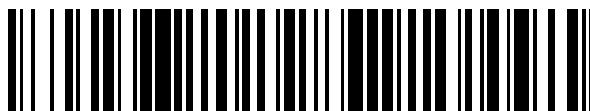


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 098**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

C05F 11/00 (2006.01)

C05F 11/10 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05746681 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1729575**

54 Título: **Utilización de ulvanos como inductores de mecanismos de absorción de nitrógeno y de la síntesis de proteínas**

30 Prioridad:

30.03.2004 FR 0403267

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

04.11.2015

73 Titular/es:

**CENTRE MONDIAL D'INNOVATION (100.0%)
27 Avenue Franklin Roosevelt
35400 Saint-Malo, FR**

72 Inventor/es:

**BRIAND, XAVIER;
CLUZET, STÉPHANIE;
DUMAS, BERNARD;
ESQUERRE-TUGAYE, MARIE-THÉRÈSE y
SALAMAGNE, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 550 098 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

Utilización de ulvanos como inductores de mecanismos de absorción de nitrógeno y de la síntesis de proteínas.

5 La presente invención, que puede utilizarse en el ámbito agrícola, tiene esencialmente por objeto la utilización de ulvanos, concretamente extractos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o de oligosacáridos derivados de ulvanos, como inductores de los mecanismos de absorción de nitrógeno y de la síntesis de proteínas.

La presente invención también tiene por objeto composiciones fertilizantes tales como, por ejemplo, abonos que contienen estos ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos así como un procedimiento de tratamiento de las plantas o de los suelos que los utilizan.

10 En el marco de la presente descripción, se entiende designar mediante la expresión “composición fertilizante” cualquier producto cuyo empleo garantizará o mejorará las propiedades físicas, químicas o biológicas de los suelos, así como la nutrición de los vegetales.

Dicha composición puede ser, por ejemplo, un abono aplicado por vía radicular o por vía foliar.

15 Se sabe que los abonos se definen como materias fertilizantes cuya función principal es aportar a las plantas elementos directamente útiles para su nutrición (elementos fertilizantes principales, elementos fertilizantes secundarios y oligoelementos).

A tal efecto, los abonos radicales o foliares utilizan generalmente fuentes de nitrógeno, de fósforo y de potasio así como oligoelementos y aminoácidos.

Las plantas absorben principalmente el nitrógeno, que es un elemento nutritivo esencial para su crecimiento.

20 El nitrógeno es aportado generalmente en forma de nitrato o de amonio cuya utilización en gran cantidad plantea problemas en el plano ecológico.

Una de las posibles respuestas a los efectos indeseables de la fertilización con nitratos consiste en mejorar la eficacia de la absorción del nitrógeno y de su asimilación, es decir su incorporación en las moléculas orgánicas y concretamente en las proteínas.

25 Para ser absorbido por la planta, el nitrógeno mineral debe atravesar las paredes y las membranas celulares. El paso de la membrana, que rodea a la célula, constituye la etapa determinante del control por la planta de su nutrición mineral.

En esta fase, los mecanismos de entrada del nitrógeno en la planta están controlados por transportadores.

30 Posteriormente, el amonio procedente de la reducción del nitrato o absorbido directamente por las raíces o la hoja es integrado en las moléculas orgánicas para dar glutamina y glutamato. Estas dos reacciones son catalizadas por la glutamina sintasa y la glutamato sintetasa. Estas enzimas pueden ser consideradas, en ciertas condiciones, como factores limitantes de la asimilación del nitrógeno.

El amonio aparece, por lo tanto, como un intermedio esencial del metabolismo del nitrógeno de la planta.

35 Este nitrógeno es transferido a continuación a otras moléculas para formar los aminoácidos. El material carbonado constitutivo de los aminoácidos y la energía necesaria para el desarrollo de estas reacciones son suministrados por la fotosíntesis y la respiración.

La síntesis de aminoácidos tiene lugar principalmente en los cloroplastos. La asimilación del CO₂ proporciona el esqueleto carbonado necesario para la síntesis de aminoácidos.

40 A este nivel, diferentes enzimas como la enolasa, la citrato sintasa así como la isocitrato deshidrogenasa juegan un papel clave en la producción de los precursores de aminoácidos obtenidos a partir de la transformación del 3-fosfoglicerato producido durante la fotosíntesis.

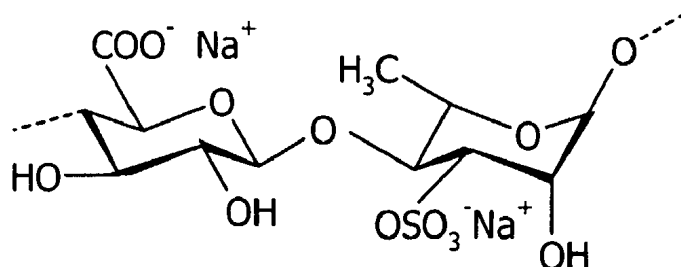
45 La triosafosfato isomerasa es responsable de la etapa de transformación del gliceraldehído fosfato en dihidroacetona fosfato. La dihidroacetona fosfato exportada del cloroplasto representa no solamente un importante precursor de la síntesis de azúcares sino también un metabolito de transporte para la energía y los equivalentes reductores. La dihidroacetona fosfato está a disposición para síntesis (sacarosa, proteosíntesis) o se transforma en 3 fosfo-D-glicerato transfiriendo su energía al ADP y su hidrógeno a la NAD⁺ necesarios para el metabolismo celular y concretamente para la síntesis de glutamina y glutamato.

50 Las peroxidasas son, por su parte, conocidas por su implicación en el crecimiento, mediante su actividad sobre la división celular. Las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa permiten de este modo mantener una fuerte actividad fotosintética garantizando una buena desintoxicación de los radicales libres producidos durante este proceso.

