

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 227**

51 Int. Cl.:

A01N 65/08 (2009.01)

A01P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11741629 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2587924**

54 Título: **Uso de un extracto natural de bagazo de uva para estimular las defensas naturales de las plantas**

30 Prioridad:

02.07.2010 FR 1055397

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL - CLERMONT-
FERRAND II (33.3%) y**

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**RICHARD, CLAIRE;
TER HALLE, ALEXANDRA;
GOUPIL, PASCALE;
LEDOIGT, GÉRARD;
EYHERAGUIBEL, BORIS y
THIERY, DENIS**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 554 227 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

Uso de un extracto natural de bagazo de uva para estimular las defensas naturales de las plantas

5 Estado de la técnica

El aumento de los rendimientos constituye el centro de las preocupaciones de los agricultores. Sin embargo, el rendimiento depende enormemente del buen desarrollo de la planta y, por tanto, de su crecimiento, así como de su buena salud.

10 El crecimiento de las plantas está directamente unido a la absorción y a la asimilación de los elementos minerales, así como a los flujos hormonales que regulan la elongación y la diferenciación de los tejidos vegetales. Por consiguiente, los nutrientes y las hormonas desempeñan un papel esencial en el crecimiento de las plantas. Debido a su incapacidad para moverse, las plantas han desarrollado mecanismos activos, y mecanismos que se pueden
15 activar, que les permiten utilizar lo mejor posible los recursos presentes para favorecer su crecimiento. A fin de aumentar este crecimiento, se usan fertilizantes. También es posible usar otras moléculas, con frecuencia, glucídicas, extraídas de algas para favorecer el crecimiento.

20 La integridad de las plantas es igualmente una condición indispensable para asegurar el rendimiento. No obstante, las plantas están sometidas continuamente al ataque de microorganismos patógenos. Establecer defensas es, por tanto, un elemento determinante en la eficacia de la resistencia.

De modo convencional, se usan a gran escala productos fitofarmacéuticos potencialmente tóxicos para luchar contra el ataque de los patógenos.

25 Los productos que proceden de la industria agro-farmacéutica (fungicidas, insecticidas) comercializados por las empresas agroquímicas presentan un impacto importante para el medio ambiente con toxicidades potenciales para el hombre.

30 La inducción artificial de los mecanismos de defensa de las plantas contra los parásitos constituye el centro de numerosas investigaciones. La primera vía de investigación ha consistido en encontrar moléculas que imiten la acción del ácido salicílico capaz de inducir por sí mismo una inmunidad si bien es tolerado insuficientemente por determinadas plantas. Se ha desarrollado un análogo químico del ácido salicílico, el INA (o ácido 2,6-dicloroisonicotínico) y otros inductores de la síntesis: el benzotiadiazol (BTH comercializado por la empresa
35 SYNGENTA con el nombre comercial BION[®]) y el ácido β -aminobutírico (BABA[®]-Sigma Aldrich) mejor tolerados por las plantas de cultivo.

La segunda vía ha consistido en buscar moléculas naturales (oligosacáridos, proteínas enzimáticas, polipéptidos) capaces de inducir por sí mismas los mecanismos de defensa de las plantas.

40 Extractos fúngicos obtenidos de *Fusarium* (WO/2002/24869) y de *Trichoderma* (WO/2006/129998) han mostrado propiedades de estimulación de las defensas naturales de las plantas.

45 Los extractos de microorganismos obtenidos de *Erwinia* (WO/1998/37752, WO/1999/07206), de *Xanthomonas* (WO/2000/20616), de *Agrobacterium* (WO/2000/28056), de *Cladosporium* (WO/2002/02787), de bacterias Gram+ (WO/1999/11133), de *Pseudomonas* (WO/1999/07207, WO/2003/068912) presentan la capacidad de inducir las defensas naturales de las plantas (Varnier 2009). Los extractos de insectos y de crustáceos que contienen β -1,3-glucanos (quitosano) han mostrado propiedades de estimulación de las defensas naturales de las plantas (Klarzynski 2000). La formulación ELEXA[®] (SAFE SCIENCE), cuyo principio activo es el quitosano, se comercializa
50 como inductor (Sharathchandra 2004).

Los extractos de levadura presentan propiedades de estimulación de las defensas naturales de las plantas (A1/2009/0010905).

55 Los extractos de algas pardas que contienen un oligosacárido denominado laminarina inducen las reacciones de defensa de las plantas (Aziz 2003, EP 1338200 y WO/2005/082150). La empresa GOEMAR comercializa las formulaciones "Iodus[®] 2 cereales" y "Iodus[®] 2 cultivos especializados" cuyo principio activo es la laminarina.

60 Numerosos extractos de plantas presentan propiedades de estimulación de las defensas. Los extractos de semilla de alholva (*Trigonella foenum greacum*) permiten activar las reacciones de defensa (WO02102162 y WO0410786). La formulación STIFENIA (SOFT) se comercializa como inductor natural.

