones proporcionan varios nutrientes útiles para la estimulación de un crecimiento y una salud vegetal óptimos. También se conoce el uso de productos basados en levadura para la gestión del marchitamiento posterior a la cosecha, que potencialmente tiene un efecto sobre el crecimiento fúngico mediado por una inhibición competitiva (Wisniewski y Wilson. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. Hort. Science 27: 94 - 98; Arras y col. 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. J. Hort. Sci. and Biotechnology 73: 413 - 418). Sin embargo, el potencial para la reducción del estrés abiótico mediante el uso de una preparación de levadura no viva todavía no ha sido evaluado.

40 Procedimientos experimentales

Los siguientes procedimientos experimentales se aplican a los ejemplos desvelados en este documento.

45 A. Parámetros de crecimiento

Se separaron las raíces y los brotes de las plantas cosechadas, y se midieron las longitudes y los pesos en fresco. Se determinaron los pesos en seco de las raíces y los brotes después de secarlos en un horno a 70 ° C durante 3 días.

50 B. Contenido de agua relativo de las hojas (RWC)

El contenido de agua relativo de las hojas se determinó mediante la medición de los pesos en fresco (FW) de seis discos de hojas en cada grupo experimental. Los discos se hicieron flotar después en agua desionizada bajo una baja irradiación durante 7 h, para determinar el peso túrgido (TW). Entonces las muestras de hojas se secan en un horno a 70 °C durante 3 días para determinar el peso en seco (DW). Se calculó el RWC de las hojas de acuerdo con la fórmula:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{[\text{FW} - \text{DW}]}{[\text{TW} - \text{DW}]} \times 100$$

60 C. Conductancia estomatal

La conductancia estomatal se midió en hojas intactas completamente expandidas mediante el uso de un porómetro portátil.

65

D. Fluorescencia de la clorofila

Se midió la eficacia fotosintética del fotosistema II (PS II) con un analizador portátil de la eficacia vegetal (HANSATECH Inst. Ltd., Norfolk, Reino Unido). Se calcularon las proporciones Fv/Fm para compararlas con la eficacia fotosintética del PS II.

E. Actividades de las enzimas antioxidantes

Se homogeneizaron muestras de hojas en tampón de fosfato sódico 50 mM enfriado en hielo (pH 7,8) que contenía EDTA·Na₂ 1 mM y 5 % (p/v) de PVPP insoluble a 0 - 4 ° C. Los homogeneizados se centrifugaron (13.000 x g durante 20 min a 0 °C), y se midió la actividad enzimática del sobrenadante. Se midió la actividad de la dismutasa de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1) espectrofotométricamente (Beauchamp, C. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamida gels. Anal. Biochem. 44: 276 - 287). La peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7) se determinó de acuerdo con Herzog y Fahimi (Herzog, V., Fahimi, H. 1973. Determination of the activity of peroxidase. Anal. Biochem. 55: 554 - 562). La peroxidasa de ascorbato (AP; EC 1.11.1.11) se estimó de acuerdo con Nakano y Asada (Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 22: 867 - 880). La catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se ensayó midiendo la velocidad inicial de desaparición de peróxido (Bergmeyer, N. 1970. Methoden der enzymatischen Analyse. Akademie Verlag, Berlín. Vol. 1, págs. 636 - 647). La reductasa de glutatión (GR; EC 1.6.4.2) se midió de acuerdo con Foyer y Halliwell (Foyer, C. H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21 - 25).

F. Peroxidación lipídica

Se determinó el nivel de peroxidación lipídica en términos de contenido de malondialdehído (MDA) mediante el uso de un método con ácido tiobarbitúrico [Madhava, Rao, K. V., Sresty, T. V. S. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn y Ni stresses. Plant Sci. 157: 113 - 128).

G. Contenido en prolina

El nivel de prolina se determinó de acuerdo con Bates y col. (Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205 - 207).

Ejemplo 1

Se expusieron hojas de plántulas de tomate de dos semanas de edad a estrés salino. Las hojas fueron pulverizadas durante un periodo de 4 semanas bien con agua destilada (como control) o bien con agua destilada que contenía una disolución al 0,5 % (v/v) de una composición que comprende 300 mg/L de pared celular de levadura (2,0 - 3,0 % v/v), derivada de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1026. La composición incluye adicionalmente un 29,5 - 31,0 % (v/v) de extracto de yuca, derivado mediante la maceración de la corteza de la planta de yuca y la obtención de un jugo a partir de la misma. El resto de la composición comprendía medio de fermentación bacteriano agotado (65 - 67 % v/v), benzoato sódico (,03 - 0,4 % v/v) y sorbato potásico (0,1 - 0,2 % v/v).

Después de un tratamiento con agua destilada o con la composición de la presente invención durante el periodo de 4 semanas, las plántulas se expusieron a NaCl 100 mM durante un periodo de 6 semanas. Se obtuvieron muestras de hojas en los días 0, 28 y 43 después del comienzo del estrés salino, y se almacenaron a -20 ° C hasta su análisis. En los mismos periodos temporales se obtuvieron mediciones de diversos parámetros de crecimiento según se describió previamente.

La composición de pared celular de levadura no tuvo un efecto significativo sobre la longitud de las raíces y los brotes en las plantas expuestas al estrés salino (datos no mostrados). Como se muestra en la Tabla 1, los efectos del estrés salino sobre el peso en fresco de los brotes, el peso en seco de los brotes y el peso en seco de las raíces fueron aliviados por la composición de esta invención.

Tabla 1. Peso de las raíces y los brotes de la planta de tomate después del estrés salino.

