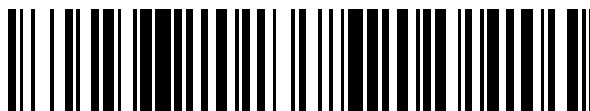


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 112**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 65/03 (2009.01)

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 05746653 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 1729582**

54 Título: **Uso de ulvanos como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas**

30 Prioridad:

30.03.2004 FR 0403269

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

24.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 561 112 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 ulvanos como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas

La presente invención, que es de aplicación en el ámbito agrícola, tiene por objeto esencialmente el uso de ulvanos, en particular, de extractos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o de oligosacáridos derivados de ulvanos obtenidos mediante hidrólisis ácida o enzimática de dicho ulvano, como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de tratamiento de las plantas, especialmente por vía foliar o radicular utilizando dichos ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvano.

Las plantas pueden ser objeto de ataque por múltiples agentes patógenos (hongos, bacterias, virus, viroides, protozoos, nematodos, herbívoros), que puede tener como consecuencia las pérdidas de rendimiento y una disminución en la calidad de la producción.

Paralelamente a la lucha química, que recurre al uso de plaguicidas, han aparecido nuevas estrategias de protección de los vegetales.

Efectivamente, aunque carecen de un sistema inmunitario similar al de los animales superiores, las plantas tienen su propio arsenal defensivo. El conocimiento de estos mecanismos permite pensar en su uso para luchar contra las enfermedades.

El control por parte de la planta de los efectos del patógeno es el resultado de una serie de acontecimientos que se desencadenan en las células vegetales desde el momento en que la planta resulta atacada:

1. reconocimiento del agente patógeno,
2. envío de esta información al núcleo,
3. inducción de genes defensivos seguida de síntesis de compuestos antimicrobianos,
4. transmisión de la señal de alarma a toda la planta y a sus vecinas.

Así, para aumentar la capacidad de respuesta y, por lo tanto, la resistencia de una planta frente a algunos patógenos, una de las posibles estrategias consiste en inducir antes de que se produzca el ataque del patógeno unas reacciones de defensa mediante el uso de moléculas señal.

Estas moléculas señal, que son de naturaleza química muy diversa (proteínas, péptidos, glicoproteínas, lípidos y oligosacáridos), pueden transmitir la información de un ataque incluso a concentración muy baja.

En la mayoría de los casos, son de origen microbiano (por ejemplo, la harpina) o vegetal (por ejemplo, los ácidos oligogalactourónicos) o bien se han sintetizado químicamente (por ejemplo, el benzotiadiazol).

En respuesta a los tratamientos con dichas moléculas señal, la planta reacciona sintetizando proteínas estructurales que fortalecen la pared de las células vegetales, enzimas implicadas en la síntesis de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas, hidrolasas como quitinasas o glucanasas y enzimas inhibidoras que actúan contra las enzimas hidrolíticas de los agentes patógenos.

En el caso de una interacción planta-parásito de tipo incompatible, las respuestas de defensa observadas con más frecuencia son:

- la muerte celular rápida y localizada en el sitio de infección, que se denomina respuesta hipersensible o "RH",
- la síntesis y el depósito de compuestos fenólicos y proteínas en la pared,
- la acumulación de compuestos antimicrobianos y la síntesis de proteínas denominadas "RP" (acrónimo de Relacionadas con la Patogénesis).

El fortalecimiento de las barreras estructurales, que puede frenar o inhibir la progresión del patógeno hacia el interior de la planta, frecuentemente está asociado a la RH. Por ejemplo, el depósito de calosa en la pared o en los plasmodios, así como la síntesis de lignina, permiten ralentizar las invasiones fúngicas o víricas. Análogamente, las GPRH extensinas (GlicoProteína Rica en Hidroxiprolina) y las PRG (Proteínas Ricas en Glicina) pueden, debido a su función de refuerzo de la pared, hacer que esta última sea más difícil de degradar.

Las fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, permiten en algunos casos luchar directamente contra los parásitos, debido a su capacidad para acumularse rápidamente alrededor del punto de infección, impidiendo así la progresión de la invasión. Se han aislado y caracterizado más de 350 fitoalexinas a partir de una treintena de familias de plantas. Presentan una gran diversidad de estructuras y derivan de los metabolismos secundarios del siquimato, acetato-malonato y acetato-mevalonato. Algunas se encuentran en varias familias de

plantas, mientras que otras son específicos de una familia determinada. Es el caso particular de las isoflavonas de leguminosas o de los sesquiterpenos de las solanáceas. Sin embargo, es preciso señalar que las fitoalexinas no parecen desempeñar un papel crucial en la resistencia a todos los agentes patógenos, como por ejemplo para *Arabidopsis thaliana*.

La RH también está acompañada de la síntesis de proteínas RP. Estas proteínas intra o extracelulares se acumulan en las plantas después de su inoculación por los agentes patógenos y, en el caso de interacción incompatibles, pueden constituir hasta un 10 % de las proteínas solubles de la hoja. En algunos casos, se ha demostrado un papel activo en la degradación de la pared de agentes patógenos de tipo fúngico (β -glucanasa, quitinasa).

Cabe señalar que los tres fenómenos citados (refuerzo de la pared, síntesis de fitoalexinas y síntesis de proteínas PR) acompañan a la HR sin ser exclusivos. Efectivamente, la síntesis de proteínas PRG y GPRH también se ha detectado en interacciones compatibles, así como después de una lesión.

Las algas marinas son un recurso vegetal abundante y, desde hace tiempo, se utilizan en las zonas costeras como fertilizantes del suelo. Como consecuencia del tratamiento de diferentes plantas con extractos de algas se han puesto de manifiesto la germinación de semillas, la obtención de mejores rendimientos, la resistencia a enfermedades y una prolongación de la conservación de frutos. Las conclusiones en temas de salud de las plantas se habían atribuido fundamentalmente al elevado contenido en betainas, fitohormonas y oligoelementos de las algas utilizadas.

Se reconoce actualmente que algunos oligosacáridos de origen marino presentan un efecto intensificador sobre determinadas rutas de defensa de las plantas. Así, el documento WO 99/03346 describe la utilización de oligosacáridos de tipo $\beta(1-3)$ glucanos especialmente extraídos del alga parda *Laminaria digitata* en la potenciación y la estimulación de las defensas naturales del trigo infectado por la septoriosis. Dichos $\beta(1-3)$ glucanos inducen también en las células de tabaco cuatro marcadores de defensa entre las que se destacan la actividad fenilamoniocoliasa (PAL), que es una enzima clave para la síntesis de los fitoalexinas, y la actividad O-metil transferasa (OMT), que es una enzima implicada en la síntesis de lignina.

Bi et al., Pakistan Journal of Botany, vol. 31, n.º 1, junio de 1999, páginas 193-198, describe las fracciones que contienen oligosacáridos de alto peso molecular extraídos de algas que tienen propiedades teóricas de estimulación de las defensas naturales de plantas.