65 Los extractos acuosos de hojas de *neem* (*Azadirachta indica* Juss) que contienen tetranortriterpenoides (Paul 2002), extractos etanólicos de hojas de sanguinaria mayor (*Reynoutria sachalinensis*) (Daayf 1997; Randoux 2006), extractos de hojas de buganvilla (Narwal 2000), de ruibarbo y de espinaca (Doubrava 1988) han mostrado un efecto inductor de las reacciones de defensa de la planta. La formulación MILSANA (SCHAETTE) que contiene extractos

de sanguinaria mayor se comercializa como inductor natural. El documento WO/2003/086079 describe el uso de un extracto etanólico de hojas de vid.

Los extractos de raíz de ruibarbo (*Rheum palmatum*) y de corteza de avellanillo (*Frangula alnus*) presentan un potencial de inducción de los mecanismos de defensa de la vid (Godard 2009).

5 Otras formulaciones a base de extractos de plantas están a la espera de una autorización de comercialización como inductores: Pireco (mezcla de 11 extractos de plantas, entre ellas la soja y algas marinas) de la empresa TEAM GREEN; Echo Protect (mezcla de extractos naturales de plantas, entre ellas la ortiga y el ajo). Kavroulakis et al. en "Physiological and molecular plant pathology", *Academic Press Ltd*, GB, vol. 66 n°. 5, pág. 163-174 y Spyridon Ntougias et al. en "Biology and fertility of soils"; *Cooperating Journal of International Society of Soil Science*, Springer, Berlin, vol. 44, n°. 8, pág. 1081-1090, han trabajado en el uso como inductores de composts, es decir, de desechos vegetales biodegradados.

15 La eficacia de estas formulaciones con frecuencia es parcial, específica para ciertas variedades de plantas, o en estado de desarrollo. Muy a menudo se deben combinar con tratamientos químicos. Además, ciertos compuestos no provocan una resistencia varias veces en sucesión (extractos de plantas de alholva); sólo es posible una única pulverización. Su acción preventiva o curativa puede estar limitada en el tiempo.

20 Objeto de la invención

25 Existe, por tanto, la necesidad de una composición respetuosa con el medio ambiente y respetuosa con las plantas a las que va destinada, que estimule su sistema de defensa contra los patógenos. Los presentes inventores han descubierto que un extracto natural de bagazo de uva presentaba tal actividad. El extracto propuesto, por tanto, tiene la capacidad de estimular los mecanismos de defensa de las plantas tratadas. Así, la invención se refiere al uso de un extracto de bagazo de uva para estimular las defensas naturales de las plantas. El bagazo de uva está constituido por la parte sólida resultante del prensado de los granos de uva, es decir, por los hollejos, las pepitas y, opcionalmente, el escobajo. El bagazo de uva proviene, por tanto, de la transformación física de los granos de uva. El bagazo de uva no ha sufrido compostaje.

30 El extracto de bagazo de uva, cuyo uso se propone, permite inducir la expresión de los genes de defensa, es decir, de estimular las defensas naturales de las plantas. Debido a esto presenta propiedades como inductor.

35 De acuerdo con una realización, el extracto de bagazo de uva, cuyo uso es el objeto de la presente invención, comprende compuestos naturales sintetizados por la uva misma, cuyo cultivo está ampliamente extendido, y que se obtienen mediante un procedimiento tradicional (no industrial). Estos compuestos, por consiguiente, tienen mayor probabilidad de ser bien tolerados y de presentar efectos no tóxicos. Finalmente, estos compuestos naturales se pueden usar en la agricultura biológica.

40 Estos compuestos naturales son principalmente polifenoles y antocianinas. El extracto usado de acuerdo con la invención puede contener más de un 70 % en peso, con relación a su peso seco, de polifenoles. El extracto puede comprender también más de un 8 % en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto.

45 El extracto de bagazo de uva usado de acuerdo con la invención se puede preparar a partir de bagazo de uva roja al que se añade agua y se somete a una centrifugación, el producto de la centrifugación a continuación se somete a una extracción en una mezcla de agua-etanol que comprende menos del 30 % v/v de etanol, y después se concentra a vacío y se atomiza sin soporte de secado, a fin de obtener un polvo. El procedimiento se lleva a cabo en presencia de SO₂, sin añadir ningún aditivo. El sulfito añadido en el agua de difusión, a una concentración de 1 g/l tiene como función solubilizar las antocianinas y limitar su oxidación.

50 Los compuestos naturales presentes en el extracto de bagazo de uva son compuestos fáciles de extraer, poco costosos e hidrosolubles y, por tanto, son fáciles de usar (fácil dilución). Pueden mejorar las propiedades de los formulantes que acompañan a las materias activas debido a su efecto fotoprotector.

55 El uso de acuerdo con la invención es totalmente apropiado para las plantas seleccionadas de entre el grupo que comprende las plantas agrónomicamente útiles y las plantas ornamentales.

60 Las plantas agrónomicamente útiles se seleccionan de entre el grupo de las angiospermas que comprenden las *Apiaceae*, las *Astereaceae*, las *Brassicaceae*, las *Chenopodiaceae*, las *Convolvulaceae*, las *Cucurbitaceae*, las *Fabaceae*, las *Liliaceae*, las *Poligonaceae*, las *Rosaceae*, las *Solanaceae*, las *Poaceae*, las *Vitaceae*.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento para estimular las defensas naturales de las plantas, que comprende la aplicación de una composición que comprende un extracto de bagazo de uva sobre dichas plantas.