Día	Peso en fresco de los brotes (g)		
	Control	Pared celular de levadura + NaCl	NaCl
0	9,38 ± 1,83	9,00 ± 0,25	-
28	25,35 ± 2,91	17,75 ± 4,45	16,38 ± 2,41
43	26,29 ± 2,02	20,07 ± 3,12	15,84 ± 3,15
Día	Peso en seco de los brotes (g)		
	Control	Pared celular de levadura + NaCl	NaCl
0	0,778 ± 0,02	0,658 ± 0,06	-
28	2,957 ± 0,04	2,805 ± 0,09	2,540 ± 0,08

43	3,368 ± 0,09	3,292 ± 0,07	3,187 ± 0,08
	Peso en frasco de la raíz (g)		
Día	Control	Pared celular de levadura + NaCl	NaCl
0	2,60 ± 0,25	2,12 ± 0,37	-
28	3,69 ± 0,75	4,37 ± 0,42	4,27 ± 0,72
43	5,87 ± 0,96	4,57 ± 0,77	4,85 ± 0,89
	Peso en seco de la raíz (g)		
Día	Control	Pared celular de levadura + NaCl	NaCl
0	0,172 ± 0,028	0,158 ± 0,027	-
28	0,626 ± 0,041	0,488 ± 0,056	0,461 ± 0,061
43	0,540 ± 0,040	0,572 ± 0,069	0,428 ± 0,036

5 La aplicación de la composición de pared celular de levadura de la invención mejoró significativamente el peso en seco de los brotes de los tomates en unas condiciones de alta salinidad del suelo en el día 28, y de forma similar mejoró el peso en fresco de los brotes en el día 43. De forma similar, la composición de la presente invención alivió los efectos de la salinidad sobre el peso en seco de la raíz de la planta de tomate. Consecuentemente se observó un efecto positivo del presente método sobre los parámetros de crecimiento de las plantas tratadas en presencia de estrés salino.

10 Con respecto a las Figuras, la composición de la presente invención era protectora frente a la disminución en el RWC de las hojas estimulado por el estrés salino (Figura 1). La protección frente a la reducción en el contenido de agua de las hojas inducida por la salinidad fue por lo tanto demostrada. De forma análoga, la conductividad estomatal (Figura 2), la fluorescencia de la clorofila (Figura 3), la SOD (Figura 4), la catalasa (un destoxicante del peróxido de hidrógeno; Figura 5) la peroxidasa de ascorbato (Figura 6), la peroxidasa (Figura 7) y la peroxidación lipídica (Figura 8) fueron impactados negativamente por el estrés salino. El método de la presente invención fue
15 uniformemente protector frente a las disminuciones en estas mediciones del estrés en la planta provocado por el estrés salino.

20 Consecuentemente se demostró que el método de la presente invención reduce eficazmente las disminuciones en el peso en seco de la raíz y los brotes provocadas por una excesiva salinidad del suelo. El método mejoró además la capacidad de retención de agua y protegió la turgencia de las plantas frente a la deshidratación inducida por dicha salinidad en el suelo. El cierre estomatal en respuesta al estrés salino fue suprimido, sugiriendo que la captación de CO₂ de la planta podría ser mantenida incluso en dichas condiciones de estrés. La disminución en la fotoinhibición de la eficacia del PS II provocada por la salinidad del suelo se redujo. Además, la actividad de varias enzimas implicadas en la destoxicación de los radicales libres o en la regeneración de las enzimas destoxicantes fue
25 preservada incluso con estrés salino por el método de esta invención, demostrando que las plantas así tratadas eran capaces de mantener una función más normal incluso cuando eran expuestas a una excesiva salinidad del suelo. Consecuentemente, se proporciona un método eficaz para proporcionar una protección vegetal total para plantas sometidas a estresantes abióticos tales como la salinidad del suelo.

30 Ejemplo 2

Se hicieron crecer plantas de tomate híbridas F1 (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Zeraim Gedera) en un invernadero a 20 - 25 °C con luz natural en macetas con abono estándar de 19 cm de diámetro. A las tres semanas de edad, las plántulas fueron pulverizadas hasta escurrir con un control (agua destilada) o con la composición según se describe en el Ejemplo 1 (600, 1.200 y 1.800 µl L⁻¹) una vez por semana. Comenzando a las cuatro semanas de edad, las plántulas se irrigan después con NaCl 35 mM, 70 mM o 140 mM dos veces por semana, y este tratamiento se continuó durante 10 semanas desde el inicio del tratamiento salino. Las plantas fueron recogidas en los intervalos descritos, y se realizaron mediciones fisiológicas y se determinaron las actividades de las enzimas
40 antioxidantes.

Según se muestra en la Figura 9, la longitud de las raíces y los brotes de las plantas disminuyó al aumentar la salinidad en la novena semana tratamiento. La composición de la presente invención aumento la longitud de las raíces y los brotes de las plantas con estrés salino a las mayores concentraciones (1.200 y 1.800 µl L⁻¹) y los mayores niveles de sal (NaCl 70 y 140 mM). De forma análoga (véase la Figura 10), el RWC de las hojas disminuyó
45 significativamente bajo un estrés con NaCl 70 y 140 mM. La aplicación de la composición de la presente invención mejoró la reducción en el RWC de las hojas observado tras la aplicación de NaCl solo, lo que indica una reducción en las pérdidas de agua inducida por la salinidad. La fluorescencia de la clorofila, es decir, la eficacia fotosintética del PS II (proporción Fv/Fm) durante el estrés salino se muestra en la Figura 11. Se observaron mejoras en la protección con la aplicación de la composición de la presente invención en la semana 9 de tratamiento, particularmente a la mayor concentración de sal aplicada (NaCl 140 mM), demostrando que el presente método
50 mejoraba la eficacia fotosintética en plantas en condiciones de estrés salino.

Volviendo a los datos de los sistemas antioxidantes vegetales, la actividad de la SOD, un secuestrante del radical superóxido, se muestra en la Figura 12. La actividad de la SOD disminuyó al aumentar la salinidad en comparación

5 con los controles, particularmente a la concentración 140 mM de NaCl. La composición de la presente invención mejoró la actividad de la SOD, particularmente a las mayores concentraciones. De forma análoga (véase la Figura 13), la presente composición a 1.200 y 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$ mejoró la actividad de la CAT a las 9 semanas tras la aplicación de NaCl 35 mM. La catalasa es importante porque elimina el H_2O_2 producido por la SOD. La presente composición a 600 y 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$ mejoró la actividad de la CAT a las 9 semanas tras la aplicación de NaCl 70 mM. La aplicación de la presente composición a 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$ mejoró la actividad de la CAT a las 9 semanas tras la aplicación de NaCl 140 mM a unos niveles mayores que el grupo de control.