En el caso de las algas rojas, se ha demostrado que el carragenato induce la expresión de genes que codifican la sesquiterpeno ciclasa, la quitinasa y los inhibidores de proteinasas.

En el caso de las algas verdes, que también son ricas en polisacáridos, ningún estudio ha demostrado hasta la fecha que los polisacáridos extraídos de esas algas presenten propiedades inductoras comparables a las puestas de manifiesto en las algas pardas y rojas.

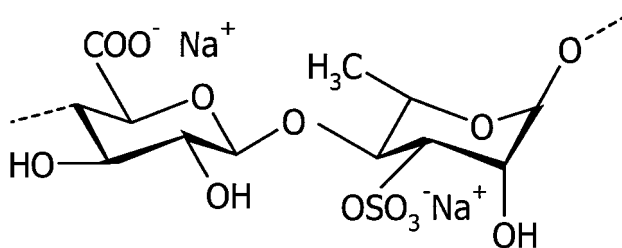
Es en este contexto que se ha descubierto, y esto constituye la base de la presente invención, que los ulvanos especialmente extraídos de algas verdes y los oligosacáridos derivados de estos últimos permiten, de forma totalmente sorprendente e inesperada, estimular la expresión de genes de defensa en las plantas y se pueden utilizar como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas, especialmente como sustitutos de plaguicidas o como complementos composiciones de fertilizante o en abonos.

Así, según un primer aspecto, la presente solicitud tiene por objeto el uso de ulvanos, en particular, extraídos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o de oligosacáridos derivados de ulvanos obtenidos mediante hidrólisis ácida o enzimática de dicho ulvano, como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas.

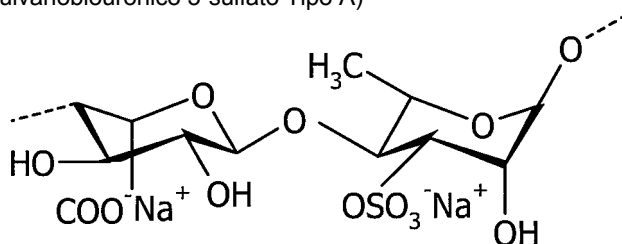
Los ulvanos útiles de acuerdo con la invención son polisacáridos hidrosolubles especialmente presentes en las paredes celulares de las algas verdes de los géneros *Ulva* y *Enteromorpha*.

Los ulvanos se definen con mayor precisión como polisacáridos ácidos muy sulfatados y que están compuestos principalmente por unidades derivadas de ramnosa 3-sulfato, xilosa, xilosa 2-sulfato, ácido glucourónico y ácido idurónico.

Las cuatro unidades recurrentes siguientes son especialmente características de los ulvanos:

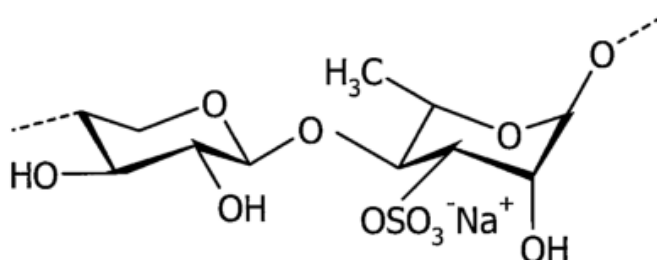


>4)- β-de-GlcA- (1>4)- α-L-Ram 3 sulfato(1>
(también denominado ácido ulvanobiourónico 3-sulfato Tipo A)



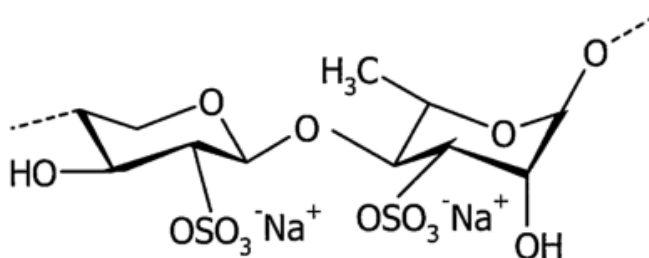
5

>4)- α-L-IdoA- (1>4)- α-L-Ram 3 sulfato(1>
(también denominado ácido ulvanobiourónico 3-sulfato Tipo B)



10

>4)- P-D-Xil- (1>4)- α-L-Ram 3 sulfato(1>
(también denominado ácido ulvanobiosa 3-sulfato)



15 >4)- β-de-Xil 2 -Sulfato- (1>4)- α-L-Ram 3 sulfato(1>
(también denominado ácido ulvanobiosa 2',3-disulfato)

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

20

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

25

Los extractos de algas ricos en ulvanos que se pueden utilizar en el marco de la presente invención se pueden obtener a partir de las especies de algas mencionadas mediante un procedimiento que incluye generalmente los siguientes pasos: lavado, trituración, extracción (separación sólido-líquido) y en su caso fraccionamiento y concentración.

30

El extracto obtenido puede estar más o menos concentrado según el uso previsto. La deshidratación completa de dicho extracto que permita una presentación en forma pulverulenta hidrosoluble se puede obtener, por ejemplo,

mediante un secador de tambor o mediante atomización.

Las condiciones de extracción y la naturaleza de las algas se seleccionan de tal forma que el extracto obtenido tenga la concentración deseada para la aplicación prevista. El experto en la materia puede realizar fácilmente dicha selección, especialmente si se tienen en cuenta las indicaciones generales que se describen a continuación.

De manera general, la cantidad de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos que se aporta a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro y preferentemente de aproximadamente 1 g por litro para las aportaciones en forma líquida para aplicación foliar o para las soluciones nutritivas de aplicación radicular (cultivo hidropónico, riego por goteo, ...) o bien de 10 a 1000 g/ha y preferentemente de aproximadamente 200 g/ha para las aportaciones en forma sólida en abonos pulverulentos o granulados.

La cantidad de ulvanos aportada a las plantas deberá ser suficiente para estimular la expresión de los genes implicados en la defensa de la planta. Esta cantidad es variable según la naturaleza de la planta a tratar y el método de tratamiento (vía foliar o vía radicular). Esta cantidad se podrá determinar caso por caso mediante el uso de pruebas en macromatrices tales como las que se definen a continuación.

Según un segundo aspecto, la presente solicitud tiene por objeto proteger un procedimiento de tratamiento de las plantas destinado a activar las reacciones de defensa y resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas, caracterizado por que incluye la aplicación a dichas plantas de una cantidad eficaz de ulvanos, en particular, de extractos de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, u oligosacáridos derivados de ulvanos por hidrólisis ácida o enzimática.

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

La cantidad eficaz de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos que se aporta a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro y preferentemente de aproximadamente 1 g por litro para las aportaciones en forma líquida para aplicación foliar o para las soluciones nutritivas de aplicación radicular (cultivo hidropónico, riego por goteo, ...) o bien de 10 a 1000 g/ha y preferentemente de aproximadamente 200 g/ha para las aportaciones en forma sólida en abonos pulverulentos o granulados.