65 La composición usada en el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, como producto activo, un extracto hidroalcohólico de bagazo de uva. El extracto de bagazo de uva comprende más de un 45 %, preferentemente más de un 70 %, en peso de polifenoles con relación al peso seco del extracto.

El extracto comprende más de un 0,5 %, preferentemente más de un 8 %, en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto. El extracto de bagazo de uva se obtiene ventajosamente de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

5 La composición usada en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede presentar en forma de polvo o en forma líquida.

Cuando la composición se presenta en forma de polvo, está desprovista de cualquier otro agente activo.

10 Asimismo, puede estar desprovista de cualquier adyuvante no natural.

De acuerdo con una realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la composición es una composición que se aplica mediante pulverización foliar o mediante infiltración.

15 La concentración en extracto de bagazo de uva de la composición usada en el procedimiento de acuerdo con la invención está comprendida entre 0,10 g/l y 10 g/l, preferentemente entre 0,3 g/l y 2,5 g/l, más preferentemente aún entre 0,5 g/l y 1,25 g/l para una aplicación mediante pulverización con el fin de estimular las defensas naturales de las plantas. Una sola aplicación antes del ataque de los agentes patógenos puede ser suficiente. Sin embargo, a veces puede resultar necesario realizar al menos una nueva aplicación varios días o varias semanas después de la primera.

20 La composición se aplica a una concentración de 0,1 a 2,0 kg/ha, preferentemente de 0,3 a 1,5 kg/ha, de los cultivos que se han de tratar para estimular las defensas naturales.

25 Las dosis de aplicación y las modalidades de aplicación dependen, por supuesto, de la especie de plantas que se van a tratar y de su estado de desarrollo.

De acuerdo con una realización particular, la infiltración del extracto de bagazo de uva se efectúa con una concentración inferior al 0,30 % (p/v), preferentemente del 0,05 al 0,30 % (p/v).

30 El procedimiento de acuerdo con la invención se puede aplicar a las plantas agrónomicamente útiles y a las plantas ornamentales. Tales plantas son las que se han mencionado anteriormente en el presente documento en relación al uso.

35 La infiltración de un extracto de bagazo de uva a una concentración del 0,25 % sobre hojas de tabaco, induce una respuesta de hipersensibilidad (local) acompañada de una respuesta de resistencia sistémica (RSA: resistencia sistémica adquirida), que se traduce en el efecto inductor del extracto, efecto característico de la inducción de una inmunidad frente a los patógenos. Este efecto inductor se ha demostrado a nivel molecular mediante el análisis de la expresión de los genes marcadores de la respuesta RSA (*pr1* y *pr2*).

40 El efecto inductor de un extracto de bagazo de uva se ha demostrado igualmente para otras plantas dicotiledóneas (tomates) y para plantas monocotiledóneas (maíz).

45 El uso de este extracto permitirá la disminución de la cantidad de pesticidas utilizados para proteger a las plantas de los agentes patógenos. En cultivos biológicos, el uso de este extracto permitirá una disminución de los pesticidas.

La invención se describirá de forma más detallada a continuación con la ayuda de los ejemplos siguientes que se dan a título meramente ilustrativo.

50 Los experimentos se han llevado a cabo sobre los transcriptos aislados a partir de plantas tratadas con el extracto de bagazo de uva, de plantas tratadas con ácido salicílico (SA) (control positivo, el SA es un inductor conocido de la respuesta RSA) y de plantas pulverizadas sin inductor (control negativo, agua). La expresión de los genes PR se analiza mediante PCR semicuantitativa en tiempo real que permite la amplificación de los transcriptos de interés. Los resultados demuestran una acumulación de los transcriptos en las plantas tratadas con los extractos, lo que sugiere una respuesta de tipo inductor de los extractos vegetales de los presentes inventores.

55

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

60 En los ejemplos siguientes, se usa como extracto de bagazo de uva, el producto comercializado por la empresa GRAP'SUD con la marca exGrape® Anthocyanins. Este producto presenta las características siguientes:

- polvo ligeramente granulado rojo oscuro
- 65 - polifenoles totales

(en equivalentes de catequina) DO 280 nm: $\geq 70 \%$
 (en equivalentes de ácido gálico) FOLIN CIOCALTEU: $\geq 60 \%$

- procianidinas:

5 (en equivalentes de catequina) método de la vainillina: $\geq 5 \%$

- antocianos:

Blanqueado al disulfito: $\geq 8 \%$

10 Este producto se denomina en los ejemplos "EXTRACTO".

Se usa igualmente un potenciador de ácido beta-aminobutírico, denominado BABA en los ejemplos.

15 **Ejemplo 1 - Inducción sobre hojas de tabaco**

En plantas de tabaco, en el estadio de 10-12 hojas (4-5 semanas), se infiltra sobre las hojas el EXTRACTO al 0,25 % (p/v).