- 5 Es conocido que la síntesis o la actividad de los transportadores y de las diferentes enzimas implicadas en estos mecanismos pueden variar en respuesta a cierto número de señales, ya sean externas (luz, aporte de nitrógeno, sustancias químicas,...) o internas (ritmo circadiano). De este modo, para aumentar la capacidad de respuesta a la fertilización con nitrógeno en términos de absorción del nitrógeno mineral, de crecimiento y de producción de proteínas de una planta, una de las estrategias posibles consiste en estimular previamente las reacciones vinculadas a los metabolismos del nitrógeno y del carbono mediante la utilización de moléculas señal.
- 10 Las algas marinas constituyen un recurso vegetal abundante y se utilizan, desde hace mucho tiempo, en las regiones costeras como fertilizantes del suelo. La germinación de las semillas, la obtención de mejores rendimientos, una resistencia a las enfermedades, un periodo de conservación más largo de las frutas han quedado demostrados después de tratamientos de varias plantas con extractos de algas. Las conclusiones en materia de crecimiento y de salud de las plantas habían sido atribuidas esencialmente a la riqueza en betainas, en fitohormonas y en oligoelementos de las algas utilizadas.
- 15 La solicitud de patente europea nº 1 437 334 A1 (estado de la técnica dentro del marco del artículo 54(3) CBE) se refiere a un procedimiento de fabricación de un suplemento fertilizante en el que se obtiene un estimulante del crecimiento a partir de las algas *Ulva* y *Macrocystis* mediante acidificación de *Macrocystis* y digestión de la *Macrocystis* acidificada y de la *Ulva* con un agente alcalino.
- 20 El artículo de Fatima Bi et al., publicado en Pak. J. Bot, 31(1): 193-198, 1999 se refiere a preparaciones inductoras a base de *Codium elongatum*, *Calurpa texiflora* y *Ulva lactulus* obtenidas mediante extracción en medio acuoso neutro, básico y ácido seguida de una precipitación en etanol.
- 25 El artículo de B. Ray et al., publicado en Carbohydrate Research 274 (1995) 251-261 se refiere a la extracción secuencial de polisacárido del alga *Ulva rigida* con oxalato, una solución acuosa básica, clorato de sodio seguido de un tratamiento básico.
- El artículo de B. Ray et al., publicado en Carbohydrate Research 274 (1995) 313-318 se refiere a un estudio sobre la naturaleza de los enlaces polisacáridicos y sobre la situación de las funciones sulfato en fracciones de ulvanos obtenidas a partir del alga *Ulva rigida*.
- 30 El artículo de Marc Lahaye publicado en Carbohydrate Research 283 (1996) 161-173 se refiere a un estudio que pretende obtener información sobre la secuencia polisacáridica de polisacáridos procedentes del alga *Ulva rigida* mediante purificación de los polisacáridos mediante intercambios aniónicos y cromatografía de la fracción ulvano ácida de los ulvanos.
- 35 El artículo de B. Quemener et al., publicado en Journal of Applied Phycology 9, 179-188, 1997 se refiere a un estudio que pretende la determinación de la secuencia polisacáridica de los ulvanos optimizada mediante combinación de una prehidrólisis ácida parcial con una hidrólisis enzimática.
- 40 Es en este contexto que se ha descubierto, y esto constituye el fundamento de la presente invención, que los ulvanos, concretamente extractos de algas verdes y los oligosacáridos derivados de estos últimos permiten de forma absolutamente sorprendente e inesperada estimular la expresión de los genes del metabolismo del nitrógeno (transportador de amonio, nitrito reductasa, glutamato sintasa y glutamina sintetasa) así como ciertos genes del metabolismo del carbono, concretamente implicados en el aporte de material carbonado necesario para la síntesis de aminoácidos. Esta fuerte actividad metabólica es sostenida por una estimulación de los procesos de división celular (peroxidasa) y una buena actividad desintoxicante necesaria para el control de la sobreproducción de radicales libres generados por una fuerte actividad fotosintética.
- 45 Estos ulvanos pueden utilizarse, por lo tanto, de forma complementaria en composiciones fertilizantes, tales como abonos, como activadores de la absorción del nitrógeno mineral y de su asimilación en forma de proteínas.
- Dichas composiciones permiten una producción de nitrógeno orgánico aumentada que responde a las necesidades de crecimiento del cultivo, que se expresará concretamente en términos de mejora del rendimiento. Estas composiciones permiten también un aumento del contenido de proteínas y del valor nutricional de las plantas proteaginosas y de los piensos.
- 50 Estas composiciones permiten también reducir los riesgos de toxicidad provocada por una acumulación excesiva de iones amonio a nivel foliar o reducir las acumulaciones de nitratos en las hojas.
- De este modo, de acuerdo con un primer aspecto, la presente solicitud pretende abarcar la utilización de ulvanos, concretamente extractos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o de oligosacáridos derivados de ulvanos, como inductores de los mecanismos de absorción del nitrógeno y de la síntesis de proteínas.
- Los ulvanos útiles de acuerdo con la invención son polisacáridos hidrosolubles presentes, concretamente, en las paredes celulares de las algas verdes de los géneros *Ulva* y *Enteromorpha*.
- Los ulvanos se definen más exactamente como polisacáridos ácidos fuertemente sulfatados y están compuestos

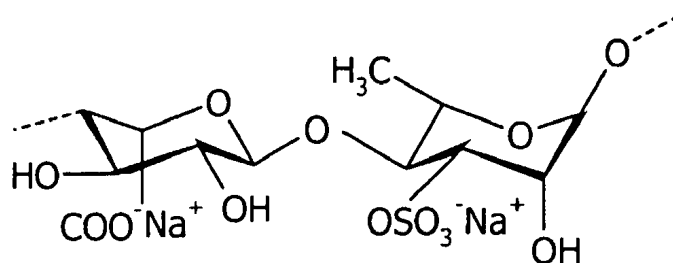
esencialmente por unidades derivadas de ramnosa 3-sulfato, de xilosa, de xilosa 2-sulfato, de ácido glucurónico y de ácido idurónico.