10 De forma análoga, la composición de la presente invención mejoró la AP (que junto con la reductasa de monodeshidroascorbato, la reductasa de deshidroascorbato y la reductasa de glutatión ayuda a la eliminación del H_2O ; véase Foyer y Halliwell, 1976) y la actividad de la GR en plantas de tomate con estrés salino. En particular, (véase la Figura 14), la actividad de la AP en plantas expuestas a NaCl 35 y 70 mM aumentó mediante la aplicación de la presente composición. El aumento observado era mayor en las plantas expuestas a NaCl 140 mM y 1.200 y 1.800 $\mu\text{l L}^{-1}$ de la presente composición, alcanzando un nivel de actividad mayor que en el grupo de control.

15 La composición de la presente invención (600 y 1.200 $\mu\text{l L}^{-1}$; véase la Figura 15) también aumentó la actividad de la GR, particularmente en hojas de la planta de tomate expuestas a 35 y 70 mM. El malondialdehído (una medida de la peroxidación lipídica) en las hojas de la planta de tomate disminuyó por el estrés salino (Figura 16). La peroxidación lipídica refleja el daño oxidativo inducido por radicales libres a nivel celular. Todos los niveles de aplicación de la presente composición aumentaron el nivel de MDA de las plantas de tomate en cada condición de salinidad evaluada.

20 La prolina se considera una fuente de carbono y de nitrógeno para una rápida recuperación de la planta del estrés y el crecimiento, un estabilizante de membranas y ciertas macromoléculas, un secuestrante de radicales libres, un grupo energético para regular el potencial *redox*, y un regulador del pH citosólico (Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N. B. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 463 - 468). La acumulación de prolina aumentó significativamente al aumentar la concentración de salinidad a las 9 semanas de tratamiento. La presente composición provocó un aumento notable en el contenido de prolina de las plantas de tomate sometidas a la mayor concentración de sal (35 mM).

25 Consecuentemente, en este documento se demuestra que el método de la presente invención proporciona una protección mejorada, particularmente en unas condiciones de altos niveles de salinidad del medio y del suelo (NaCl 70 y 140 mM). El método dio como resultado una mejora en las actividades de varias enzimas antioxidantes frente a diferentes niveles de salinidad. De forma análoga, se mejoró el crecimiento vegetativo de las plantas en unas condiciones de exceso de salinidad.

30 Podrían añadirse nutrientes o fuentes de nutrientes adicionales tales como oligominerales, vitaminas, fuentes de azúcar, tales como molasas, y similares, para suministrar beneficios adicionales a la planta tratada. Aún adicionalmente, podrían añadirse organismos beneficiosos conocidos tales como *Lactobacilli* para incluir un efecto inhibidor competitivo frente al crecimiento de patógenos vegetales. Puede añadirse conservantes alternativos para prolongar la vida de almacenamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir los efectos del estrés abiótico en una planta, método que comprende la aplicación de una composición que comprende una pared celular de levadura en una cantidad eficaz para prevenir a reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la composición comprende al menos un mananoligosacárido derivado de levadura.
- 10 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición está formulada para su aplicación como un aerosol foliar o como una impregnación del suelo.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición deriva de una especie de levadura seleccionada del grupo de levaduras que consiste en *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota*.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la composición deriva de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que la composición deriva de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1026.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende adicionalmente al menos un extracto vegetal derivado de yuca.
- 25 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto vegetal se obtiene mediante corte, trituración, maceración, presión o molienda de dicha planta de yuca y la obtención de un extracto líquido a partir de la misma.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el estrés abiótico es la exposición a una salinidad excesiva.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la planta es una planta de tomate.
- 35 11. Un método para la inducción de resistencia al estrés abiótico en una planta, que comprende la aplicación de una composición que comprende una pared celular de levadura y al menos un extracto vegetal derivado de yuca en una cantidad eficaz para prevenir o reducir los efectos perjudiciales del estrés abiótico.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que la composición incluye al menos un mananoligosacárido derivado de levadura.
13. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que la composición está formulada para su aplicación como un aerosol foliar o como una impregnación del suelo.
- 45 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, en el que la pared celular de levadura deriva de una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota*.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la pared celular de levadura deriva de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 50 16. El método de la reivindicación 15, en el que la pared celular de levadura deriva de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1026.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 16, en el que el extracto vegetal se obtiene mediante corte, trituración, maceración, presión o molienda de la planta de yuca y la obtención de un extracto líquido a partir de la misma.
- 55 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 17, en el que el estrés abiótico es la exposición a una salinidad excesiva.
- 60 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 18, en el que la planta es una planta de tomate.