20 Se toma una fotografía de la hojas justo después de la infiltración (figura 1a), y 4 días después de la infiltración (figura 1b). Cuatro días después de la infiltración, se observan las respuestas de hipersensibilidad sobre las hojas que se han pinchado.

Se prepara un control de ácido salicílico (2 mM) y se analiza la respuesta RSA mediante PCR en tiempo real.

25 Se obtienen los resultados presentados en las figuras 2, 3 y 4.

Estos resultados demuestran una acumulación de los transcritos en las plantas tratadas con los extractos, en las hojas infiltradas o pulverizadas y las hojas no pulverizadas o no infiltradas de la misma planta tratada, lo que sugiere una respuesta de tipo inductor del EXTRACTO.

30 Este efecto inductor se ha demostrado a nivel molecular mediante el análisis de la expresión de los genes marcadores de la respuesta RSA (*pr1* y *pr2*).

35 El análisis molecular consistió en extraer los ARN totales a partir de las hojas de tabaco tratadas usando el kit de extracción Tri-reagent (Euromedex). Se verificó la integridad de los ARN extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa. Se usó la transcriptasa inversa (TI) Euroscript (Eurogentec) para la síntesis de los ADN complementarios. Los cebadores (oligonucleótidos de 20 a 24-meros) específicos de los genes *pr1* y *pr2* permitieron la amplificación de los ADNc correspondientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación se siguió en tiempo real (PCR en tiempo real) basada en la fluorescencia emitida por los productos de amplificación en presencia de SYBR Green. Los fragmentos de PCR-TI específicos de *pr1* y *pr2* se cuantifican usando el programa iQv3 (BIO-RAD). La abundancia de transcritos de *pr1* y *pr2* se normaliza (cantidad relativa) a los de un gen de expresión constitutivo, que codifica a la actina o al factor de crecimiento alfa.

45 **Ejemplo 2**

Se reproducen los mismos ensayos con diferentes concentraciones del EXTRACTO: 2,5 g/l, 1,25 g/l, 0,625 g/l, 0,312 g/l y 0,156 g/l y diferentes cantidades pulverizadas por hoja y por planta. Esto se efectúa con el fin de determinar la cantidad final que permite la inducción.

50 Las cantidades usadas se presentan en la tabla siguiente y los resultados se dan en la figura 5.

Dilución a partir de la solución madre de EXTRACTO al 1 %	x 4	x 8	x 16	x 32	x 64
Concentración de EXTRACTO	2,5 g/l	1,25 g/l	0,625 g/l	0,312 g/l	0,156 g/l
Cantidad pulverizada/hoja	5 mg	2,5 mg	1,25 mg	0,625 mg	0,312 mg
Cantidad pulverizada/planta	15 mg	7,5 mg	3,75 mg	1,875 mg	0,936 mg

55 **Ejemplo 3**

Se llevaron a cabo diferentes ensayos de infiltración de hojas de tabaco con 50 μ l de las soluciones que se mencionan a continuación:

- 60 Ensayo 1: EXTRACTO al 0,25 % (p/v)
 Ensayo 2: EXTRACTO al 0,125 % (p/v)

- Ensayo 3: EXTRACTO al 0,0625 % (p/v)
 Ensayo 4: EXTRACTO al 0,03125 % (p/v)
 Ensayo 5: EXTRACTO al 0,0156 % (p/v)
 Ensayo 6: BABA 10 mM
 Ensayo 7: (control positivo) ácido salicílico 2 mM
 Ensayo 8: (control negativo) agua

Ocho días después de la infiltración, se observaron los síntomas macroscópicos bajo luz blanca y bajo luz UV (longitud de onda a 312 nm). Las fotografías correspondientes se dan en las figuras 6 y 7. En las figuras, los números se corresponden con el punto de infiltración del ensayo que tiene un número idéntico.

Se observa en estas fotografías que el extracto de bagazo de uva induce una clorosis (zona clara desprovista de clorofila) de los tejidos infiltrados (1 y 2 en la figura 6) con la aparición de necrosis (zona parda desecada) cuando se usa el extracto a alta concentración (1 en la figura 6).

El BABA (10 mM) (6 en la figura 6) debido a su efecto potenciador así como el agua (8 en la figura 6) no inducen ninguna clorosis o necrosis en los sitios infiltrados. El ácido salicílico (2 mM) (7 en la figura 6) provoca la necrosis de los tejidos foliares infiltrados.

El extracto de bagazo de uva infiltrado a las concentraciones de 0,25 % (1), 0,125 % (2), 0,0625 % (3) en las hojas de tabaco induce una acumulación local de compuestos fluorescentes (1, 2 y 3 en la figura 7), característica de la RLA o "resistencia local adquirida", que interviene en las reacciones de defensa de los vegetales.

Ejemplo 4

Sobre las hojas infiltradas del ejemplo 3 se efectuó una prueba del azul de EVANS. El azul de Evans es un colorante vital que penetra fácilmente en las células cuando la membrana plasmática de las mismas está dañada y es permeable. Muestra, por tanto, la pérdida de integridad celular cuando hay muerte celular en la respuesta de hipersensibilidad.