El producto fitosanitario, que comprende una cantidad eficaz de al menos un ulvano, en particular, extraído de algas verdes del género *Ulva* o *Enteromorpha*, o un oligosacárido derivado de ulvanos obtenido por hidrólisis ácida o enzimática de dicho ulvano, en su caso junto con uno o varios fertilizantes se presentará ventajosamente en forma líquida o en forma de polvo o granulado, pudiéndose diluir estas últimas formas solubles con una cantidad adecuada de disolventes, como por ejemplo agua.

Este producto contendrá ventajosamente una cantidad eficaz de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos que se aporta a las plantas de 0,1 g a 100 g por litro y preferentemente de aproximadamente 1 g por litro para las aportaciones en forma líquida para aplicación foliar o para las soluciones de aplicación radicular (cultivo hidropónico, riego por goteo, ...) o bien de 10 a 1000 g/ha y preferentemente de aproximadamente 200 g/ha para las aportaciones en forma sólida.

Como ejemplos de productos fertilizantes que se pueden utilizar en el marco de un uso de acuerdo con la invención, se citarán las enmiendas calcáreas, las enmiendas orgánicas y los soportes de cultivo, los abonos radicales de tipo NP, PK, NPK, etc., los abonos foliares o también las soluciones nutritivas radicales.

Las sustancias fertilizantes que se pueden utilizar junto con los ulvanos o los oligosacáridos derivados de ulvanos pueden ser de diferentes tipos, y se pueden seleccionar, por ejemplo, entre urea, sulfato de amonio, fosfato natural, cloruro de potasio, sulfato de amonio, nitrato de magnesio, nitrato de manganeso, nitrato de cinc, nitrato de cobre, ácido fosfórico, ácido bórico.

La presente invención es de aplicación en el tratamiento de una gran variedad de plantas.

Entre éstas, se pueden mencionar especialmente:

- las plantas de cultivos importantes tales como cereales (trigo, maíz),
- proteaginosas (guisantes),
- oleaginosas (soja, girasol),
- plantas herbáceas útiles para la alimentación animal,
- cultivos especializados tales como, en particular las hortalizas (lechuga, espinaca, tomate, melón), vid, arboricultura (pera, manzana, nectarina), u horticultura (rosales).

Por el término "planta" se pretende designar en la presente solicitud la planta considerada en su totalidad, incluyendo su sistema radicular, su aparato vegetativo, los granos, semillas y frutos.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

En estos ejemplos, y salvo indicación en 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 que se puede utilizar en el marco de la invención

A - Descripción general

a) Preparación de los ulvanos

La fracción de ulvanos se obtiene por extracción de algas frescas en medio acuoso (100 g de algas frescas por litro de agua).

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

b) Preparación de los oligulvanos

Los ulvanos preparados como se indica en a) más arriba se hidrolizan en 1 litro de solución ácida (ácido tricloroacético o ácido clorhídrico concentrado en 2-3 mol l⁻¹) a 100 °C durante 30 min a 1 h, preferentemente de aproximadamente 40 minutos.

El ácido glucourónico, el ácido aldobiurónico, el ulvanobiouronato y el ácido idurónico se identificaron en los productos de hidrólisis.

B. Ejemplo detallado de extracción:

Se obtuvo un extracto de *Ulva armoricana* enriquecido en ulvanos y en particular en derivados de ácido idurónico tipo xiloi duroramnano mediante el protocolo experimental siguiente:

a) Lavado

Algas frescas de tipo *Ulva armoricana* se sometieron a dos lavados sucesivos en una cubeta de agua para eliminar la arena y la grava.

Las algas se depositaron a continuación en cestas de malla de acero inoxidable antes de introducirse en las cubetas, donde se recubrieron de agua.

La agitación mediante boquillas de ventilación permite mantener las algas en suspensión, favoreciendo así la decantación de las impurezas.

b) Trituración

Las algas ya lavadas se escurrieron y luego se trituraron en trozos de 1 a 10 mm.

c) Extracción

Se dispersaron 1000 kg de algas en un reactor con calentamiento que contenía 10000 kg de una solución acuosa calentada a una temperatura de 90°C. El conjunto se mantuvo a esta temperatura durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Antes de la extracción, las células de algas ya trituradas se microfraccionaron por medio de un homogeneizador de tipo ULTRA-TURAX® para favorecer la extracción. La operación de separación se produjo después de 2 horas de extracción.

d) Separación

La fracción soluble rica en derivados del ácido idurónico de tipo xiloiduroramnano se separó de los residuos de algas por centrifugación (separación sólido-líquido).

El extracto centrifugado se filtró a continuación bien en un filtro de tierra de diatomeas, o bien en un filtro de placas, y después se volvió a filtrar en una membrana de 1 µm.

El filtrado resultante comprende de 0,1 a 1 % en peso de extracto seco.

El extracto así preparado se puede utilizar de forma más o menos concentrada, estando determinada la concentración final en función del contenido de derivados activos deseada para la aplicación prevista.

Así, el filtrado anteriormente mencionado se puede concentrar, por ejemplo, con un evaporador de película descendente, de forma que el extracto seco representa del 10 al 60 % en peso del mismo.

Si se desea una presentación en forma pulverulenta hidrosoluble, también se puede conseguir una deshidratación total usando, por ejemplo, un secador de tambor o mediante pulverización.

Procediendo como se describe anteriormente, se han preparado varios extractos a partir de seis especies de algas verdes de los géneros *Ulva* o *Enteromorpha*. La composición de estos extractos secos se indica en la Tabla 1

siguiente.

TABLA 1: Composición de los extractos de algas verdes

Alga	% de ulvanos (% del peso seco del alga)	% de azúcares totales	% de sulfato	% de proteínas
<i>Ulva armoricana</i>	7-15	50-50	10-20	3-7
<i>Ulva rigida</i>	5-15	50-50	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

Alga	Ram	Gal	Glc	Xil	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

5

EJEMPLO 2

A - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la expresión de genes de una planta modelo

- 10 Se realizó un análisis global de la expresión de numerosos genes involucrados en la defensa de una planta modelo usando técnicas de genómica funcional. La leguminosa *Medicago truncatula* (número elevado de secuencias de ADN disponibles) se utilizó como planta modelo.

- 15 De esta forma se estudió el efecto de los ulvanos sobre aproximadamente 200 genes implicados en la defensa de esta planta modelo mediante análisis de macromatrices.

a) Material biológico

- 20 Las plantas de *Medicago truncatula* línea F83 005.5 se cultivaron en un ambiente controlado (16 h / 8 h, 20°C / 15°C, 60 % de humedad).

Los productos estudiados (extractos obtenidos de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1) se aportaron bien por vía foliar, o por vía radicular.

- 25 En el caso de aportación foliar, las diferentes soluciones de activadores se pulverizaron sobre las hojas de plantas que tenían 1 mes de edad a la concentración de 1 mg/ml.

En el caso de aportación radicular, los productos se introdujeron en el medio nutriente.

