

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 728**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 43/16</b>	(2006.01) <b>C07H 5/06</b>	(2006.01)
<b>A01N 47/12</b>	(2006.01) <b>C08B 37/08</b>	(2006.01)
<b>A01N 47/24</b>	(2006.01) <b>C08B 37/00</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/40</b>	(2006.01)	
<b>A01N 43/42</b>	(2006.01)	
<b>A01N 43/56</b>	(2006.01)	
<b>A01N 57/10</b>	(2006.01)	
<b>A01N 59/00</b>	(2006.01)	
<b>A01N 59/02</b>	(2006.01)	
<b>C07H 3/06</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2012 E 12704719 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2667718**

54 Título: **Composición que comprende un elicitor del sistema inmunitario de plantas**

30 Prioridad:

**24.01.2011 EP 11151836**

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

**30.06.2016**

73 Titular/es:

**FYTOFEND S.A. (100.0%)  
Rue Phocas Lejeune 25-6  
5032 Isnes, BE**

72 Inventor/es:

**BUONATESTA, RAFFAELE;  
VAN AUBEL, GÉRALDINE y  
VAN CUTSEM, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

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

**ES 2 575 728 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

Composición que comprende un elicitador del sistema inmunitario de plantas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a nuevas composiciones para proteger a plantas frente a patógenos de plantas, que comprende esencialmente un elicitador de plantas particular, y al uso de estas composiciones en aplicaciones agrícolas, más particularmente para proteger a plantas frente a (la infección por) patógenos de plantas y a los métodos correspondientes de, y a los usos en, la protección de plantas y cultivos mediante la aplicación de estas composiciones.

### Antecedentes de la invención

10 Los patógenos de plantas pueden provocar un grave daño en la agricultura, dando como resultado pérdidas críticas de rendimiento, calidad y beneficios. Son ejemplos los hongos fitopatógenos que pertenecen en su mayoría a los ascomicetos, incluyendo los agentes causales de mildiú vellosos de diversas plantas, los basidiomicetos, incluyendo los agentes causales de graves royas de prácticamente todos los granos de cereales y hierbas cultivadas y los deuteromicetos (hongos imperfectos), incluyendo *Fusarium*, *Botrytis* y *Verticillium*. Son patógenos adicionales los oomicetos, que no son verdaderos hongos sino organismos similares a hongos que usan los mismos mecanismos que los hongos para infectar las plantas. Incluyen algunos de los patógenos de plantas más destructores incluyendo *Phytophthora infestans*, el agente causal del tizón tardío de la patata y *Plasmopara viticola*, el agente causal del mildiú lanuginoso de la vid. Además de los hongos, también las bacterias incluyendo los géneros *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*, los virus incluyendo el virus del mosaico del pepino, el virus del mosaico amarillo de la cebada, virus del amarilleo marginal tenue del fresal, virus latente del mosaico anular del fresal, virus del amarilleo necrótico de la remolacha y virus Y de la patata, insectos incluyendo escarabajos, gusanos de la raíz, saltamontes, langostas, barrenadores (de tallos), pulgones, ácaros, garrapatas, hormigas, moscas blancas, larvas, gorgojos, quironómidos, orugas, mariposas, minadores de las hojas, cigarreros, chinches y protistas plasmodiofóridos incluyendo los géneros *Polymyxa*, *Plasmodiophora* y *Spongospora* son importantes patógenos de plantas.

Las plantas responden a la infección por patógenos activando su sistema inmunitario innato. Los sistemas de defensa de las plantas reconocen patrones moleculares que son comunes para muchas clases de patógenos, por ejemplo quitina fúngica, y pueden responder a factores de virulencia específicos de patógenos (efectores). El reconocimiento de patógenos desencadena regulación de canales iónicos, estallido oxidativo, cambios redox celulares, cascadas de proteína cinasas y otras respuestas que o bien activan directamente cambios celulares tales como refuerzo de la pared celular, o bien activan cambios en la expresión génica que conducen a la formación de compuestos defensivos, por ejemplo dirigidos a luchar contra la infección o a hacer que la planta sea menos atractiva para los patógenos.

35 Cabrera y colaboradores notificaron a este respecto sobre la existencia de un elicitador de plantas en la solicitud de patente internacional WO2008/065151, que potenciaba el sistema de defensa de las plantas. Además, la solicitud de patente europea EP1358801 notifica sobre la existencia de otro elicitador de plantas.