Discos (diámetro de 1 cm) de hojas recortadas con un perforador alrededor del punto de infiltración se incuban en una solución de Evans (0,25 %) a temperatura ambiente y con agitación moderada durante 30 minutos para una buena penetración del colorante en las células. Los discos de hoja se lavan minuciosamente con agua destilada y después se trituran en presencia de 1 ml de SDS al 0,1 % hasta una homogeneización completa. El homogeneizado se centrifuga durante 20 minutos a 20000 x g y el sobrenadante se diluye 8 veces con agua destilada. Se mide la densidad óptica a 600 nm y se lleva al peso de materia fresca.

Los resultados se presentan en el gráfico de la figura 8.

Los tejidos foliares infiltrados con el bagazo de uva de los ensayos 1, 2 y 3 presentan una absorción del azul de Evans superior a la del control de agua (ensayo 8), lo que sugiere el inicio de la muerte celular.

Esta reacción es característica de la respuesta hipersensible que interviene en las reacciones de defensa de los vegetales.

Ejemplo 5

Se infiltraron hojas de tomate y hojas de maíz con 50 µl de agua (control negativo) por un lado, y 50 µl de EXTRACTO al 0,25 % (p/v), por otro lado.

Se tomaron fotografías bajo luz blanca 4 días después de la infiltración. Estas fotografías se presentan como la figura 8 para el tomate y como la figura 9 para el maíz.

En estas figuras se observa que el extracto de bagazo de uva infiltrado al 0,25 % (50 µl) induce una respuesta hipersensible (necrosis) en el tomate (planta dicotiledónea) y el maíz (planta monocotiledónea).

Referencias

- Aziz et al. (2003) "Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola". *MPMI*, 16(12): 1118-1128.
 Daayf, F., Schmitt, A., Belanger, R.R., 1997. "Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of Reynoutria sachalinensis". *Plant Physiol* 113, 719-727.
 Doubrava, N.S., Dean, R.A., Kuc, J., 1988. "Induction of systemic resistance to anthracnose caused by Colletotrichum lagenarium in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves". *Physiol. Mol. Plant Pathol* 33, 69-79.
 Klarzynski et al. (2000). "Linear b-1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco". *Plant physiol.* 124:

1027-1037.

Godard et al. (2009). "Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthroquinone-rich plant extracts and their conferred résistance to downy mildew". *Plant physiology and biochemistry*, 47, 827-837.

5 Narwal et al. (2000) "A systemic résistance inducing antiviral protein with N-glycosidase activity from Bougainvillea xbuttiana leaves". *Indian J. Exp. Biol.* 39, 600-603.

Paul et Sharma (2002) "Azadirachta indica leaf extract induces résistance in barley against leaf stripe disease". *Physiological and molecular plant pathology*, 61, 3-13.

Randoux et al. (2006) "Inhibition of Blumeria graminis f. sp. Tritici germination and partial enhancement of wheat defenses by Milsana". *Biochemistry and Cell biology*, 96, 1278-1286.

10 Sharathchandra et al. (2004) "A chitosan formulation Elexa™ induced downy mildew disease résistance and growth promotion in pearl millet". *Crop protection*, 23: 881-888.

Tosun et al. (2003) "The effect of HarpinEa as plant activator in control of bacterial and fungal diseases of tomato". *Congrès Acta horticulturae*. 2003, n°. 616, pág. 251-254.

15 Varnier et al. (2009) "Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring résistance to Botrytis cinerea in grapevine". *Plant, cell and Environment*, 32,178-193.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto natural de bagazo de uva para estimular las defensas naturales de las plantas.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 45 % en peso de polifenoles con relación al peso seco del extracto.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 70 % en peso de polifenoles con relación al peso seco del extracto.
- 10 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 0,5 % en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto.
- 15 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 8 % en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, de acuerdo con el cual el extracto es un extracto hidroalcohólico de bagazo de uva o un extracto obtenido mediante extracción con agua sulfitada.
- 20 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** las plantas se seleccionan de entre el grupo que comprende las plantas agrónomicamente útiles y las plantas ornamentales, aromáticas y medicinales.
- 25 8. Procedimiento para estimular las defensas naturales de las plantas, que comprende la aplicación de una composición que comprende un extracto de bagazo de uva sobre dichas plantas.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** la composición es una composición acuosa que se aplica mediante pulverización foliar o infiltración.
- 30 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 45 % en peso de polifenoles con relación al peso seco del extracto.
- 35 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 70 % en peso de polifenoles con relación al peso seco del extracto.
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 0,5 % en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto.
- 40 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizado por que** el extracto comprende más del 8 % en peso de antocianinas con relación al peso seco del extracto.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la composición acuosa se aplica mediante infiltración a menos del 0,30 % (p/v) de extracto de bagazo de uva.
- 45 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la cantidad del extracto de bagazo de uva es del 0,05 % al 0,30 % (p/v).