- 30 El estudio de la expresión global de los genes potencialmente implicados en la defensa y la señalización se vigiló mediante macromatrices.

b) Preparación de las macromatrices

- 35 La selección de etiquetas de genes expresados (EST) de *Medicago truncatula* basada fundamentalmente en su implicación en la defensa de los vegetales y en el metabolismo primario se realizó utilizando las bases de datos TGIR y MENS.

De las bibliotecas MtBA, MtBB y MtBC se recuperaron 165 EST procedentes de 144 secuencias de *Medicago truncatula* (secuencias de consenso posibles (TC)).

8 fragmentos de genomas (TC76726, TC77277, TC77910, TC77988, TC78214, TC85619, TC86687, TC85808) se amplificaron mediante PCR utilizando ADN genómico de *Medicago truncatula* como cebador. Estos 8 EST se clonaron a continuación en el vector pGEM-Teasy (Promega) y se verificaron mediante secuenciación.

Los 173 fragmentos de ADN se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores universales complementarios de las secuencias vectores que rodeaban el sitio de clonación de ADN. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis y se ajustaron 0,2-0,5 µg/ µl con DMSO (50 %) y se depositaron sobre una membrana con un robot (Eurogridder spotting robot).

c) Resultados

La actividad activadora de los ulvanos extraídos de algas se estudió siguiendo la expresión simultánea de varios cientos de genes. Las distintas categorías de los EST seleccionados se clasificaron según familia: ruta de los fenilpropanoides, biosíntesis de fitoalexinas, proteínas de las paredes, defensa celular, estrés oxidante, RH de senescencia, ruta del etileno, síntesis de lípidos, estreses abióticos, transducción de señales, nodulinas, genes constitutivos.

Los extractos de algas verdes ricos en ulvanos conducen a la inducción de 16 a 31 genes potencialmente implicados en la defensa sin alterar el metabolismo primario. Se obtuvieron respuestas similares para los 2 tipos de aportación, es decir, foliar y radicular. Se observa así, para el conjunto de los tratamientos, esencialmente la inducción de genes relacionados con las familias de proteínas de las paredes, biosíntesis de fitoalexinas y defensa celular.

La inducción de genes es más importante para los ulvanos ricos en derivados del ácido xiloduroramnano, como por ejemplo los ulvanos de *Ulva armoricana* y *Enteromorpha intestinalis*. Estos últimos también tienen la particularidad de producir un gen implicado en la vía de las oxilipinas. Los oligoulvanos obtenidos tras la hidrólisis presentan resultados idénticos.

Tabla 2. Efectos de los ulvanos de diferentes algas verdes sobre la expresión de determinados genes en macromatrices

Familia de genes	Nb de TC ¹	Ulva					Enteromorpha	
		U. armoricana		U. rigida	U. rotundata	U. lactuca	E. compressa	E. intestinalis
		Ulvanos	Oligoulvanos					
Ruta de los fenilpropanoides	8	4	4	3	3	2	3	4
Ruta de las fitoalexinas	10	5	5	3	2	2	4	5
Proteínas de las paredes	17	6	5	4	5	3	3	6
Defensa celular	8	2	2	2	2	1	2	1
Estrés oxidante	20	5	5	5	4	3	3	5
RH de senescencia	3	1	1	1	1	1	1	
Producción de etileno	2	0	0	0	0	0	0	0
Vía de las oxilipinas	23	2	2	2	0	0	0	1
Estreses abióticos	3	1	1	1	1	1	1	1
Transducción de señales	8	4	3	4	4	3	3	4
Nodulinas	6	0	0		0	0	0	0
Otros	8	1	1	0	1	0	0	1
Total	116	31	29	23	23	16	20	29

¹ Los valores corresponden al número de TC (TIGR Tentative Consensus Sequence) para cada familia de genes.

² Los valores son el promedio de 3 tratamientos independientes que corresponden al número de genes inducidos. Solamente se han incluido los genes inducidos dos veces seguidas (cocientes 1,5).

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

Se llevó a cabo una segunda serie de experimentos para evaluar el efecto de la sensibilización de la planta tratada con el extracto de *Ulva armoricana* durante el ataque fúngico. Se evaluó de esta forma el efecto de un segundo tratamiento con extracto de *Ulva armoricana*, 3 días después de la primera pulverización. Los efectos sobre la expresión de los genes se estudiaron mediante macromatrices.

Los tratamientos efectuados en una o dos aportaciones inducen la expresión de un elevado número de genes implicados en los mecanismos de defensa y de señalización en un grado similar.

Los tratamientos inducen la expresión de genes en todas las categorías funcionales:

- 5
- la de los fenilpropanoides: fenilalanina amoniaco liasa, ácido cafeico O-metiltransferasa, alcohol cinámico deshidrogenasa,
 - la de las fitoalexinas: chalcona reductasa, isoflavone reductasa, vestitona reductasa,
 - la de las proteínas parentales: extensina, glicoproteína rica en hidroxiprolina, proteína rica en arabinogalactana,
 - 10 - proteína rica en prolina, prolil hidroxilasa endo, endo-1,3-1,4- β -D-glucanasa,
 - la de los genes de defensa: PR10-1, endoquitinasa, SRG1, inhibidor de poligalacturonasa, PR1.

En el caso del estrés oxidativo, 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.

En el metabolismo de los lípidos se inducen diferentes genes implicados en la vía de las oxilipinas, en particular las fosfolipasas D y C, tres lipoxigenasas, una desaturasa y una oxofitodienoato reductasa. Dos tratamientos consecutivos inducen la expresión de un número mayor de genes (6 genes respecto a 2).

20 TABLA 3: Efectos de los ulvanos de *Ulva armoricana* (AV) en la expresión de algunos genes en macromatrices

			Tratamiento					
TC TIGR ^b	Función	N.º registro en GB ^c	AV ^d			AV+AV ^e		
			1	2	3	1	2	3
<u>Ruta de los fenilpropanoides</u>								
TC85501	fenilalanina amoniaco liasa	AL372483	NS	2,33	1,83	1,18	4,44	1,00
TC85550	ácido cafeico O-metiltransferasa	AL367074	1,52	1,93	2,54	NS	4,33	1,90
TC85894	cafeoil-CoA O-metiltransferasa	AL368189	2,03	0,67	1,57	NS	1,22	NS
TC77145	alcohol cinámico deshidrogenasa	AL372163	1,00	5,47	4,33	1,03	3,40	2,01
<u>Ruta de las fitoalexinas</u>								
TC76884	chalcona sintasa	AL369218	1,20	NS	1,45	4,92	0,96	4,01
TC85146	chalcona sintasa	AL368203	1,00	2,09	2,34	2,00	NS	1,13
TC85169	chalcona sintasa	AL370220, AL385833	1,51	2,93	1,54	2,17	0,97	2,42
TC85521	chalcona reductasa	AL381630	1,00	1,00	NS	1,85	1,00	2,95
TC85633	chalcona isomerasa	AL381790	2,01	3,31	1,25	4,88	6,04	5,17
TC85477	isoflavona reductasa	AL384237	1,68	3,61	2,55	3,41	2,25	5,99
TC85478	isoflavona reductasa	AL383870	1,00	1,00	NS	1,99	2,09	1,00
TC77308	vestitona reductasa	AL383703, AL384920	3,96	1,92	3,09	NS	1,00	1,00
<u>Proteínas de pared</u>								
TC76311	extensina	AL381854	1,00	2,76	1,79	2,00	2,34	1,47
TC76716	extensina	AL373614	1,15	3,08	2,59	1,64	3,51	2,12
TC77527	glicoproteína rica en hidroxiprolina	AL370995	0,77	1,19	NS	NS	2,50	1,56
TC79404	proteína rica en arabinogalactano	AL368602	1,00	2,08	5,16	3,33	3,37	2,97