El papel de las peroxidasas en la protección de plantas frente a patógenos es de suma importancia. Las peroxidasas experimentan dos posibles ciclos catalíticos que implican o bien el consumo o bien la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y especies de oxígeno reactivas. Las especies de oxígeno reactivas pueden actuar directamente sobre los patógenos y se sabe además que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un mediador de la transducción de señales en el establecimiento de la defensa de las plantas. Además, las peroxidasas pueden controlar la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la pared celular, lo que es un requisito previo para la reticulación de grupos fenólicos en la pared celular. La reticulación mediada por peroxidasas de diferentes compuestos en la pared celular garantiza el refuerzo de la barrera frente a la penetración de patógenos. También se sabe que las peroxidasas están implicadas en la producción de fitoalexinas, que son compuestos antibióticos producidos por plantas en condiciones de estrés. Por tanto, resulta de interés estimular el sistema inmunitario de las plantas para controlar enfermedades provocadas por parásitos o patógenos tales como hongos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos.

Las enfermedades fúngicas y enfermedades provocadas por oomicetos pueden controlarse también a través del uso de fungicidas en agricultura. Los fungicidas son compuestos químicos o sustancias biológicas usados para destruir o inhibir hongos u oomicetos o sus esporas. Los fungicidas a veces también tienen un efecto sobre otros patógenos de plantas tales como bacterias, virus, nematodos o insectos. Un inconveniente del uso de determinados fungicidas es que pueden encontrarse residuos de fungicidas en alimentos para consumo humano, representando a veces un peligro para la salud de seres humanos o animales.

Por tanto, es de gran interés en agricultura mejorar los rendimientos de los fungicidas químicos, en particular en cuanto a la actividad biológica, con el objetivo de disminuir las cantidades de componente activo que ha de usarse.

### Sumario de la invención

Los inventores han encontrado ahora inesperadamente que añadiendo un elicitor de oligosacárido del sistema inmunitario de plantas que comprende oligo-galacturonanos estabilizados por quito-oligosacáridos, a determinados fungicidas, se amplifica la eficacia del fungicida. Esto implica que el uso de dicha composición de elicitor da como resultado una alta reducción en la cantidad de fungicidas necesaria debido a la potencia mejorada de los mismos.

5 Aplicar el fungicida a una tasa reducida, conduce a una cantidad reducida de residuos de fungicida en las plantas, lo que es beneficioso para la salud de seres humanos y animales y el medio ambiente en general. Además, mediante la adición del elicitor, se activa el sistema inmunitario de plantas, reflejado particularmente por su actividad peroxidasa aumentada, que no se logra a través de la aplicación del fungicida solo. Este efecto sinérgico del elicitor sobre el fungicida hace que la planta sea más resistente a los ataques de patógenos y por tanto proporcionará a la  
10 larga un rendimiento aumentado del cultivo.

La invención prevé por tanto los siguientes aspectos:

Aspecto 1. Una composición para proteger a plantas frente a patógenos de plantas que comprende:

15 a) un elicitor que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, y

20 b) un fungicida seleccionado del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1*H*-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-*N,N*-dimetil-5-(4-metilfenil)-1*H*-imidazol-1-sulfonamida; *N*-(triclorometiltio)-ftalimida; complejo (polimérico) de etilendis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (*E*)-metoxiimino-{(*E*- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*m*-tolil)etilidenaminoxil]-*o*-tolil]acetato de metilo; y una combinación de los mismos,

c) opcionalmente sales y/o azúcar,

d) opcionalmente, un elicitor para la defensa de plantas adicional tal como laminarina o silicato de sodio.

25 Aspecto 2. La composición según el aspecto 1, que comprende además un coformulante seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes, agentes de mojado de tipo iónico o no iónico, agentes anticongelantes, agentes conservantes, agentes absorbentes, espesantes, tampones, agentes adhesivos, diluyentes o una mezcla de los mismos, preferiblemente un tensioactivo seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes o agentes de mojado  
30 de tipo iónico o no iónico, o una mezcla de los mismos.

35 Aspecto 3. La composición según el aspecto 2, en la que dicho tensioactivo comprende uno o más de los siguientes componentes: etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales del ácido naftalenosulfónico, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucosido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, dioctilsulfosuccinatos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano, preferiblemente etoxilato de aceite de ricino C18, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano.

Aspecto 4. Uso de la composición según cualquiera de los aspectos 1 a 3 en aplicaciones agrícolas, o para proteger a plantas frente a patógenos de plantas.

40 Aspecto 5. Uso según el aspecto 4, en el que dichos patógenos de plantas se seleccionan del grupo que comprende: hongos fitopatógenos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos.

Aspecto 6. Uso de la composición según cualquiera de los aspectos 1 a 3 para potenciar la eficacia de dicho fungicida en dicha composición, o para estimular el sistema inmunitario de plantas.

45 Aspecto 7. Un método para proteger a plantas frente a patógenos de plantas, que comprende aplicar una cantidad eficaz y sustancialmente no fitotóxica de la composición según cualquiera de los aspectos 1 a 3 a dichas plantas.