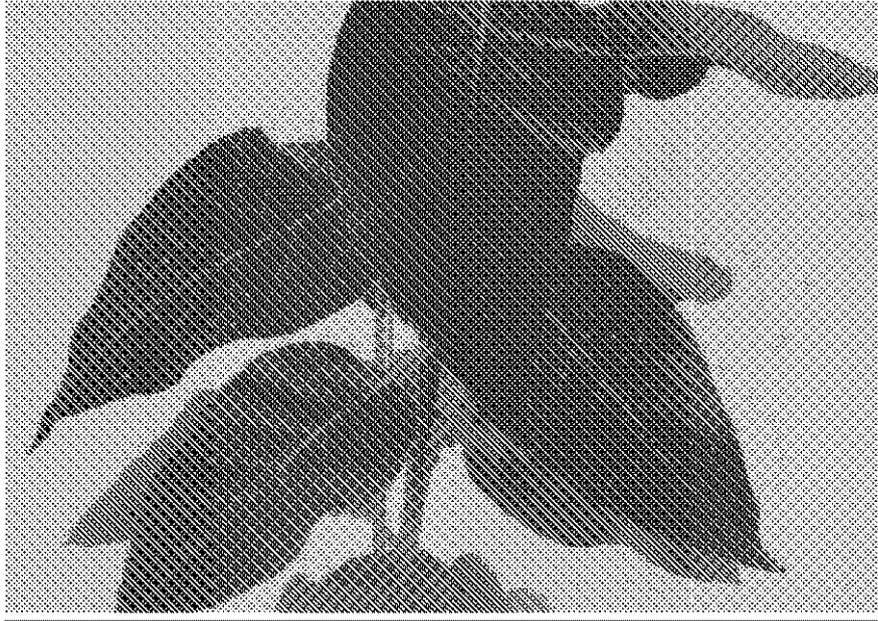


Fig. 1a



Fig. 1b

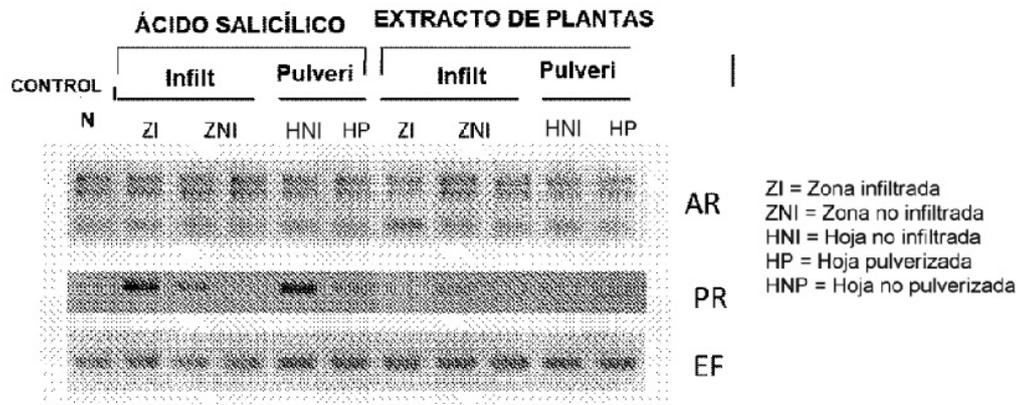


Fig.2

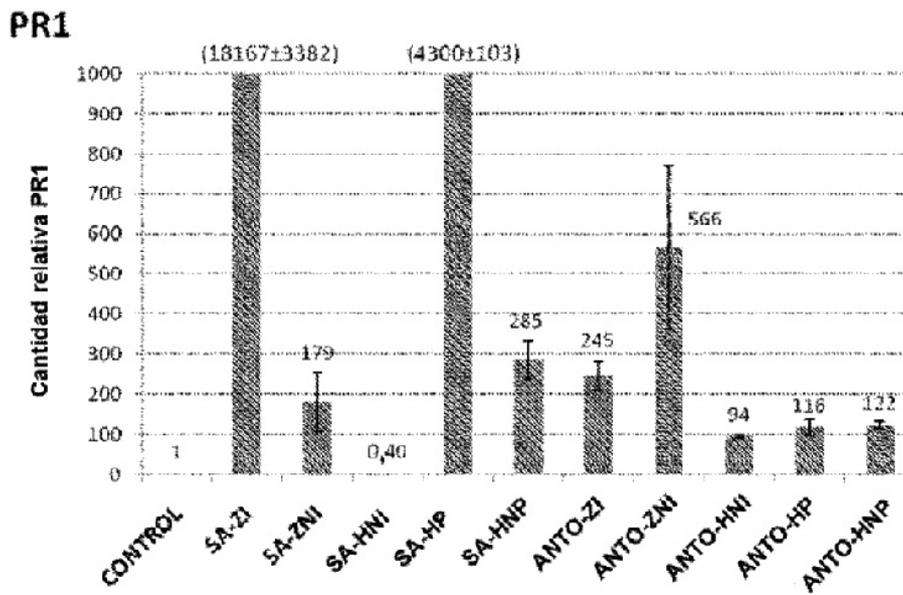


Fig.3

PR2