Las cuatro unidades recurrentes siguientes son, concretamente, características de los ulvanos:



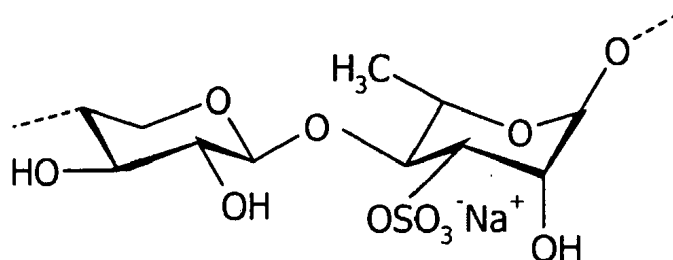
5 **>4)-β-D-GlcA-(1>4)-α-L-Rha 3 sulfato(1>**

(también llamado ácido ulvanobiourónico 3-sulfato tipo A)



>4)-α-L-IdoA-(1>4)-α-L-Rha 3 sulfato (1>

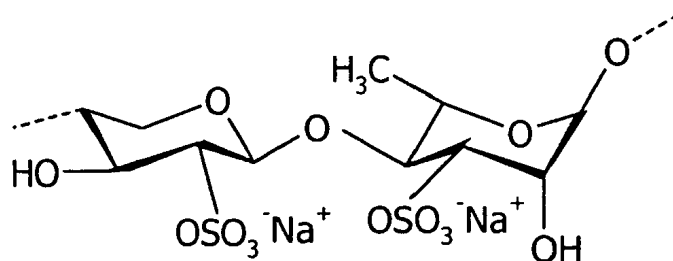
(también llamado ácido ulvanobiurónico 3-sulfato tipo B)



10

>4)-β-D-Xil-(1>4)-α-L-Rha 3 sulfato (1>

(también llamado ácido ulvanobiosa 3-sulfato)



>4)-β-D-Xil 2-sulfato-(1>4)-α-L-Rha 3 sulfato (1>

15 (también llamado ácido ulvanobiosa 2',3-disulfato)

Los ulvanos representan entre el 5 y 20% del peso seco del alga. Su peso molecular varía entre 90000 y 500000 g.mol⁻¹ en los géneros *Ulva* y *Enteromorpha*.

Ventajosamente, los ulvanos utilizados de acuerdo con la presente invención son extractos de algas seleccionadas entre el grupo constituido por las siguientes especies: *Ulva armoricana*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* y *Enteromorpha compressa*.

20

Pueden obtenerse extractos de algas ricos en ulvanos susceptibles de ser utilizados en el marco de la presente invención a partir de las especies de algas mencionadas anteriormente mediante un procedimiento que consta generalmente de las siguientes etapas: lavado, trituración, extracción (separación sólido-líquido) y eventualmente fraccionamiento y concentración.

5 El extracto obtenido puede estar más o menos concentrado de acuerdo con la utilización prevista. Puede obtenerse una deshidratación total de este extracto que permite una presentación en forma pulverulenta hidrosoluble, por ejemplo, mediante secador de tambor o mediante atomización.

Los oligosacáridos derivados de ulvanos susceptibles de ser utilizados en el marco de la invención pueden obtenerse mediante hidrólisis ácida o enzimática, a partir de los extractos mencionados anteriormente.

10 Las condiciones de extracción y la naturaleza de las algas se seleccionarán de modo que el extracto obtenido presente la concentración deseada en la aplicación prevista. Estas elecciones podrán ser realizadas fácilmente por el experto en la materia concretamente teniendo en cuenta las indicaciones generales a continuación.

15 De forma general, la cantidad de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos aportada a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro y, preferentemente, del orden de 1 g por litro para los aportes en forma líquida foliares o en las soluciones nutritivas radiculares (hidroponía, gota a gota,...) o bien también de 10 a 1000 g/ha y preferentemente del orden de 200 g/ha para los aportes en forma sólida en los abonos pulverulentos o granulados.

20 La cantidad de ulvanos aportada a las plantas debe ser suficiente para estimular la expresión de los genes implicados en la inducción de los mecanismos de absorción del nitrógeno y de la síntesis de proteínas. Esta cantidad es variable de acuerdo con la naturaleza de la planta a tratar y el modo de tratamiento (vía foliar o vía radicular). Esta cantidad podrá determinarse concretamente caso por caso mediante la realización de pruebas con macromatrices ("macroarrays") tal como se definen a continuación.

25 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente solicitud pretende proteger un procedimiento de tratamiento de las plantas o de los suelos que activará las reacciones de inducción de los mecanismos de absorción del nitrógeno y de la síntesis de proteínas, caracterizado porque comprende la aplicación a dichas plantas o a los suelos de una cantidad eficaz de ulvanos, concretamente extractos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o de oligosacáridos derivados de ulvanos.

Ventajosamente, la aplicación a las plantas se realizará por vía foliar o por vía radicular.

30 La cantidad eficaz de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos aportada a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro y preferentemente del orden de 1 g por litro para los aportes en forma líquida foliares o en las soluciones nutritivas radiculares (hidroponía, gota a gota,...) o bien también de 10 a 1000 g/ha y preferentemente del orden de 200 g/ha para los aportes en forma sólida en los abonos pulverulentos o granulados.

A modo de ejemplos de productos fertilizantes de acuerdo con la invención, se mencionarán las enmiendas calcáreas, las enmiendas orgánicas y los soportes de cultivo, los abonos radiculares de tipo NP, PK, NPK, etc., los abonos foliares o también las soluciones nutritivas radiculares.