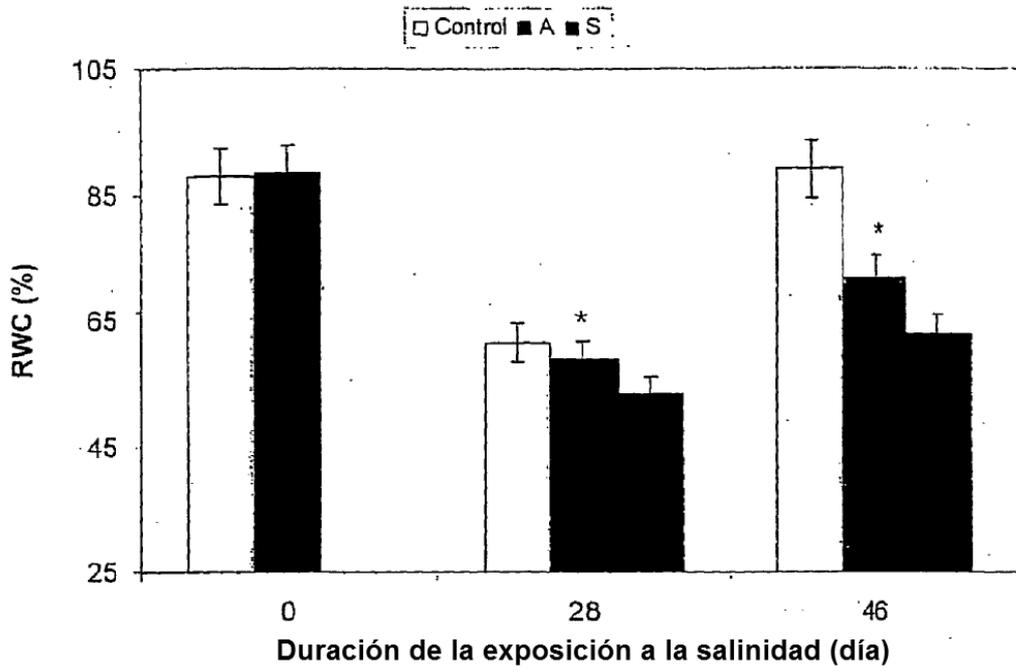


Fig. 1

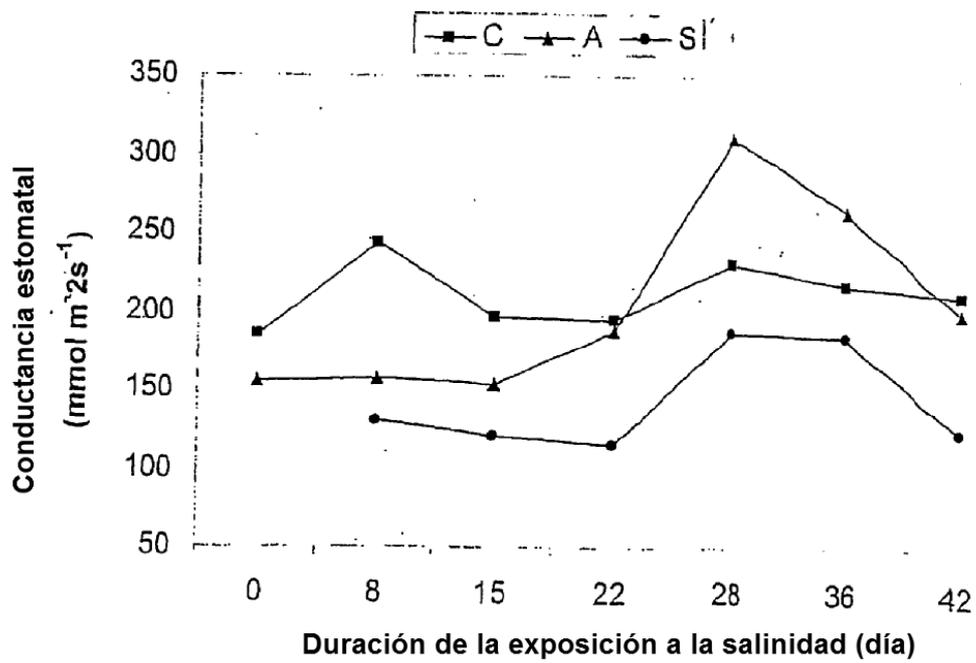


Fig. 2

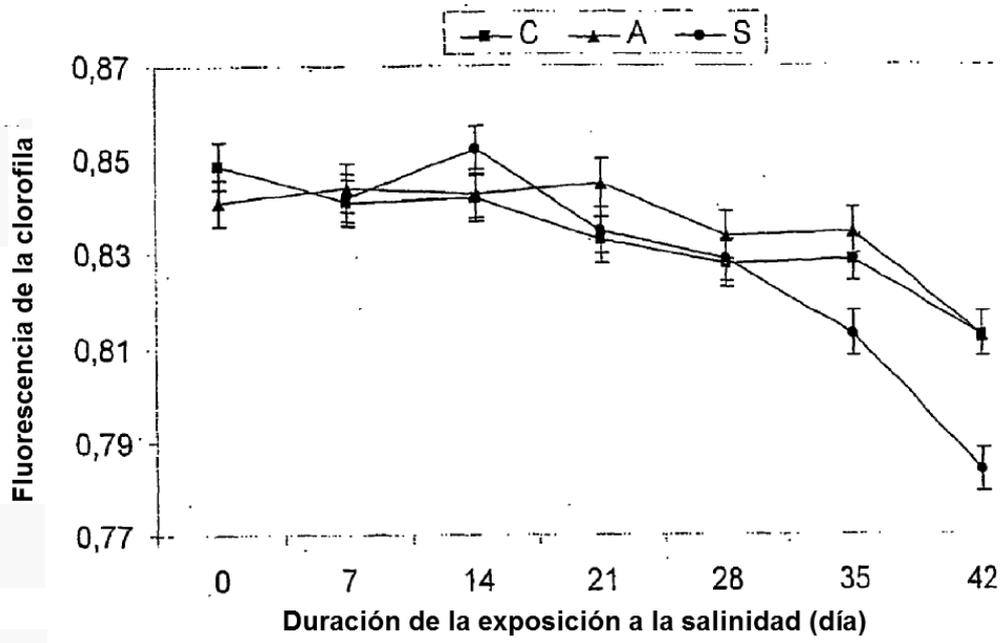


Fig. 3

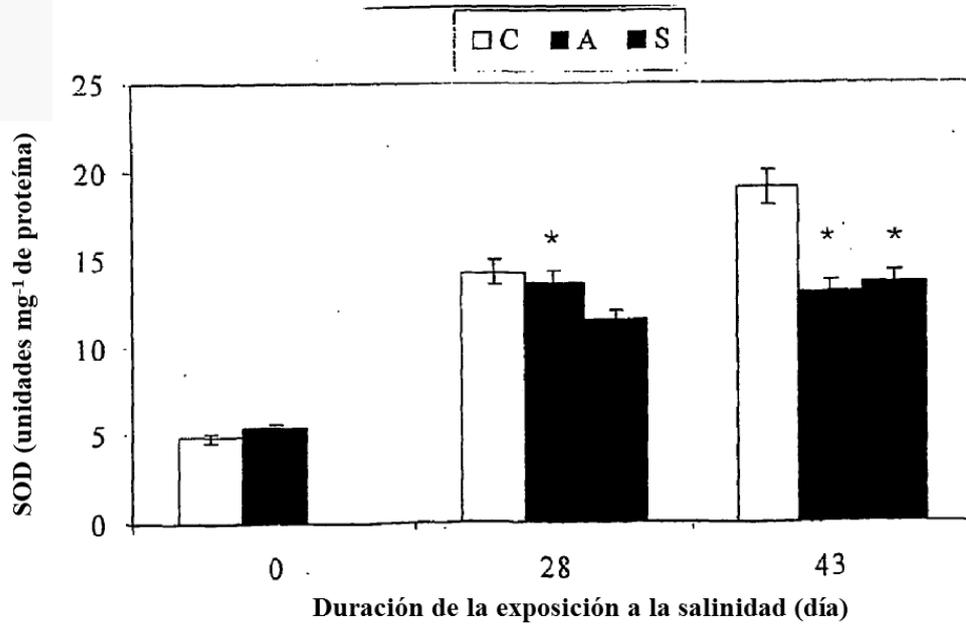