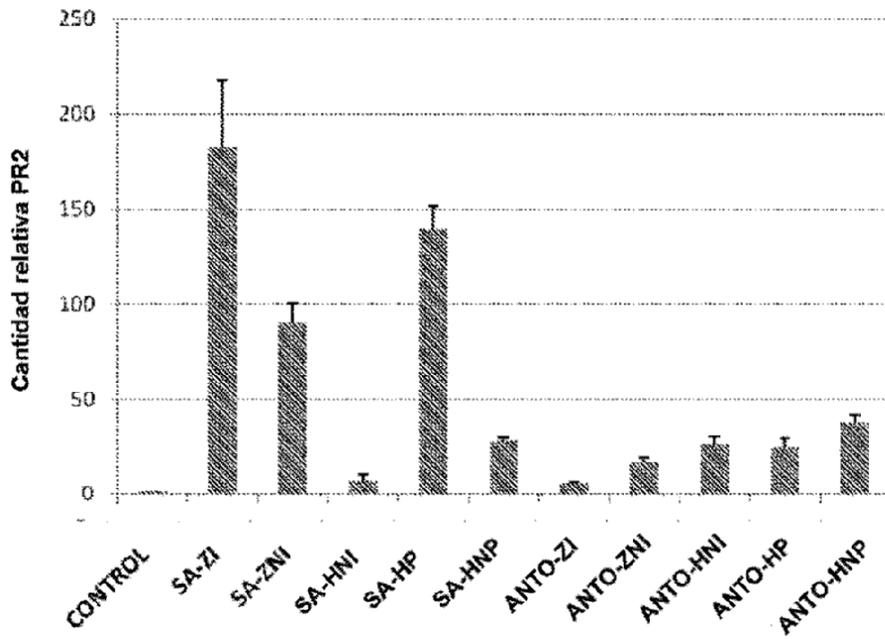


Fig.4

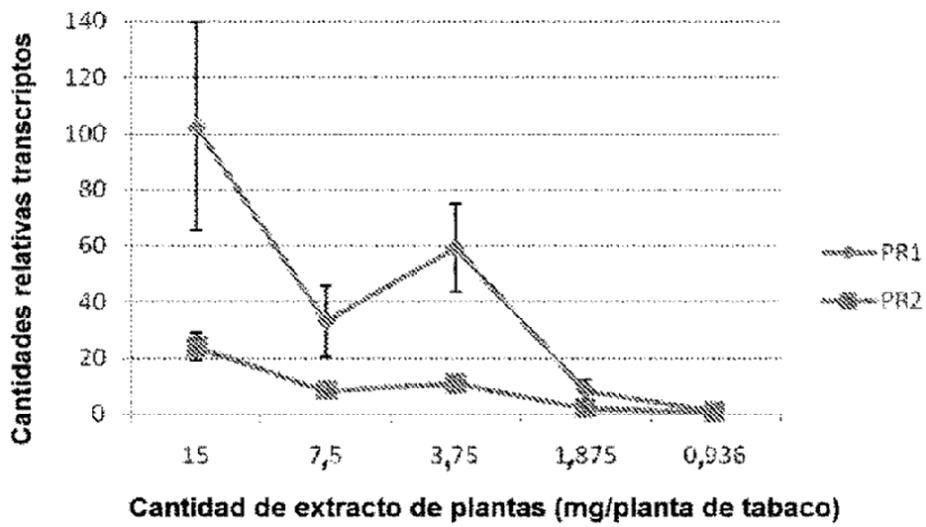


Fig.5

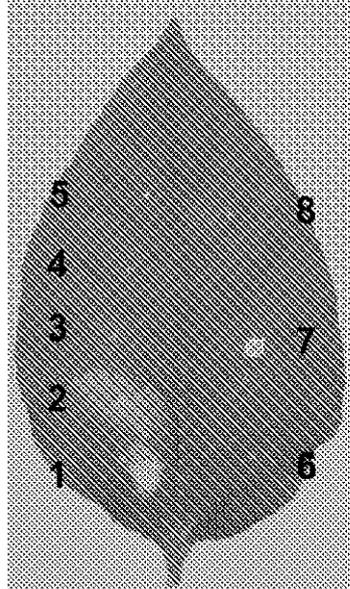


Fig. 6

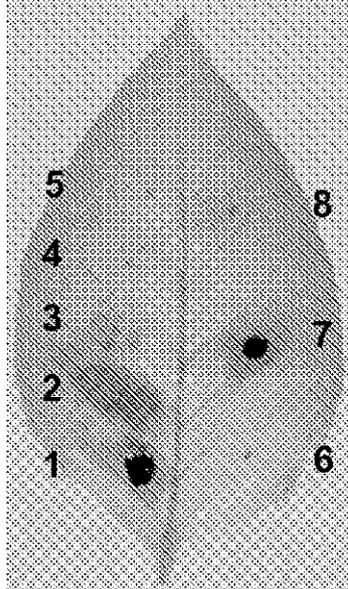