35 Las sustancias fertilizantes susceptibles de ser utilizadas en asociación con los ulvanos o los oligosacáridos derivados de ulvanos pueden ser de naturalezas variadas y seleccionarse, por ejemplo, entre urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio, fosfato natural, cloruro de potasio, sulfato de amonio, nitrato de magnesio, nitrato de manganeso, nitrato de zinc, nitrato de cobre, ácido fosfórico y ácido bórico.

La presente invención puede utilizarse en el tratamiento de una muy grande variedad de plantas.

40 Entre éstas, se mencionará en particular:

- las plantas de cultivo generalizado tales como los cereales (trigo, maíz),
- las proteaginosas (guisante),
- las oleaginosas (soja, girasol),
- las plantas pradales útiles para la alimentación animal,

45 - los cultivos especializados tales como en particular los cultivos de huerta (lechuga, espinacas, tomate, melón), la viña, la arboricultura (pera, manzana, nectarina), o la horticultura (rosales).

Por la expresión "planta" se entiende designar en la presente solicitud la planta considerada en su conjunto, incluyendo su aparato radicular, su aparato vegetativo, los granos, semillas y frutos.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

En estos ejemplos, y a menos que se indique lo contrario, los porcentajes se expresan en peso y la temperatura es la temperatura ambiente.

EJEMPLO 1- Procedimiento de preparación de un extracto de alga rico en ulvanos utilizable en el marco de la invención

5 **A - Descripción general**

a) Preparación de ulvanos

La fracción de ulvanos se obtiene mediante extracción acuosa de algas frescas (100 g de algas frescas por litro de agua).

10 La extracción se realiza en agitación a 90°C, durante 2 horas. El extracto se filtra a continuación en una membrana (80 µm de porosidad). El disolvente (agua) se evapora para obtener un polvo hidrosoluble.

b) Preparación de oligoulvanos

Los ulvanos preparados como se ha indicado en a) anteriormente son hidrolizados en 1 litro de solución ácida (ácido tricloroacético o ácido clorhídrico concentrado a 2-3 mol l⁻¹) a 100°C durante 30 minutos a 1 h, preferentemente del orden de 40 minutos.

15 Se han identificado ácido glucurónico, ácido aldobiurónico, ulvanobiouronato y ácido idurónico en los productos de hidrólisis.

B. Ejemplo detallado de extracción:

Un extracto de *Ulva armoricana* enriquecido en ulvanos y, en particular, en derivados de ácido idurónico de tipo xiloiduroramnano se obtuvo siguiendo el siguiente protocolo experimental:

20 a) Lavado

Algas frescas de tipo *Ulva armoricana* son sometidas a dos lavados sucesivos en un tanque con agua para eliminar la arena y la gravilla.

Las algas se depositan a continuación en cestas con malla de acero inoxidable antes de ser introducidas en tanques donde se recubren con agua.

25 Una agitación mediante boquillas de aireación permite mantener a las algas en suspensión favoreciendo de este modo la decantación de las impurezas.

b) Trituración

Las algas, lavadas de este modo, son escurridas y a continuación trituradas en trozos de 1 a 10 mm.

c) Extracción

30 1000 kg de algas se dispersan en un reactor calentador que contiene 10000 kg de una solución acuosa llevada a una temperatura de 90°C. El conjunto se mantiene a esta temperatura durante un periodo de aproximadamente 2 horas.

35 Previamente a la extracción, las células algales ya trituradas se someten a micro-rotura por medio de un homogeneizador de tipo ULTRA-TURAX® para favorecer la extracción. La operación de separación tiene lugar al cabo de las 2 horas de extracción.

d) Separación

La fracción soluble, rica en derivados de ácido idurónico de tipo xiloiduroramnano, se separa de los restos de algas por centrifugado (separación sólido-líquido).

40 El extracto centrifugado es filtrado a continuación, en un filtro de tierra de diatomeas, o en un filtro de placas, a continuación de nuevo filtrado en una membrana hasta 1 µm.

El filtrado obtenido de este modo comprende entre el 0,1 y el 1% en peso de extracto seco.

El extracto preparado de este modo puede utilizarse en una forma más o menos concentrada, estando la concentración final determinada en función del contenido buscado de derivados activos en la aplicación prevista.

45 De este modo, el filtrado mencionado anteriormente puede estar concentrado, por ejemplo, por medio de un evaporador de película descendente, en forma que el extracto seco represente del 10 al 60 % en peso de éste.

También puede obtenerse una deshidratación total, por ejemplo, mediante secador de tambor o mediante atomización cuando se busca una presentación en forma pulverulenta hidrosoluble.

Procediendo como se ha descrito anteriormente, se prepararon diversos extractos a partir de seis especies de algas verdes de los géneros *Ulva* o *Enteromorpha*. La composición de estos extractos secos se presenta en las tablas 1A y 1B a continuación.

5

TABLA 1A: Composición de los extractos de algas verdes

Alga	% de ulvanos (% del peso seco del alga)	% de azúcares totales	% de sulfatos	% de proteínas
<i>Ulva armoricana</i>	7-15	50-80	10-20	3-7
<i>Ulva rigida</i>	5-18	50-80	13-17	1-10
<i>Ulva rotundata</i>	6-15	50-70	10-20	1-10
<i>Ulva lactuca</i>	5-17	50-70	10-20	1-8
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	5-15	45-75	15-20	1-10
<i>Enteromorpha compressa</i>	5-16	50-75	10-20	1-12

TABLA 1B: Composición en osas y en ácidos urónicos de los extractos de algas verdes

Alga	Rha	Gal	Glc	Xyl	GlcA	IdoA
<i>Ulva armoricana</i>	45-50	1-4	5-20	6-15	15-25	5-15
<i>Ulva rigida</i>	50-60	0,5-2	5-8	5-15	18-35	2-5
<i>Ulva rotundata</i>	45-55	1-3	5-15	5-25	16-30	0,5-5
<i>Ulva lactuca</i>	45-60	0,5-5	2-6	1-10	15-25	2-5
<i>Enteromorpha compressa</i>	25-50	1-5	2-10	5-15	10-20	5-10
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	30-50	1-4	1-5	6-15	15-20	5-10

10 EJEMPLO 2

A - Efectos de los ulvanos sobre la expresión de los genes de una planta modelo

Se realizó un análisis global de la expresión de numerosos genes implicados en la defensa de una planta modelo recurriendo a las técnicas de genómica funcional. La leguminosa *Medicago truncatula* (número importante de secuencias de ADN disponibles) se utilizó como planta modelo.