Aspecto 8. El método según el aspecto 7, en el que dichos patógenos de plantas se seleccionan del grupo que comprende: hongos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos,

50 Aspecto 9. Un método para potenciar la eficacia de un fungicida, que comprende añadir un elicitor que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, a dicho fungicida, en el que dicho fungicida se selecciona del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1*H*-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-*N,N*-dimetil-5-(4-metilfenil)-1*H*-imidazol-1-sulfonamida; *N*-

(triclorometilto)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (*E*)-metoxiimino-[(*E*)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*m*-tolil)etilidenaminoxil]-*o*-tolil]acetato de metilo; o una combinación de los mismos.

5 Aspecto 10. El método según cualquiera de los aspectos 7 a 9, en el que la composición se aplica antes de la cosecha o tras la cosecha a la planta completa, las hojas, las flores, frutos, semillas, plántulas o trasplante repicado de plántulas, material de propagación tal como tubérculos o rizomas, trasplante repicado de plantas, y/o al suelo o sustrato inerte en el que la planta está creciendo o en el que se desea que crezca, mediante pulverización, rociado, empapado, inmersión, inyección o administración a través de sistemas de fertilización o irrigación.

10 Aspecto 11. El método según cualquiera de los aspectos 7 a 10, en el que dicha planta se selecciona del grupo que comprende: algodón, lino, vid, frutas, verduras, principales cultivos hortícolas y forestales tales como: *Rosaceae* sp., *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp., *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp., *Musaceae* sp., *Rubiaceae* sp., *Theaceae* sp., *Sterculiaceae* sp., *Rutaceae* sp., *Solanaceae* sp., *Vitaceae* sp., *Liliaceae* sp., *Asteraceae* sp., *Umbelliferae* sp., *Cruciferae* sp., *Chenopodiaceae* sp., *Cucurbitaceae* sp., *Papilionaceae* sp., tal como *Graminae* sp., *Fabaceae* sp.

15 Aspecto 12. Uso de un elicitor que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, para potenciar la eficacia de un fungicida, en el que dicho fungicida se selecciona del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1*H*-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-*N,N*-dimetil-5-(4-metilfenil)-1*H*-imidazol-1-sulfonamida; N-(triclorometilto)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (*E*)-metoxiimino-[(*E*)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*m*-tolil)etilidenaminoxil]-*o*-tolil]acetato de metilo; o una combinación de los mismos.

20 Aspecto 13. El uso según el aspecto 12, en el que dicha composición comprende adicionalmente un tensioactivo seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes o agentes de mojado de tipo iónico o no iónico, o una mezcla de los mismos.

25 Aspecto 14. El uso según el aspecto 13, en el que dicho tensioactivo comprende uno o más de los siguientes componentes: etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales del ácido naftalenosulfónico, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucósido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, diocilsulfosuccinatos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano.

30 Las composiciones tal como se definen en el presente documento pueden proporcionarse en una única mezcla, o pueden ser una combinación de dos o más mezclas o composiciones independientes, que pueden aplicarse a la planta o el sustrato simultáneamente o de manera secuencial. Por ejemplo, una composición que comprende un elicitor y un fungicida tal como se define en el presente documento puede administrarse simultáneamente, o el elicitor puede aplicarse en primer lugar, seguido por el fungicida, o viceversa.

35 La presente invención se ejemplificará adicionalmente mediante la siguiente descripción, los dibujos y ejemplos, que no deben considerarse limitativos. El experto podrá diseñar una realización alternativa usando el concepto general de la presente invención. Dichos conceptos alternativos también forman parte de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1: Protección (expresada como la reducción de la esporulación en las hojas con relación a plantas no tratadas) de plantas de patata hechas crecer en el campo frente a *P. infestans* ofrecida por un elicitor, un fungicida (Infinito) aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una tercera parte de la dosificación recomendada) y una mezcla de ambos. El elicitor solo no reduce los síntomas, mientras que en combinación con el fungicida, la eficacia del fungicida se mejora claramente y especialmente se mantiene más tiempo.

45 Figura 2: Protección (expresada como la reducción de la esporulación en las hojas con relación a plántulas no tratadas) de plántulas de vid frente a *P. viticola* ofrecida por un elicitor, un fungicida (Aliette) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una cuarta parte de la dosis recomendada) y una mezcla de ambos. La combinación del elicitor y el fungicida conduce a una reducción casi completa de los síntomas, incluso cuando el fungicida se aplica a una cuarta parte de la dosis recomendada.

50 Figura 3: Media de aparición de enfermedad en hojas desprendidas de *Solanum tuberosum* (var. Bintje) después de 2 tratamientos con elicitor, fungicida (Aliette) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una décima parte de la dosis recomendada) o una combinación de ambos, 6 y 8 días después de la inoculación con *P. infestans* a  $10^4$  esporas/mL.