Fig. 4

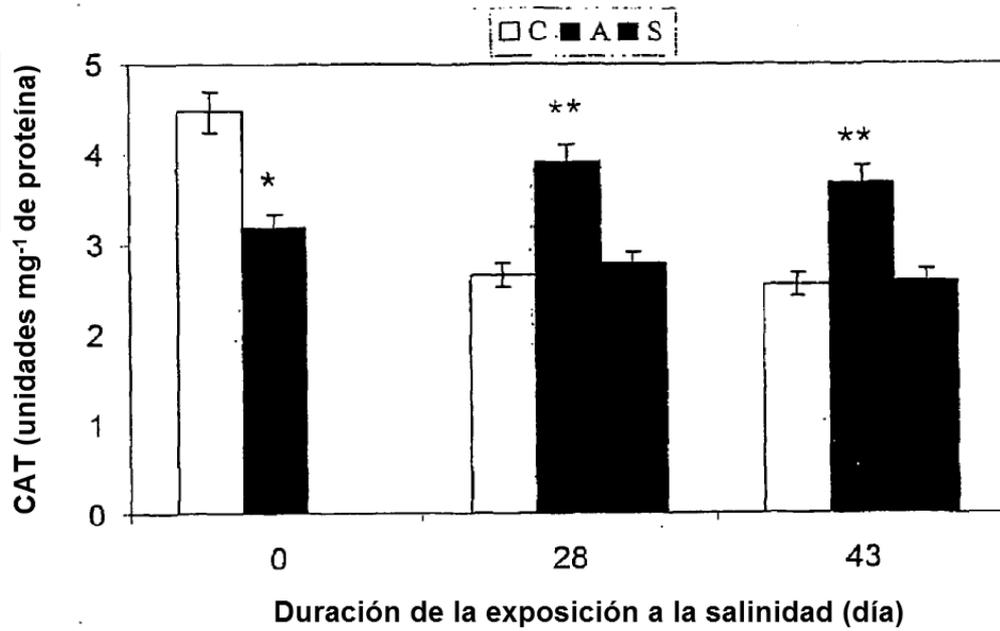


Fig. 5

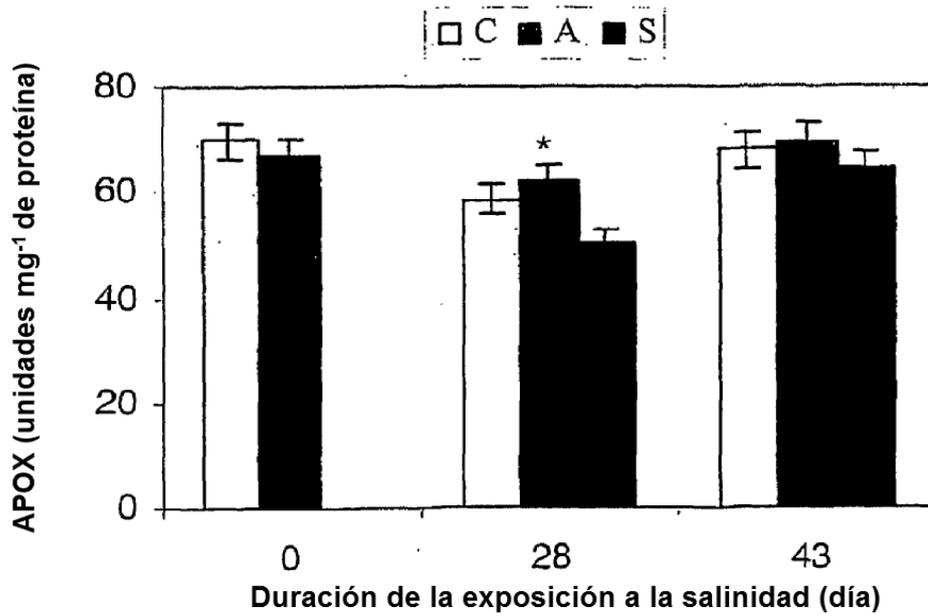


Fig. 6

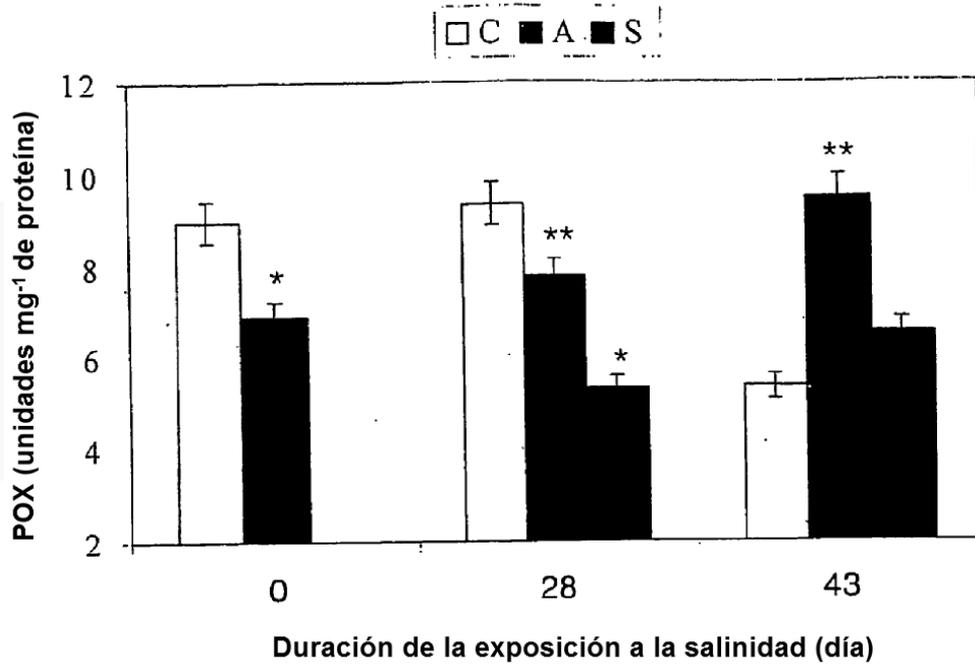