15 De este modo se estudió el efecto de los ulvanos sobre más de 25 genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y del carbono, así como en los procesos oxidativos vinculados a la división celular de esta planta modelo mediante análisis de macromatriz "macroarray".

a) Material biológico

20 Se cultivan plantas de *Medicago truncatula* estirpe F83 005.5 en un entorno controlado (16 h/8 h, 20°C/15°C, 60% de humedad).

Los productos estudiados fueron aportados, por vía foliar o por vía radicular.

En el caso del aporte foliar, las diferentes soluciones de inductores se pulverizan sobre las hojas de las plantas de 1 mes de edad a la concentración de 1 mg/ml.

En el caso del aporte radicular los productos se introducen en el medio nutritivo.

El estudio de la expresión global de los genes potencialmente implicados en el metabolismo y en la señalización continuó mediante macromatriz “*macroarray*”.

b) Preparación de macromatrices (“*macroarrays*”)

5 Se realiza una selección de etiquetas de genes expresados (EST) de *Medicago truncatula* basada esencialmente en sus implicaciones en el metabolismo primario utilizando las bases de datos TGIR y MENS.

EST que pertenecen a las secuencias de *Medicago truncatula* [secuencias consenso provisionales (TC)] son recuperadas de las bibliotecas MtBA, MtBB y MtBC.

10 Dos fragmentos genómicos (TC85619, TC85808) son amplificados por PCR utilizando el ADN genómico de *Medicago truncatula* como cebador. Estas dos 2 EST son clonadas a continuación en vector pGEM-Teasy (Promega) y verificadas por secuenciación.

Los otros fragmentos de ADN son amplificados por PCR utilizando los cebadores universales complementarios a las secuencias vectores que enmarcan al sitio de clonación de los ADN. Los productos de amplificación son analizados por electroforesis y se ajustan a 0,2-0,5 µg/µl con DMSO (50%) y se depositan sobre una membrana con ayuda de un robot (*Eurogridder spotting robot*).

15 **c) Resultados**

La actividad de los ulvanos de algas de acuerdo con el ejemplo 1 se estudió siguiendo la expresión, de forma simultánea, de una treintena de genes. Las diferentes categorías de EST seleccionadas se clasifican por familia: metabolismo del nitrógeno, metabolismo del carbono y procesos oxidativos.

20 Los extractos de algas verdes ricos en ulvanos conllevan la inducción de 5 a 7 genes potencialmente implicados en el metabolismo primario. Se obtienen respuestas similares para los 2 tipos de aporte, es decir foliar y radicular. La inducción de los genes es más importante para los ulvanos ricos en derivados de ácido xilodurorramnano, como por ejemplo los ulvanos de *Ulva armoricana* y de *Enteromorpha intestinalis*. Los oligoulvanos obtenidos después de hidrólisis presentan resultados idénticos.

TABLA 2C: Efectos de los ulvanos de diferentes algas verdes sobre la expresión de ciertos genes en macromatrices

Familia de genes	Número de TC ¹	Ulva						Enteromorpha		
		U. armoricana ²		U. rigida	U. rotundata	U. lactuca	E. compressa	E. intestinalis		
		Ulvanos	Oligoulvanos							
Procesos oxidativos	8	2	2	2	2	1	2	1		
Metabolismo del nitrógeno	6	2	2	1	1	1	1	2		
Metabolismo del carbono	19	3	3	2	4	3	3	3		
Total	33	7	7	5	7	5	6	6		

¹ Los valores corresponden al número de TC (TIGR Secuencia Consenso Provisional) en cada familia de genes.

² Los valores son medias de 3 tratamientos independientes que corresponden al número de genes.

d) Influencia del número de tratamientos sobre la sensibilización de la planta

Se realizó una segunda serie de experimentos para evaluar el efecto de la sensibilización de la planta tratada con el extracto de *Ulva armoricana*. El efecto de un segundo tratamiento con el extracto de *Ulva armoricana*, 3 días después de la primera pulverización, se evaluó de este modo. Los efectos sobre la expresión de los genes se estudian mediante macromatriz.

Los tratamientos en uno o dos aportes inducen la expresión de un gran número de genes implicados en los metabolismos primario y de señalización. Los tratamientos inducen la expresión de genes en todas las categorías funcionales.

En el caso del metabolismo del nitrógeno, un tratamiento único permite estimular la expresión de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa. Un doble tratamiento permite doblar el número de genes expresados con concretamente una sobreexpresión de los genes que codifican el transportador de amonio, la nitrito reductasa, la glutamato sintasa y la glutamina sintetasa.

En el caso del metabolismo del carbono, un tratamiento único permite estimular los genes que codifican la enolasa, la triosafosfato isomerasa y la isocitrato deshidrogenasa. Un doble tratamiento induce la sobreexpresión de los genes que codifican la enolasa fosfatasa y la citrato sintasa.

En el caso de los procesos oxidativos, se observa la inducción de la expresión de diferentes genes que codifican diferentes enzimas: ascorbato peroxidasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o glutatión S-transferasa.