			Tratamiento					
TC TIGR ^b	Función	N.º registro en GB ^c	AV ^d			AV+AV ^e		
			1	2	3	1	2	3
<u>Proteínas de pared</u>								
TC86688	proteína rica en arabinoqalactano	AL381434	1,00	1,94	4,04	0,75	NS	0,74
TC85413	proteína rica en prolina	AL386974	3,97	1,29	2,99	NS	1,60	2,59
TC86651	prolil hidrolada	AL367499	1,00	1,00	3,30	1,69	2,50	1,00
TC86689	endo-1,3-1,4-β-D-glucanasa	AL387547	1,62	1,89	2,09	1,19	2,51	2,00
<u>Defensa</u>								
TC76511	PR10-1	AL382676	1,72	5,69	4,40	3,43	1,54	2,15
TC76513	PR10-1	AL373773	2,14	12,14	2,69	3,29	3,04	1,18
-	PR10-1	Y08641	5,12	19,05	0,99	11,22	2,07	2,70
TC76833	endoquitinasa	AL380364	1,16	2,19	2,61	1,52	2,22	1,43
TC85427	quitinasa	AL388544	1,34	0,75	NS	0,50	NS	0,45
TC85652	SRG1	AL379718	1,41	1,40	NS	1,71	3,50	1,48
TC85805	Inhibidor de poligalacturonasa	AL381114	1,80	1,00	1,89	0,97	NS	1,00
TC86002	PR1	AL386306	1,00	1,00	5,22	1,63	2,81	1,00
TC86646	β-1,3-glucanasa	AL378026	1,09	1,00	NS	1,00	5,44	1,36
<u>Estrés oxidante</u>								
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	glutación peroxidasa	AL374155	0,88	1,43	1,40	NS	2,08	1,90
TC85451	glutación S-transferasa	AL368847	1,00	1,16	1,00	1,15	1,55	3,01
TC87485	análogo de germina	AL373691	NS	1,32	1,10	1,16	NS	NS
<u>Senescencia RH</u>								
TC78195	HSR203	AL366024	1,34	2,58	4,38	1,98	2,78	1,31
<u>Señalización de lípidos</u>								
TC76357	fosfolipasa D	AL383583, AL387293	1,60	1,39	1,44	2,75	5,49	2,40
TC77257	hidroperóxido liasa	AL372355	1,35	0,74	1,21	0,84	7,20	1,73
TC82008	fosfolipasa C	AL380498	1,00	1,04	NS	1,37	4,17	3,45
TC84245	lipoxigenasa	AL371045, AL389771	1,00	1,14	1,46	1,57	1,86	0,83
TC85148	lipoxigenasa	AL370268, AL381315	1,75	NS	1,11	2,04	2,03	1,03
TC85171	lipoxigenasa	AL378899, AL380164	1,00	NS	1,53	2,27	2,75	NS
TC85192	lipoxigenasa	AL387727	2,14	1,02	2,04	1,16	NS	1,00
TC85264	lipoxigenasa	AL371045, AL389771	1,00	1,14	1,46	1,20	1,57	1,86

			Tratamiento					
TC TIGR ^b	Función	N.º registro en GB ^c	AV ^d			AV+AV ^e		
			1	2	3	1	2	3
<u>Señalización de lípidos</u>								
TC85619	lipoxigenasa		1,00	1,93	2,05	1,44	NS	0,78
TC85808	oxofitodienoato reductasa		1,00	NS	1,00	1,49	1,92	4,42
TC85814	desaturasa	AL367066, AL377575	1,54	0,91	0,95	2,28	1,63	1,41
<u>Estreses abióticos</u>								
TC77019	ribonucleasa	AL371802	1,52	2,72	1,67	0,47	0,80	NS
<u>Transducción de señales</u>								
TC77346	proteína quinasa análoga a un receptor	AL383027, AL384392	1,66	1,44	4,89	1,28	NS	1,06
TC76783	calmodulina	AL378480	2,40	1,71	1,52	0,82	1,46	NS
TC76643	proteína de respuesta a ABA	AL373345	3,27	2,60	1,42	2,04	1,48	NS
TC86374	proteína de transporte ABC	AL365693	1,44	1,98	2,71	NS	1,16	NS
<u>Nodulina</u>								
TC76916	MtN4	AL376203	0,89	1,11	1,14	NS	1,63	1,58
<u>Otras</u>								
TC86776	β-glucosidasa cianogénica	AL370555	1,03	NS	1,00	1,38	1,65	1,00
TC78462	proteína unida al ácido nucleico	AL367624	1,00	NS	NS	NS	3,41	3,30
TC85305	acuaporina	AL370135	1,04	NS	NS	2,02	1,93	2,61
TC87062	ubiquinol-citocromo-c reductasa	AL386789	NS	4,41	4,54	3,81	8,96	NS

a: Valores correspondientes a los cocientes de las "intensidades de las señales de las plantas tratadas con el extracto de *Ulva* (AV)" con respecto a las "intensidades de las señales de las plantas control". Solamente se incluyen los genes inducidos (cociente >1,5) en al menos dos ensayos independientes. En la comparación de los inventores realizada en réplicas de tres experimentos, se considera que el cociente de un solo gen no debe inducirse en una réplica y estar reprimido como mínimo en una de las otras, de lo contrario se considera como no significativo (NS).

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

c: GB, número de registro en Genebank.

d: AV, un único tratamiento AV.

e: AV+AV, dos tratamientos AV consecutivos.

Ejemplo 3 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los estreses abióticos

- 5 La experimentación se llevó a cabo con maíz cultivado en macetas a 25 °C.
- El extracto de ulvanos se aportó por vía radicular o foliar 17 días después de la siembra.
- Cuatro días después del tratamiento, las plantas se sometieron a estrés hídrico o térmico (15 °C).
- 10 Las plantas se cosecharon 21 días después de la aplicación de los estreses en la fase de 8 hojas.
- Los resultados del experimento se presentan en la Tabla 4.
- 15 La aplicación de ulvanos permite luchar parcialmente contra las limitaciones hídricas y térmicas en respuesta a la expresión de los genes de los estreses oxidativos o abióticos.