Fig. 7

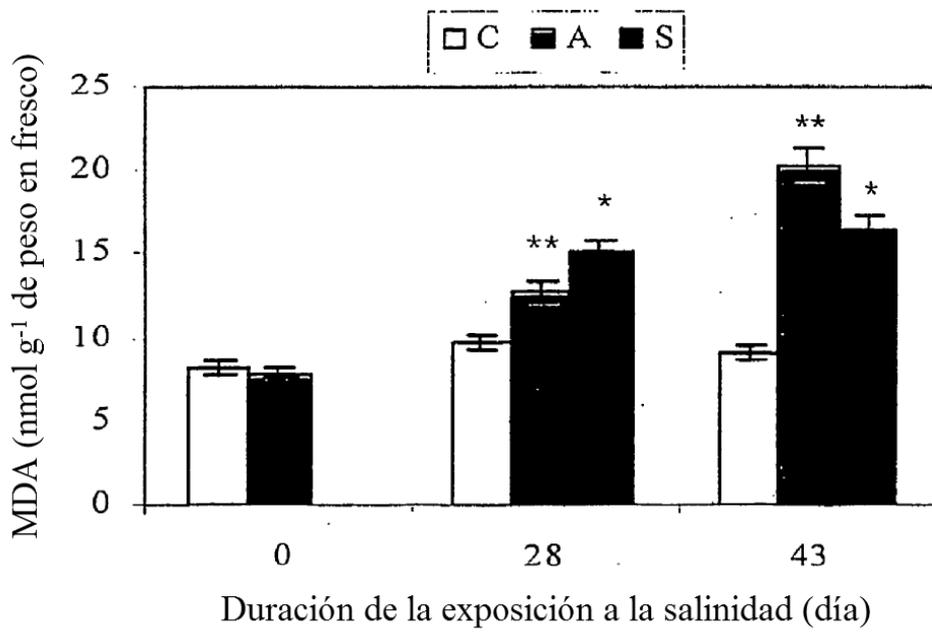


Fig. 8

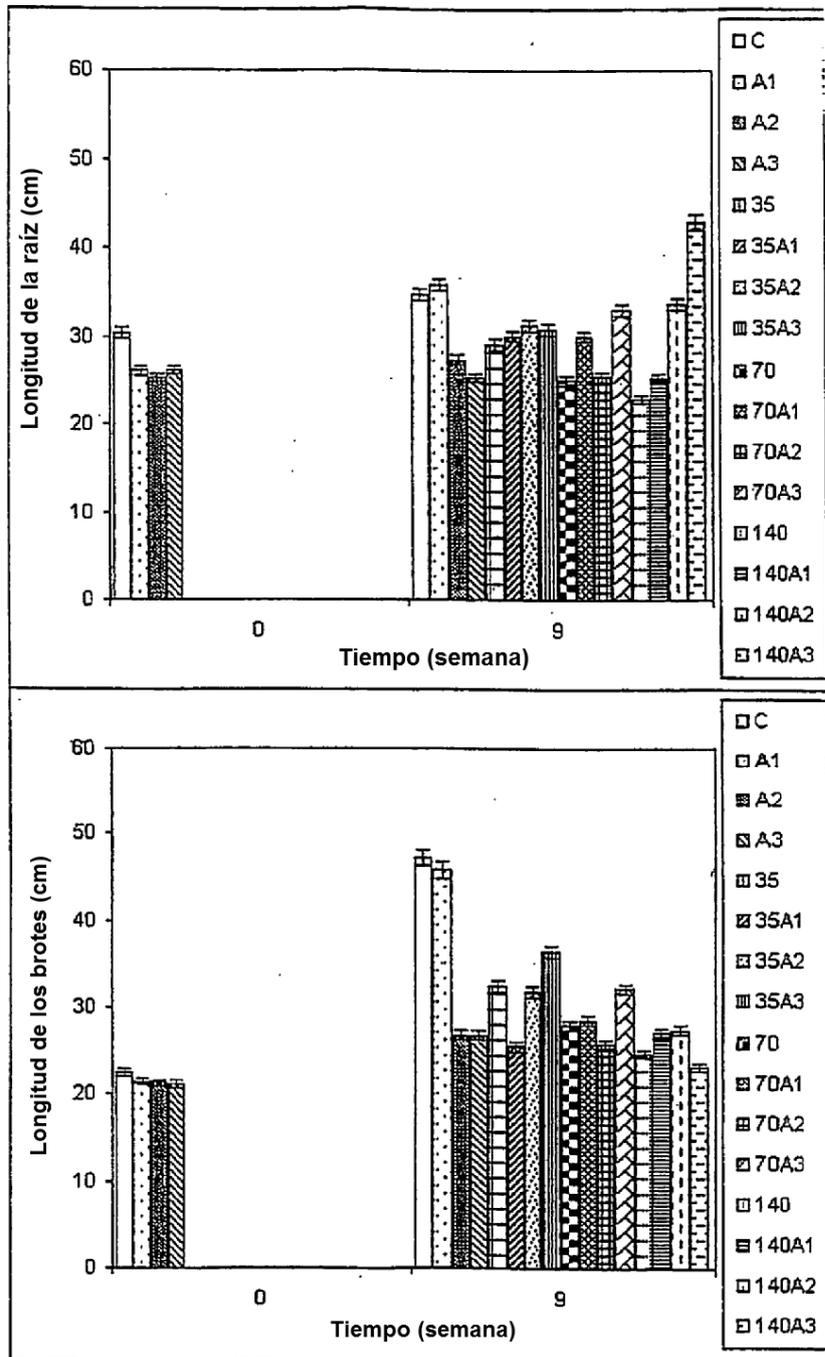


Fig. 9

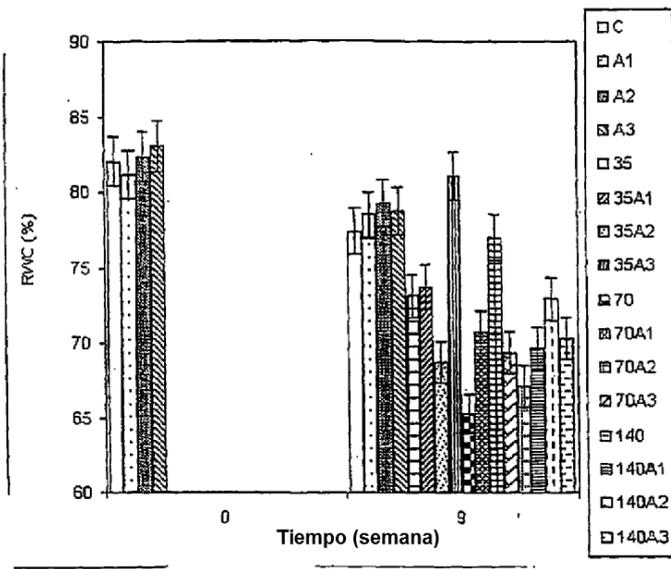


Fig. 10