TABLA 2D: Efectos de los ulvanos de *Ulva armoricana* sobre la expresión de ciertos genes en macromatrices

			Tratamiento ^a					
TC TIGR ^b	Función putativa	Entrada en el GB ^c	AV ^d			AV+AV ^e		
			1	2	3	1	2	3
Procesos oxidativos								
TC76384	ascorbato peroxidasa	AL367369	1,60	2,40	1,00	0,90	0,74	NS
TC85974	peroxidasa	AL371851	1,05	1,46	NS	2,77	5,38	2,69
TC76946	superóxido dismutasa	AL375556	2,49	3,12	1,00	1,40	NS	1,00
TC86106	glutatión peroxidasa	AL374155	0,88	1,43	1,40	NS	2,08	1,90
TC85451	glutatión S-transferasa	AL368847	1,00	1,16	1,00	1,15	1,55	3,01
TC87485	similar a una germina	AL373691	NS	1,32	1,10	1,16	NS	NS
Vía de los azúcares								
TC77339	enolasa-fosfatasa	AL378849	1,00	0,93	NS	NS	1,79	2,09
TC85317	enolasa	AL367711	1,93	1,75	1,43	NS	0,96	NS
TC85485	transcetolasa	AL373090	1,00	1,00	1,00	1,00	NS	1,00
TC85539	triosafosfato isomerasa	AL365666	1,61	1,47	1,61	0,94	1,23	NS
TC85625	isocitrato deshidrogenasa	AL368524	1,07	2,67	1,70	0,87	1,07	1,44
TC85966	citrato sintasa	AL374303	1,00	NS	NS	1,59	2,44	2,24

Vía del nitrógeno								
TC76943	glutamina sintetasa	AL366171	2,19	4,33	4,06	2,88	2,82	0,94
TC77277	nitrito reductasa		0,84	NS	0,83	3,56	2,20	2,34
TC77553	glutamato sintasa	AL366890	0,92	0,74	0,82	NS	2,28	1,97
TC86604	glutamato deshidrogenasa	AL372216	1,00	1,51	2,21	1,00	NS	NS
TC87190	Transportador de amonio	AL370643	1,47	1,07	NS	NS	2,09	2,54

a: Valores que corresponden a las relaciones de "intensidades de las señales de las plantas tratadas con el extracto de *Ulva* (AV)" respecto a "intensidades de las señales de las plantas de control". Solamente se incluyen los géneros inducidos (relación>1,5) en al menos dos experimentos independientes. Durante la comparación de los replicados de los tres experimentos, se considera que la relación de un solo gen no debe estar inducida en un replicado y reprimida en al menos uno de los otros, en caso contrario se considera como no significativo (NS).

b: TC TIGR, número de consenso provisional de acuerdo con *The Institute of Genome Research*.

c: GB, número de entrada en el Genebank.

d: AV, un solo tratamiento AV.

e: AV+AV, dos tratamientos AV consecutivos.

EJEMPLO 3 - Efectos de los ulvanos sobre la absorción del nitrógeno mineral

El experimento se efectúa en trigo. El extracto de ulvanos es aportado al suelo a razón de 100 y 200 g/ha o por vía foliar a razón de 0,1 y 1 g por litro al mismo tiempo que una fertilización nitrogenada (nitrato de amonio).

5 El corte de los trigos y el prensado de la parte baja del tallo se realizaron el mismo día, en fase de emergencia de espigas - comienzo de la salida de los estambres, una semana después de la aplicación. La dosificación del nitrógeno mineral se efectúa en el zumo de savia.

10 El conjunto de los tratamientos foliares o en el suelo muestra un efecto significativo sobre la absorción del nitrógeno mineral y confirma el efecto estimulante sobre los genes implicados en el transporte del nitrógeno y, concretamente, del amonio.

TABLA 3: Efectos de los ulvanos sobre la absorción de nitrógeno mineral

	Concentración de ulvanos	Absorción de nitrógeno mineral
		(en % del control)
Suelo	100 g /ha	+ 12 %
	200 g /ha	+ 24 %
Vía foliar	0,1 g /l	+ 18 %
	1 g /l	+ 32 %

EJEMPLO 4 - Efectos de los ulvanos sobre la producción de proteínas

15 El experimento se realizó en guisante forrajero variedad Solara y en maíz variedad Sabrina. Las plantas se cultivan en macetas sobre vermiculita en un medio nutritivo de Hoagland.

El extracto de ulvanos se incorpora a la solución nutritiva antes de la siembra a la dosis de 200 g/ha o se aplica mediante pulverización foliar a la dosis de 1 g por litro. Los cultivos se llevan a cabo durante 4 semanas para el

guisante y 6 semanas para el maíz. En esta fase, se determinan el contenido y la cantidad de proteínas producidas por los aparatos radicular y foliar.

5 En el caso del aporte radicular, se observa un aumento del contenido de proteínas radiculares del 16% para el guisante y del 18% para el maíz. La mejora de la tasa de proteínas radiculares conjuntamente con la estimulación de la biomasa radicular conlleva un aumento de la cantidad total de proteínas radiculares producidas por cada planta: 27% para el guisante y 31% para el maíz. Al mismo tiempo, la tasa de proteínas foliares aumenta un 12%, para los 2 cultivos.

En el caso del aporte foliar, el aumento de la tasa de proteínas es delo 15% para el guisante y del 16% para el maíz.

Tabla 4: Efectos de los ulvanos sobre la producción de proteínas

Cultivos	Tipo de aporte	Tasa de proteínas radiculares (en % del control)	Tasa de proteínas foliares (en % del control)
Guisante	Suelo	+ 16 %	+ 12 %
	Pulverización foliar	-	+ 15 %
Maíz	Suelo	+18%	+ 12 %
	Pulverización foliar	-	+ 16 %

10

EJEMPLO 5 - Efectos de los ulvanos sobre la valorización de las reservas de nitrógeno del suelo así como sobre la eficacia de la fertilización nitrogenada.