Fig. 7

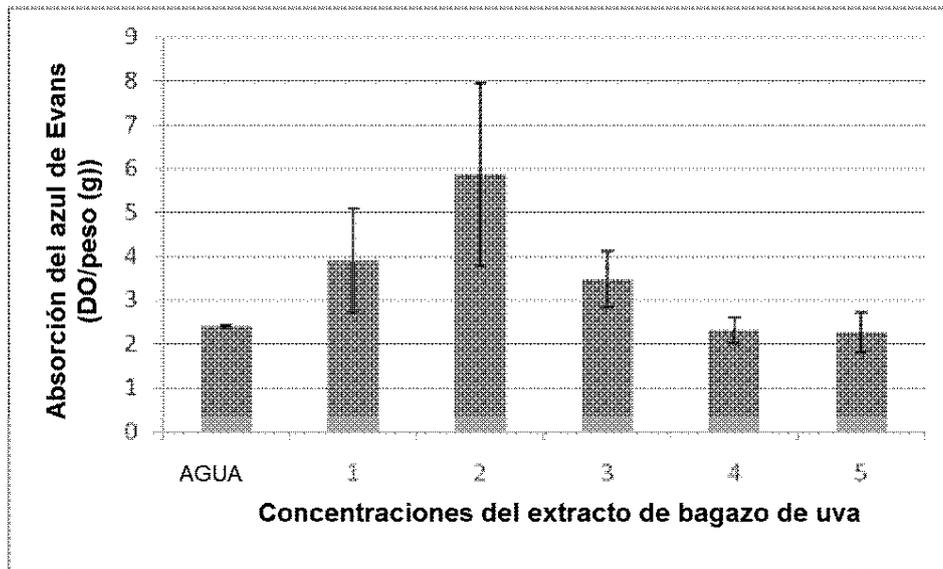


Fig.8

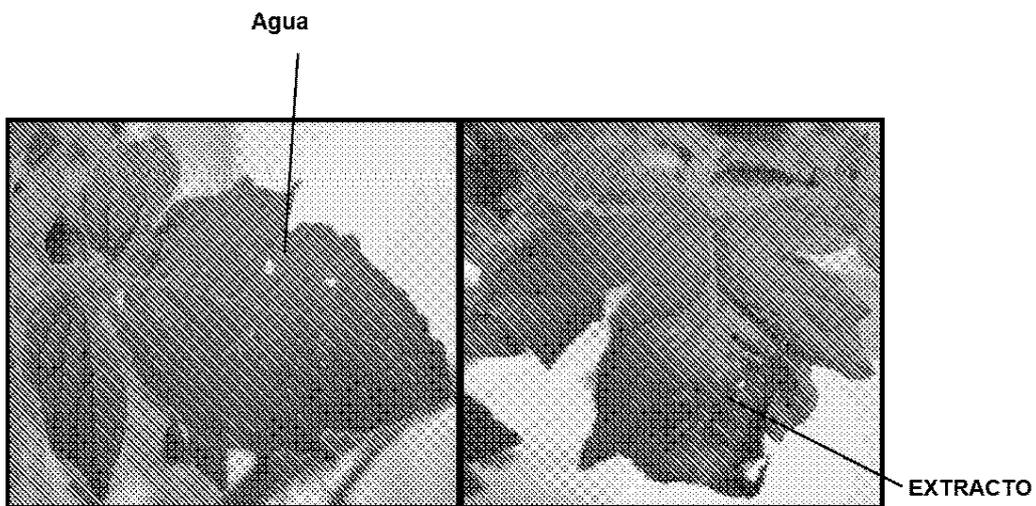


Fig.9

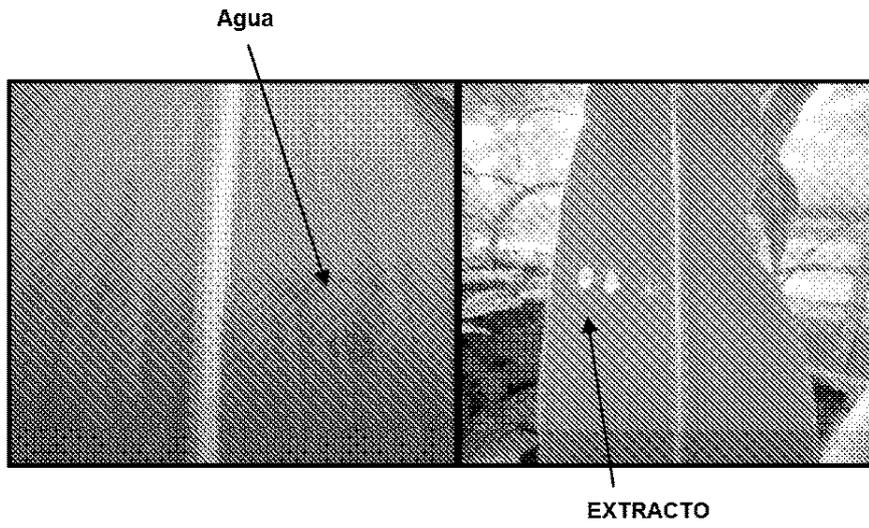


Fig.10