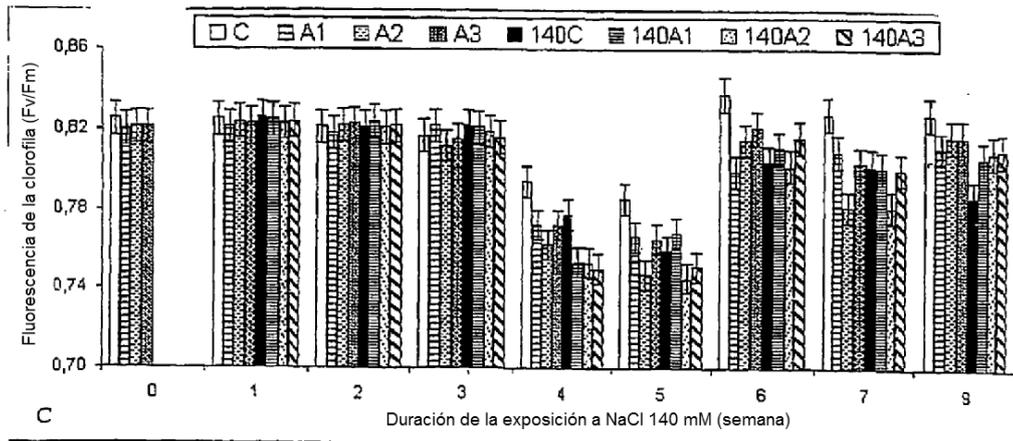


Fig. 11

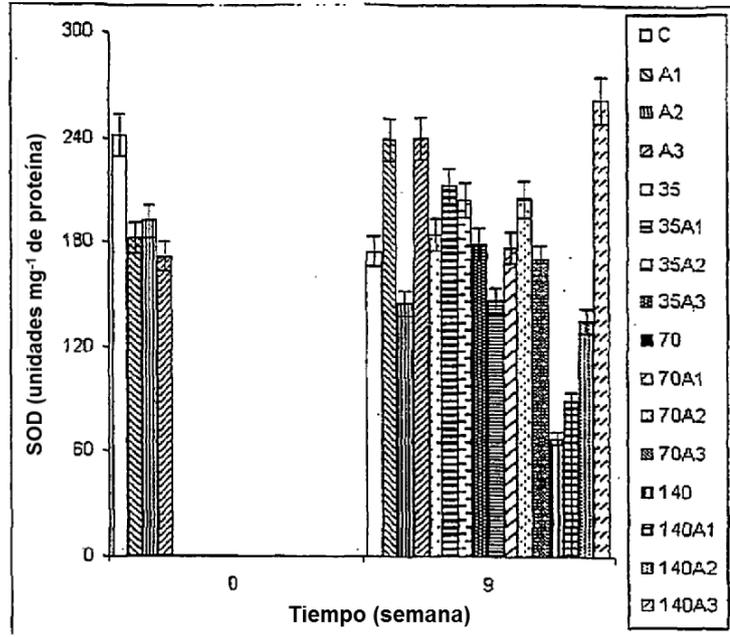


Fig. 12

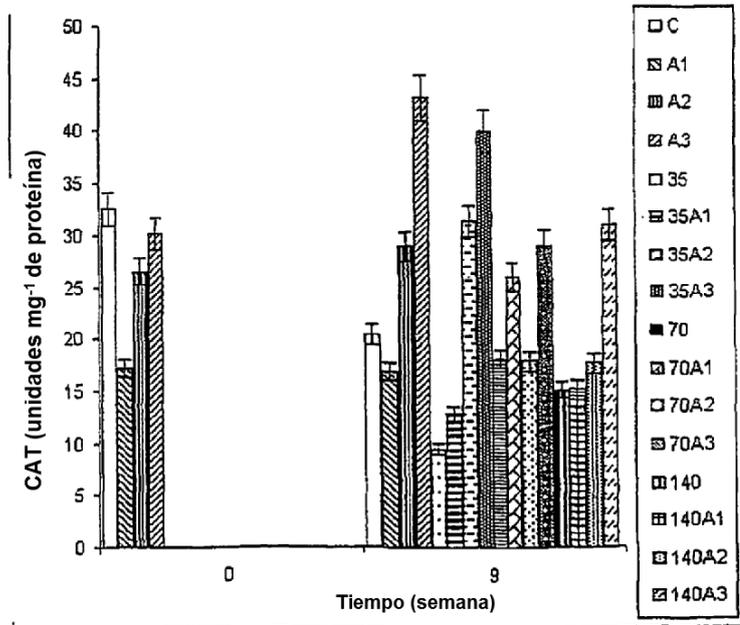


Fig. 13

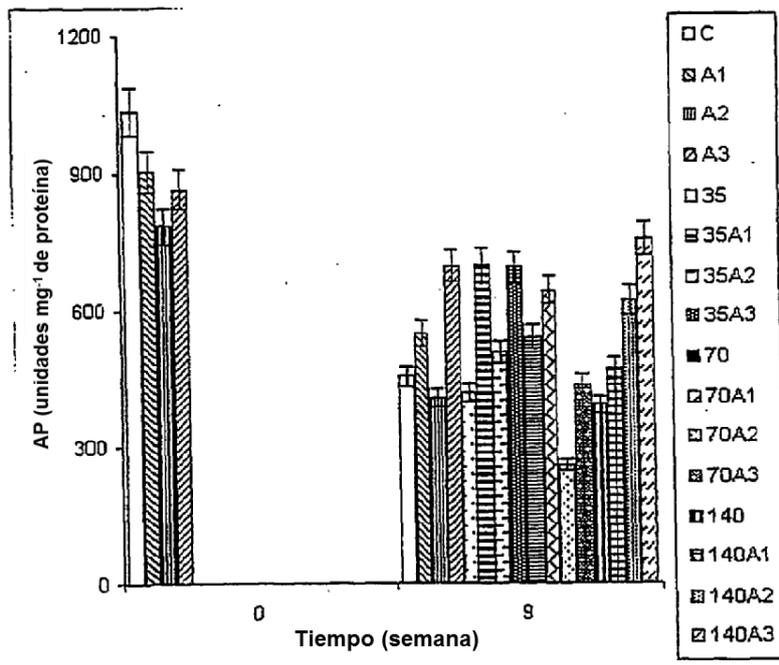