El ensayo se realiza en maíz de la variedad Sabrina.

Los derivados de ulvanos se aplican al suelo (200 g/ha) o en pulverización foliar (1 g por litro) en vegetación.

15 La acción del producto se estudia por un lado en situación óptima (N = 180 U) y, por lo tanto, en situación desfavorable (ausencia de fertilización nitrogenada).

El dispositivo experimental comprende modalidades con 4 repeticiones.

20 Cada parcela elemental está constituida por 6 hileras de 12 m, con cosecha de las 2 hileras centrales. Para las parcelas que se benefician de una fertilización nitrogenada, el aporte se realiza en forma de urea en el momento de la labranza (60 U) y en la fase con 8 hojas (120 U).

Los tratamientos radicular y foliar se aplican aproximadamente 1 mes después de la siembra, en la fase de 5-6 hojas.

Los controles efectuados en los lotes de control y tratados se realizan en los elementos de rendimiento.

25 Tabla 5: Efectos de los ulvanos sobre la expresión del rendimiento del maíz, cultivado en condiciones limitantes de nitrógeno.

Unidades de nitrógeno / ha	Tratamiento	Rendimiento al 15%		
		q/ha	Variación / control	
			q/ha	%
Dosis 0	Control	109,45		
	Ulvanos en el suelo	121,80	+ 2,35	+ 11%
	Ulvanos foliares	130,57	+ 21,12	+ 20%
Dosis 180	Control	139,65		
	Ulvanos en el suelo	144,99	+ 5,34	+ 4%
	Ulvanos foliares	149,43	+ 9,78	+ 7%

Los tratamientos con ulvanos permiten una mejora de los rendimientos sea cual sea la modalidad.

En el caso del aporte a 180 U, el rendimiento pasa de 139,65 q/ha (quintales por hectárea) para el control a 144,99 q/ha para el aporte radicular, es decir un aumento del rendimiento de más de 5 q/ha.

En el caso del aporte foliar, la ganancia se eleva a más de 9 q/ha es decir un aumento del 7% del rendimiento.

- 5 Una situación más desfavorable en nitrógeno favorece la expresión de los tratamientos con ulvanos en favor del rendimiento. El diferencial se vuelve entonces importante con un rendimiento que pasa de 109,45 q/ha para el control a 121,8 q/ha para el aporte radicular, es decir una ganancia de 12,35 q/ha. Esta ganancia corresponde, de este modo, a una progresión de más del 11% del rendimiento. En el caso del aporte foliar, la ganancia se eleva a más de 21,12 q/ha, es decir un aumento del 20% del rendimiento.
- 10 Los tratamientos con ulvanos permiten, de este modo, reducir los efectos depresivos de una situación desfavorable en nitrógeno. La ausencia de fertilización conlleva una caída del rendimiento de 30 q/ha entre los controles, mientras que ésta es solamente de 9 q/ha entre el maíz tratado (aporte foliar en ausencia de fertilización nitrogenada) y el control fertilizado (180 U).

EJEMPLO 6 - Efectos de los ulvanos sobre la reducción de la acumulación de nitratos en las hojas

- 15 Se realiza un cultivo de lechuga en vermiculita con un aporte de solución nitrogenada que conlleva la acumulación de los nitratos en las hojas.

En la fase de 4 hojas, las plántulas se trasplantadas a macetas que contienen vermiculita empapada con una solución nutritiva y con nitratos (20 meq N/l).

- 20 En el caso del tratamiento foliar, los ulvanos son pulverizados sobre las plantas 5 días y 10 días después del trasplante.

En el caso del tratamiento en el suelo, los ulvanos se añaden directamente a la solución nutritiva.

El análisis de las hojas en nitratos se realiza 20 días después del trasplante.

Tabla 6: Efectos de los ulvanos sobre la reducción de la acumulación de nitratos en las hojas

	Dosis	Reducción de la acumulación de NO ₃ ⁻ en la hoja
Aporte foliar	0,1 g/l	- 12 %
	1 g/l	- 34 %
	10 g/l	- 36 %
Aporte al suelo	10 g/ha	- 6 %
	100 g/ha	- 18 %
	1000 g/ha	- 20 %

- 25 El conjunto de los tratamientos con el extracto de ulvanos conlleva una reducción de la acumulación de nitratos en las hojas de lechuga. Ésta varía del 12 al 36% en el caso del tratamiento foliar y del 6 al 20% en el caso del aporte al suelo.

EJEMPLO 7 - Ejemplos de formulaciones que incorporan ulvanos

- 30 Se proporcionarán a continuación, a modo de ejemplos, diversas formulaciones utilizables de acuerdo con la invención con indicaciones sobre las condiciones de empleo de estas formulaciones.

A - ENMIENDAS

a) ENMIENDA CALCÁREA

Litotamnio	1000 kg
Derivados de ulvanos	QSP 200 g/ha

ES 2 550 098 T3

Dosis de aporte: 1 T/ha

Carbonato de calcio 1000 kg

Derivados de ulvanos QSP 1000 g/ha

Dosis de aporte : 1 T/ha

b) ENMIENDA ORGÁNICA Y SOPORTES DE CULTIVO

Mantillo 500 kg

Turba 500 kg

Derivados de ulvanos QSP 500 g/ha

Dosis de aporte : 1T/ha

B - ABONOS RADICULARES

a) ABONOS NP

Litotamnio 310 kg

Cloruro de potasio 167 kg

Urea 161 kg

Sulfato de amoníaco 362 kg

Derivados de ulvanos QSP 200 g/ha

CULTIVOS	DOSIS DE APORTE (kg/ha)
Pastos	200 - 400
Cereales	
Maíz	

5

b) ABONOS NPK + MgO

Litotamnio 158 kg

Fosfato de amoníaco 116 kg

Sulfato de amoníaco 186 kg

Urea 156 kg

Óxido de magnesio 50 kg

Cloruro de potasio 334 kg

Derivados de ulvanos QSP 1000 g/ha

CULTIVOS	DOSIS DE APORTE (kg/ha)
Maíz	400 - 800
Cereales	
Praderas	
Todos los cultivos	