Tabla 4: Efectos de los ulvanos en plantas de maíz en estado de estrés hídrico y térmico

		Peso seco de la planta (en índice)
Control sin estresar		100
Estrés hídrico		
Control sin ulvanos		60
		Peso seco de la planta (en índice)
Aportación foliar	Ulvanos 0,1 g/l	82
	Ulvanos 10 g/l	94
Aportación radicular	Ulvanos 10 g/ha	78
	Ulvanos 1000 g/ha	89
Estrés térmico		
Control sin ulvanos		67
Aportación foliar	Ulvanos 1 g/l	85
	Ulvanos 10 g/l	99
Aportación radicular	Ulvanos 10 g/ha	84
	Ulvanos 1000 g/ha	97

Ejemplo 4 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los oomicetos

5 El extracto de ulvanos se pulverizó (1 g por litro, es decir, 200 g/ha) sobre plantas de colza cultivadas en macetas en la fase 2 hojas.

10 El número de plántulas por tratamiento es de 28. La inoculación con *Pythium* (marchitamiento fúngico) se realizó 3 días después del tratamiento.

Las plántulas se clasificaron por observación según la escala de calificación siguiente:

0	Sin ataque
1	Necrosis superficial de longitud inferior a 1 cm
2	Necrosis superficial de longitud superior a 1 cm
3	Necrosis profunda de longitud inferior a 0,5 cm
4	Necrosis profunda de longitud inferior a 1 cm
5	Necrosis profunda de longitud superior a 1 cm

15 Los resultados obtenidos y presentados en la tabla 5 siguiente muestran que el extracto de ulvanos de acuerdo con la invención permite reducir significativamente la incidencia del ataque por *Pythium*, reduciendo la longitud y la profundidad de las necrosis.

Tabla 5 - Efectos del tratamiento con ulvanos sobre la colza infectada por *Pythium*

	Control	Ulvanos
Necrosis (índice)	2,92	1,61
Peso fresco de las plántulas (g)	0,49	0,69

20 La medida del peso fresco de las plántulas confirma también la mayor resistencia de la colza al ataque fúngico.

Ejemplo 5 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a otros ataques fúngicos

25 a) Interacciones en alfalfa (*Medicago truncatula*) - *Colletotrichum tritoli*

Para controlar si la inducción de la expresión de los genes implicados en la defensa por los ulvanos se correlaciona con protección, se realizó una inoculación de las plantas de *Medicago truncatula* por el hongo *Colletotrichum tritoli* (responsable de la antracnosis) en plantas de 1 mes.

- 5 Dos días después del último tratamiento con el extracto de ulvanos (1 g por litro), las plantas se inocularon mediante pulverización de una suspensión de esporas de *C. tritoli* de concentración 10^6 células/ml sobre las partes aéreas (1 ml/planta).

Los primeros síntomas se observaron a 7 días y 15 días después de la infección.

- 10 Un mes más tarde, se recogieron las partes aéreas que se pesaron para evaluar el grado de protección del material vegetal.

- 15 Quince días después de la inoculación, las partes aéreas de las plantas no tratadas están completamente necrosadas, y la mayoría de las plantas murieron. Por el contrario, solamente fueron visibles lesiones de pequeño tamaño en las hojas y tallos en el caso de los tratamientos (1 o 2 aportes). Las plantas inoculadas no tratadas aún vivas perdieron un 70 % de su peso fresco en comparación con las plantas control no inoculadas. Las plantas inoculadas y tratadas, por su parte, perdieron el 20 % y 10 %, respectivamente, de su peso fresco para uno o dos aportes.

- 20 Un solo tratamiento permite obtener una protección del 80 %, mientras que un segundo tratamiento aumenta la protección al 90 %.

- 25 Se obtiene, de acuerdo con el estudio genómico, una protección de las plantas pretratadas con el extracto de ulvano. Esta protección aumenta cuando las plantas se trataron dos veces consecutivas con este extracto antes de la infección.

b) Interacciones en guisantes - *Mycosphaerella pinodes*

- 30 El extracto de ulvanos (1 g por litro) se pulverizó sobre plantas de guisantes forrajeros en la fase 4 hojas. La inoculación se realizó 3 días después del tratamiento.

Se midió la longitud de la necrosis resultante del ataque, así como el peso fresco de la plántula.

- 35 Los resultados obtenidos y representados en la tabla 6 siguiente muestran que el extracto de ulvanos de acuerdo con la invención reduce la longitud de las necrosis en tallo.

El aumento de más de 25 % del peso fresco de las plántulas tratadas confirma la mayor resistencia de los guisantes al ataque de *Mycosphaerella*.

40

Tabla 6 - Efectos del tratamiento con ulvanos en guisante forrajero infectado por *Mycosphaerella*

	Longitud de la necrosis (mm)	Peso de la plántula (g)
<i>Control</i>	3,17	2,75
<i>Ulvanos</i>	1,79	3,45

c) Interacciones en el pimiento - *Phytophthora capsicum*

- 45 Las plantas de pimientos cultivadas en macetas se regaron con una solución de ulvanos a razón de 1 y 10 g por litro. La inoculación de *Phytophthora* se efectuó sobre la superficie inferior de las hojas 5 días después del tratamiento.

En los tres días siguientes a la inoculación, se observó una disminución significativa del tamaño de las necrosis, como muestra la tabla 7 siguiente.

50

Tabla 7 - Evolución del diámetro de las necrosis en plantas de pimientos después del tratamiento con ulvanos.

	<i>Control</i>	<i>Ulvanos</i>	
		1 g/l	10 g/l
Diámetro de las necrosis (mm)	29	17	8

d) Interacciones en la vid - *Plasmopara viticola*

- 55 Las plantas de vides cultivadas en macetas de invernadero se trataron con una solución de ulvanos (1 g por litro).

El tratamiento se realizó en 1 o 2 aportes en forma de pulverización foliar. La segunda aportación se realizó una semana después del primer tratamiento.

La inoculación por *Plasmopara viticola* se realizó 4 días después del último tratamiento.

Un mes después de la contaminación, el tratamiento con la solución de ulvanos (una aportación) permitió reducir:

- la relación de hojas infectadas en un 32 %,
- la superficie de hojas afectada en un 35 %,
- y la tasa de esporulación del 41 %.

El doble tratamiento mejoró los resultados con reducciones del porcentaje de hojas infectadas en un 47 %, de la superficie de hojas afectada en un 46 % y del tipo de esporulación en un 52 %.

Ejemplo 6 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los ataques bacterianos

Un extracto de ulvanos de acuerdo con la invención (1 g por litro) se pulverizó sobre plantas de tomate. Veinticuatro horas después, las plantas se inocularon con *Pseudomonas syringae*. La concentración bacteriana de las hojas se determinó a 1, 3, 5 y 7 días después de la inoculación por recuento de las colonias bacterianas.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8 siguiente.

Tabla 8 - Número de bacterias por unidad de superficie foliar (nb/cm²)

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	1	3	5	7
Control	18000	136000	385000	520000	636000
Producto	24000	95000	224000	312000	440000

El tratamiento de acuerdo con la invención permite reducir el nivel de contaminación en casi el 31 % después de 7 días de incubación.