Fig. 14

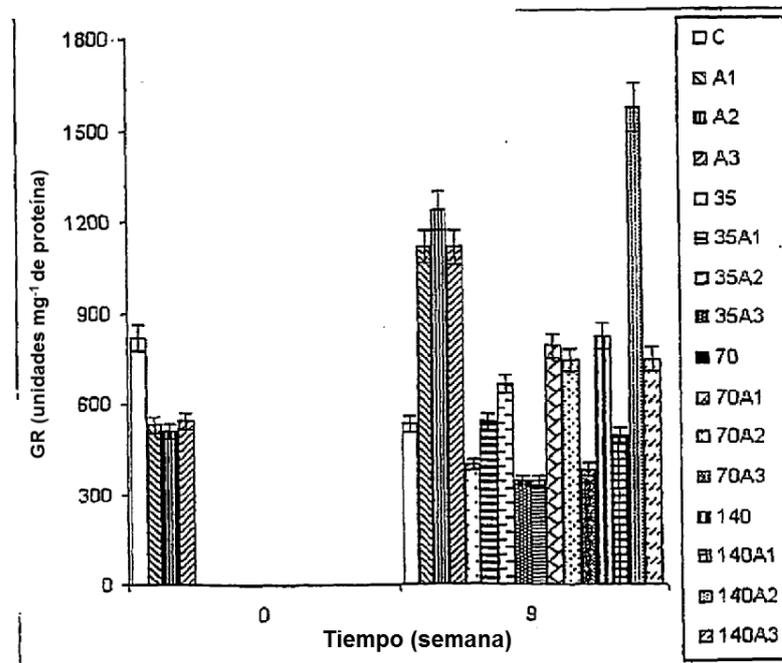


Fig. 15

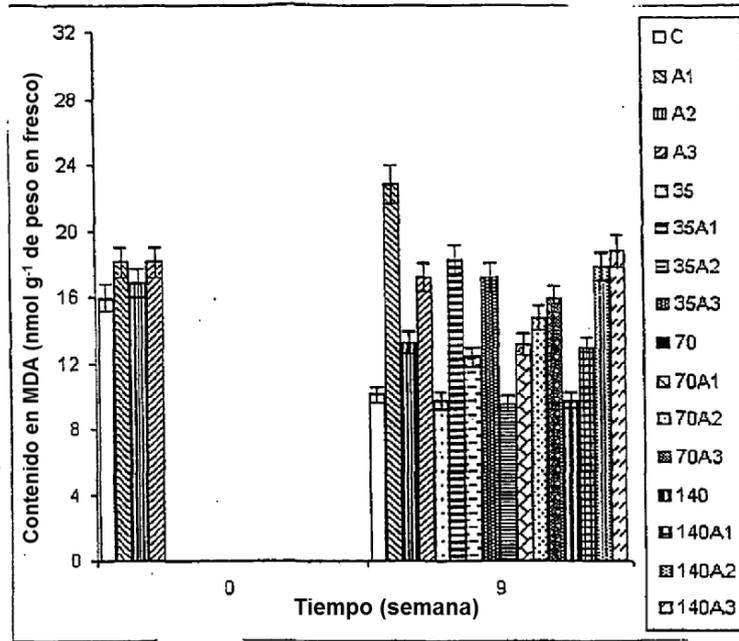


Fig. 16

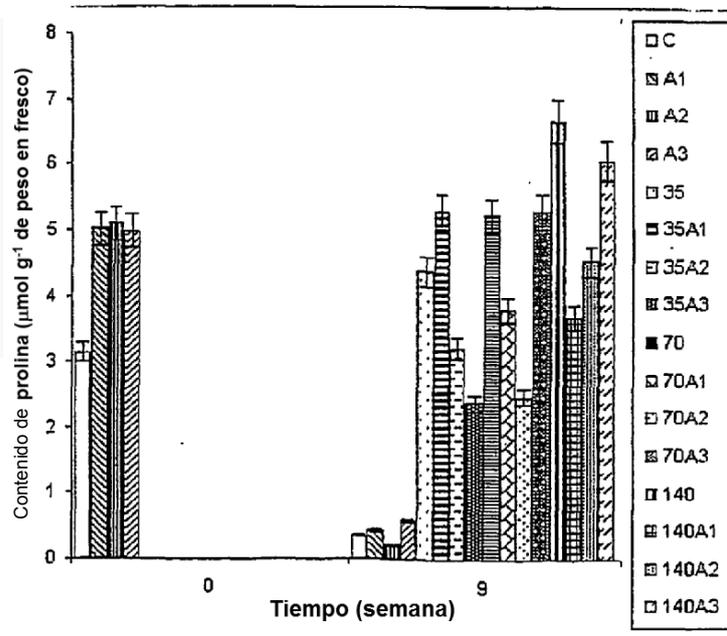


Fig. 17