C - ABONOS FOLIARES

a) SOLUCIÓN Mg

5

Nitrato de magnesio 50 kg

Agua 50 kg

Derivados de ulvanos QSP 1 g/l (solución final aplicada sobre la planta)

CULTIVOS	Número de aportes en diferentes fases de la campaña	Dosis por aporte
Huertos	3 - 6	8 l/ha
Cultivos de la huerta	2 - 6	5 - 8 l/ha

b) SOLUCIÓN N Fe Mn

Nitrato de manganeso 15 kg

Cloruro férrico 25 kg

Agua 60 kg

Derivados de ulvanos QSP 0,1 g/l (solución final aplicada sobre la planta)

CULTIVOS	Número de tratamientos	Dosis por tratamiento
Huertos	4 - 6	3 - 6 l/ha
Cultivos de la huerta	4 - 6	3 - 6 l/ha

10

ES 2 550 098 T3

c) SOLUCIÓN N Mn Zn

Nitrato de manganeso 31 kg

Nitrato de zinc 22 kg

Agua 47 kg

Derivados de ulvanos QSP 10 g/l (solución final aplicada sobre la planta)

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aporte
Maíz	1 - 2	4 - 8 l/ha
Lino	1 - 2	4 - 8 l/ha
Remolacha	1 - 3	4 - 8 l/ha
Soja	1 - 2	4 - 8 l/ha
Patata	1 - 3	4 - 8 l/ha
Habichuelas	2 - 3	4 - 8 l/ha

5 d) SOLUCIÓN NPK Oligoelementos

Urea 17 kg

Ácido fosfórico 9 kg

Potasa 9 kg

Nitrato de manganeso 0,7 kg

Nitrato de zinc 0,3 kg

Nitrato de cobre 0,10 kg

Cloruro férrico 0,20 kg

Ácido bórico 0,4 kg

Agua 63,3 kg

Derivados de ulvanos QSP 1 g/l (solución final aplicada sobre la planta)

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aporte
Cultivos de la huerta	5 - 10	4 - 6 l/ha
Huertos	4 - 6	4 - 6 l/ha

e) SOLUCIÓN B P K

Potasa	8 kg
Ácido fosfórico	1 kg
Ácido bórico	1 kg
Agua	90 kg

Derivados de ulvanos QSP 10 g/l (solución final aplicada sobre la planta)

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aporte
Cultivos de la huerta	2 - 4	3 - 5 l/ha
Cultivos frutícolas	3	5 l/ha

D-SOLUCIONES NUTRITIVAS RADICULARES (HIDROPONÍA, GOTA A GOTA)

5 a) SOLUCIÓN NPK Mg

Nitrato de potasio	50 g/l
Fosfato de potasio	27 g/l
Sulfate de magnesio	49 g/l
Derivados de ulvanos	200 g/l (es decir 1g/l de solución final aplicada sobre la planta)
Dilución 1 l para 200 l de agua	

b) SOLUCIÓN N Ca Mg

Nitrato de calcio	118 g/l
Quelato de hierro	5 g/l
Derivados de ulvanos	100 g/l (es decir 0,5 g/l de solución final aplicada sobre la planta)
Dilución 1 l para 200 l de agua	

REIVINDICACIONES

1. Utilización de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos, como inductores de los mecanismos de absorción de nitrógeno y de síntesis de proteínas.
- 5 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** los ulvanos mencionados anteriormente son extractos de algas seleccionados entre el grupo constituido por las siguientes especies: *Ulva armoricana*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* y *Enteromorpha compressa*.
3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** los extractos mencionados anteriormente se obtienen mediante un procedimiento que consta de las siguientes etapas: lavado, trituración, extracción (separación sólido-líquido).
- 10 4. Utilización de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** el procedimiento mencionado anteriormente consta de las siguientes etapas suplementarias: fraccionamiento, concentración y deshidratación.
5. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** los oligosacáridos derivados de ulvanos mencionados anteriormente se obtienen mediante hidrólisis ácida o enzimática.
- 15 6. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** los ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos son aportados a las plantas:
- en forma líquida por vía foliar o en soluciones nutritivas radiculares en una cantidad de 0,1 a 100 g por litro,
 - o en forma sólida en una cantidad de 10 a 1000 g por hectárea.
- 20 7. Procedimiento para mejorar la absorción de nitrógeno y la síntesis de proteínas de las plantas, **caracterizado porque** comprende la aplicación a dichas plantas o a los suelos, de una cantidad eficaz de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** la aplicación a las plantas se realiza por vía foliar o por vía radicular.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, **caracterizado porque** los ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos mencionados anteriormente se utilizan en una cantidad:
- 25
- de 0,1 a 100 g por litro para los aportes en forma líquida por vía foliar o en soluciones nutritivas radiculares,
 - de 10 a 1000 g por hectárea para los aportes en forma sólida.
10. Producto fertilizante, **caracterizado porque** comprende una cantidad eficaz de al menos un ulvano, o un oligosacárido derivado de ulvano **obtenidos mediante hidrólisis ácida o enzimática de dicho al menos un ulvano**, en asociación con una o varias materias fertilizantes.
- 30 11. Producto fertilizante de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** se presenta:
- en forma líquida y **porque** contiene una cantidad de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos de 0,1 a 100 g por litro;
 - o en forma sólida y **porque** contiene una cantidad de ulvanos o de oligosacáridos derivados de ulvanos que permite un aporte de 10 a 1000 g por hectárea.
- 35