Ejemplo 7 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los insectos y patógenos transmitidos (virus, fitoplasma)

La experimentación se llevó a cabo con rosales cultivados en macetas de invernadero. Las plantas se trataron con un extracto de ulvanos preparado de acuerdo con el ejemplo 1 (0,1 g por litro o 10 g por litro) en comparación con un control de agua.

Se contaron a continuación el número de pulgones por hoja. Los resultados obtenidos, representados en la tabla 9 siguiente, muestran que los ulvanos limitan la invasión de los pulgones en las plantas tratadas para el conjunto de tratamientos. A la concentración de 0,1 g por litro, el número de pulgones se redujo en un 35 % en el caso del tratamiento único y en el 42 % en el caso de doble tratamiento. A la concentración de 10 g por litro, la reducción fue del 43 % y 58 % respectivamente sobre el promedio de pulgones.

Tabla 9 -Efecto del tratamiento con ulvanos sobre los pulgones

		Aportación foliar	Reducción del número de pulgones (en % del control)
Ulvanos	0,1 g/l	1 aportación	35
		2 aportaciones	42
	10 g/l	1 aportación	43
		2 aportaciones	58

Ejemplo 8 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los ácaros

El ensayo se realizó en plantas de fresa cultivadas en invernaderos en una zona naturalmente sensible al desarrollo de ácaros (*Tetranychus urticae*). La aportación del extracto de ulvanos se realizó a dos concentraciones (0,1 y 10 g por litro) en una o dos aportaciones, separadas una semana entre sí.

Se midió el número de ácaros por hoja.

Los resultados obtenidos, presentados en la tabla 10 siguiente, muestran que los ulvanos limitan la invasión de los ácaros en las plantas tratadas para el conjunto de tratamientos. A la concentración de 0,1 g por litro, el número de ácaros se redujo en un 33 % en el caso del tratamiento único y en el 46 % en el caso de doble tratamiento. A la concentración de 10 g por litro, la reducción fue del 50 % y 63 % respectivamente sobre el promedio de ácaros por hoja.

Tabla 10 - Efecto del tratamiento con ulvanos en plantas de fresa infectadas por ácaros

		Aportación foliar	Número de ácaros por hoja
<i>Control (agua)</i>			52
<i>Ulvanos</i>	0,1 g/l	1 aportación	35
		2 aportaciones	28
	10 g/l	1 aportación	26
		2 aportaciones	19

Ejemplo 9 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la defensa de las plantas frente a los nematodos

Se trasplantaron plantas de tomate de aproximadamente 10 cm a un medio infestado con *Meloidogyne incognita*.

Las plantas se trataron bien por la vía foliar o bien mediante la incorporación al medio nutritivo de fertirrigación, a una dosis de 1 g por litro.

La segunda aportación del tratamiento se realizó 15 días después de la primera aportación.

El número de nematodos se determinó 1,5 meses después del primer tratamiento.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11 - Efecto del tratamiento con ulvanos sobre plantas de tomate infestadas por nematodos

		Número de nematodos / g de raíces
<i>Control</i>		15
<i>Aportación foliar</i>	1 aportación	12
	2 aportaciones	9
<i>Aportación de fertirrigación</i>	1 aportación	10
	2 aportaciones	7

El extracto de ulvanos redujo significativamente el grado de infección de las raíces de plantas de tomate por los nematodos del 20 al 53 % en función de los tratamientos.

Una segunda aportación siempre es más eficaz que una sola.

El extracto de ulvanos refuerza la resistencia de la planta a los nematodos, bloqueando su penetración y su desarrollo en la raíz.

Ejemplo 10 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la protección de las semillas

Se ha demostrado que los ulvanos tienen una acción favorable sobre la germinación de semillas contaminadas con agentes patógenos, en el ejemplo, *Sclerotinia* en girasol, *Phoma lingam* en colza y *Mycosphaerella pinodes* en guisante.

El tratamiento de semillas se realizó por inmersión (durante 12 horas en una solución de ulvanos de 1 g por litro).

En el caso del control, el tratamiento se realizó con agua destilada. La inoculación de hongos se llevó a cabo inmediatamente antes de la siembra.

Se midió el porcentaje de germinación y la tasa de supervivencia de las semillas infectadas, y los resultados obtenidos se agrupan en la tabla 12 siguiente.

Tabla 12: Efectos de los ulvanos sobre la protección de las semillas

	Girasol - <i>Sclerotinia</i>		Colza - <i>Phoma linguam</i>		Guisante - <i>Mycosphaerella</i>	
	Control	Ulvanos	Control	Ulvanos	Control	Ulvanos
% de germinación	38	80	63	88	67	89
Tasa de supervivencia (%)	0	47	29	61	42	64

En el girasol, la inoculación de *Sclerotinia* afectó considerablemente el porcentaje de germinación (38 %). El tratamiento con ulvanos mejora considerablemente la tasa de germinación (80 %). Refuerza también el vigor de las plántulas con una tasa de supervivencia del 47 % comparado con una mortalidad total para el control.

En la colza infestada con *P. linguam*, el tratamiento con ulvanos aumentó un 40 % la tasa de germinación, así como la tasa de supervivencia que sube del 29 % para el control al 61 %.

En el guisante infestado por *el Sr. pinodes*, el tratamiento con ulvanos mejoró un 33 % la tasa de germinación, así como la tasa de supervivencia, que pasa del 42 % al 64 %.

En el caso del guisante, también se observó que la profundidad de la necrosis pasaba de 52 mm a 2,9 mm, lo que indica una desaceleración del crecimiento del hongo en la planta.

En consecuencia, los ulvanos inducen una mayor resistencia de las semillas a los ataques de hongos.

Ejemplo 11 - Puesta de manifiesto de los efectos de los ulvanos sobre la protección de frutas y hortalizas tras la cosecha

El efecto de los ulvanos sobre la conservación de frutas (manzanas, naranjas, tomates y uva) se somete a seguimiento en cámaras climáticas mantenidas a 17 °C. Se realizó un tratamiento por inmersión en una solución de ulvanos a la concentración de 10 g por litro.

Las frutas tratadas o control se inocularon con una solución de esporas de *Botrytis cinerea* concentrada a 10⁵/ml. La inoculación se realizó una semana después del tratamiento.

Las frutas se controlaron transcurridos 3 meses para las manzanas y 1 mes para las naranjas, tomates y uvas.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13 siguiente.

Tabla 13: Efectos de los ulvanos sobre la protección de frutas y hortalizas tras la cosecha

Frutas	Índice de protección (en % de control inoculado)
<i>Manzanas</i>	65 %
<i>Naranjas</i>	38 %
<i>Tomates</i>	42 %
<i>Uvas</i>	47 %

El tratamiento con ulvanos permitió una reducción, respectivamente, del 65 %, 38 %, 42 % y 47 % de los daños posteriores a la cosecha en manzanas, naranjas, tomates y uvas.

El tratamiento con "ulvanos" previene y retrasa la aparición de daños en las frutas durante su conservación. De esta forma, mejora su tiempo de conservación.

En consecuencia, la aplicación de los ulvanos de acuerdo con la invención también permite reducir los daños posteriores a la cosecha debidos a enfermedades o ataques de agentes patógenos.

Ejemplo 12 - Ejemplos de formulaciones que incorporen ulvanos

De una manera general, la cantidad efectiva de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos a utilizar en el marco de las aplicaciones de la invención será de 0,1 g a 100 g por litro para las aportaciones en forma líquida para aplicación foliar o en las soluciones de aplicación radicular (cultivo hidropónico, riego por goteo, ...). Preferentemente, esta cantidad será de 0,1 a 20 g por litro, y más preferentemente de 0,5 a 10 g por litro.

De una manera general, la cantidad efectiva de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos a utilizar en el marco de las aplicaciones de la invención será de 10 a 1000 g/ha para las aportaciones en forma sólida en productos

pulverulentos o granulados. Preferentemente, esta cantidad será de 50 a 500 g/ha, y más preferentemente de 150 a 250 g/ha.

Se proporcionan a continuación, a modo de ejemplo, diferentes formulaciones que se pueden utilizar de acuerdo con la invención con indicaciones sobre las condiciones de aplicación de dichas formulaciones.

A - ENMIENDAS

ENMIENDA CALIZA

10	Lithothamnium	1000 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 200 g/ha
	Dosis de aportación:	1 T/ha
15	Carbonato de calcio	1000 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 1000 g/ha
	Dosis de aportación:	1 T/ha

ENMIENDA ORGÁNICA Y SOPORTES DE CULTIVO

20	Sustrato	500 kg
	Turba	500 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 500 g/ha
	Dosis de aportación:	1 T/ha

B – ABONOS RADICULARES

ABONOS NP

30	Lithothamnium	310 kg
	Cloruro de potasio	167 kg
	Urea	161 kg
	Sulfato de amonio	362 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 200 g/ha

35

CULTIVOS	Dosis de la aportación (kg/ha)
Pastos Cereales Maíz	200 - 400

ABONOS PK

40	Lithothamnium	297 kg
	Fosfato natural	536 kg
	Cloruro de potasio	167 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 500 g/ha

CULTIVOS	Dosis de la aportación (kg/ha)
Todos los cultivos	300 - 500

45 ABONOS NPK + MgO

50	Lithothamnium	158 kg
	Fosfato de amonio	116 kg
	Sulfato de amonio	186 kg
	Urea	156 kg
	Óxido de magnesio	50 kg
	Cloruro de potasio	334 kg
	Derivados de ulvanos	suficiente hasta 1000 g/ha

CULTIVOS	Dosis de la aportación (kg/ha)
Maíz Cereales Praderas Todos los cultivos	400 - 800

55

C – ABONOS FOLIARES

SOLUCIÓN Mg

5

Nitrato de magnesio 50 kg
 Agua 50 kg
 Derivados de ulvanos cantidad suficiente hasta 1 g/l (solución final aplicada a la planta)

CULTIVOS	Número de aportes en diferentes etapas de la campaña	Dosis por aportación
Frutales	3 - 6	8 l/ha
Cultivos hortícolas	2 - 6	5 - 8 l/ha

10

Solución de N Fe Mn

15

Nitrato de manganeso 15 kg
 Cloruro férrico 25 kg
 Agua 60 kg
 Derivados de ulvanos cantidad suficiente hasta 0,1 g/l (solución final aplicada a la planta)

CULTIVOS	Número de tratamientos	Dosis por tratamiento
Frutales	4 - 6	3 - 6 l/ha
Cultivos hortícolas	4 - 6	3 - 6 l/ha

20

Solución de N Mn Zn

25

Nitrato de manganeso 31 kg
 Nitrato de zinc 22 kg
 Agua 47 kg
 Derivados de ulvanos cantidad suficiente hasta 10 g/l (solución final aplicada a la planta)

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aportación
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
Judías verdes	2 - 3	4 - 8 l/ha

Solución NPK Oligoelementos

30

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 cantidad suficiente hasta 1 g/l (solución final aplicada a la planta)

35

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aportación
Cultivos hortícolas	5 - 10	4 - 6 l/ha
Frutales	4 - 6	4 - 6 l/ha

SOLUCIÓN BPK

5	Potasa	8 kg	
	Ácido fosfórico	1 kg	
	Ácido bórico	1 kg	
	Agua	90 kg	
	Derivados de ulvanos	cantidad suficiente hasta 10 g/l (solución final aplicada a la planta)	

CULTIVOS	Número de aportes	Dosis por aportación
Cultivos hortícolas	2 - 4	3 - 5 l/ha
Cultivos frutales	3	5 l/ha

10 D - SOLUCIONES NUTRITIVAS RADICULARES (CULTIVOS HIDROPÓNICOS, RIEGO POR GOTEO)

SOLUCIÓN NPK Mg

15	Nitrato de potasio	50 g/l	
	Fosfato de potasio	27 g/l	
	Sulfato de magnesio	49 g/l	
	Derivados de ulvanos	200 g/l (es decir, 1 g/l de solución final aplicada a la planta)	

Dilución 1 l en 200 l de agua

20

SOLUCIÓN N Ca Mg

25	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 a la planta)	

Dilución 1 l en 200 l de agua

REIVINDICACIONES

1. Uso de ulvanos, o de oligosacáridos derivados de ulvanos obtenidos mediante hidrólisis ácida o enzimática de dicho ulvano, como activadores de las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los ulvanos anteriormente mencionados se extraen de algas seleccionadas del grupo formado por las siguientes especies: *Ulva armoricana*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* y *Enteromorpha compressa*.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los ulvanos anteriormente mencionados se extraen de algas seleccionadas del grupo formado por las siguientes especies: *Ulva armoricana*, *Enteromorpha intestinalis* y *Enteromorpha compressa*.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado por que** los extractos anteriormente mencionados se obtienen mediante un procedimiento que incluye generalmente los siguientes pasos: lavado, trituración, extracción.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado por que** los extractos anteriormente mencionados se obtienen mediante un procedimiento que incluye generalmente los siguientes pasos: lavado, trituración, extracción (separación sólido-líquido), fraccionamiento y concentración.
6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la cantidad eficaz de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos aportada a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro para las aportaciones en forma líquida, por vía foliar, en soluciones nutritivas radiculares o en soluciones de tratamiento de semillas o después de la cosecha, o bien de 10 a 1000 g por hectárea para las aportaciones en forma sólida, en productos pulverulentos o granulados.
7. Procedimiento para activar las reacciones de defensa de las plantas y de resistencia contra las limitaciones bióticas o abióticas, **caracterizado por que** incluye la aplicación a dichas plantas, de una cantidad eficaz de ulvanos u oligosacáridos derivados de ulvanos obtenidos mediante hidrólisis ácida o enzimática de dicho ulvano.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** 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 por que** la cantidad eficaz aportada a las plantas es de 0,1 g a 100 g por litro para las aportaciones en forma líquida, por vía foliar, en soluciones nutritivas radiculares o en soluciones de tratamiento de semillas o después de la cosecha, o bien de 10 a 1000 g por hectárea para las aportaciones en forma sólida en productos pulverulentos o granulados.