55 Figura 4: Media de aparición de esporulación en hojas desprendidas de *Solanum tuberosum* (var. Bintje) después de

2 tratamientos con elicitor, fungicida (Aliette) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una décima parte de la dosis recomendada) o una combinación de ambos, 6 y 8 días después de la inoculación con *P. infestans* a  $10^4$  esporas/mL.

5 Figura 5: Porcentaje de superficie foliar con esporulación en hojas desprendidas de *Solanum tuberosum* (var. Bintje) después de 2 tratamientos con elicitor, fungicida (Aliette) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una décima parte de la dosis recomendada) o una combinación de ambos, 6 y 8 días después de la inoculación con *P. infestans* a  $10^4$  esporas/mL.

10 Figura 6: Gravedad de la plaga (expresada como el porcentaje de la superficie foliar colonizada por la enfermedad) provocadas por *Septoria tritici* sobre trigo de invierno tras el tratamiento con fungicida (Opus) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una cuarta parte), elicitor o una combinación de ambos.

Figura 7: Incidencia de la plaga (expresada como el porcentaje de hojas con síntomas de la enfermedad) provocadas por *Septoria tritici* sobre trigo de invierno tras el tratamiento con fungicida (Opus) aplicado a una tasa reducida (aproximadamente una cuarta parte), elicitor o una combinación de ambos.

15 Figura 8: Comparación de la actividad peroxidasa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Saint-Pierre) tratadas con elicitor, fungicida (Aliette) aplicado a tasas reducidas (remítase al ejemplo 5) o una combinación de ambos. Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de hojas de tomate 24 horas después del tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron los datos con un Anova,  $p < 0,05$  y barras con diferentes letras (por ejemplo "a" o "b") se consideran que son significativamente diferentes entre sí.

20 Figura 9: Efectos del elicitor aplicado solo o en combinación con un fungicida (Aliette) sobre la actividad peroxidasa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Saint-Pierre). Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Saint-Pierre) 24 horas después del tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron los datos con un Anova,  $p < 0,05$  y barras con diferentes letras (por ejemplo "a" o "b") se consideran que son significativamente diferentes entre sí.

25 Figura 10: Efecto de tensioactivos sobre la actividad peroxidasa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Saint-Pierre) inducida por el elicitor. Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Saint-Pierre) 24 horas después del tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron los datos con un Anova,  $p < 0,05$  y barras con diferentes letras (por ejemplo "a" o "b") se consideran que son significativamente diferentes entre sí.

30 Figura 11: Efecto de un segundo elicitor (Vacciplant Fruit) sobre la actividad peroxidasa de plantas de patata (*Solanum tuberosum*, var. Bintje) inducida por el elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano. Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de hojas de patata 3 días después del segundo tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron los datos con un Anova,  $p < 0,05$  y barras con diferentes letras (por ejemplo "a" o "b") se consideran que son significativamente diferentes entre sí.

35 Figura 12: Eficacia del elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano en el control de *Chaetosiphon fragaefolii* (pulgones) sobre fresal (cultivar Anaïs). Se muestra el desarrollo de los pulgones 19 días después de la inoculación en fresal no tratado y fresal tratado dos veces (a los 7 días y 1 día antes de inoculación) con el elicitor.

40 Figura 13: Eficacia del elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano en el control de *Chaetosiphon fragaefolii* (pulgones) sobre fresal (cultivar Anaïs). Se muestra el desarrollo de los pulgones 26 días después de la inoculación en fresal no tratado y fresal tratado dos veces (a los 7 días y 1 día antes de inoculación) con el elicitor.

45 Figura 14: Protección (expresada como la reducción de la frecuencia de plagas en comparación con plántulas no tratadas) de plántulas de pepino frente a *Sphaerotheca fuliginea* ofrecida por un fungicida (LEGEND) aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una vigésima parte de la tasa recomendada máxima), un elicitor (elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo Dehscofix CO 95), o una combinación de ambos. Se evaluó la frecuencia de plagas 7 días después del tratamiento, cuando sólo se produjo infestación natural.

50 Figura 15: Protección (expresada como la reducción de gravedad de la plaga en comparación con plántulas no tratadas) de plántulas de pepino frente a *Sphaerotheca fuliginea* ofrecida por un fungicida (LEGEND) aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una vigésima parte de la tasa recomendada máxima), un elicitor (elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo Dehscofix CO 95), o una combinación de ambos. Se evaluó la gravedad de la plaga 7 días después del tratamiento, cuando sólo se produjo infestación natural.

55 Figura 16: Protección (expresada como la reducción de la frecuencia de plagas en comparación con plántulas no tratadas) de plántulas de pepino frente a *Sphaerotheca fuliginea* ofrecida por un fungicida (LEGEND) aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una vigésima parte de la tasa recomendada máxima), un elicitor (elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo

Dehscifix CO 95), o una combinación de ambos. Se evaluó la frecuencia de plagas 18 días después del tratamiento, cuando se produjo infestación natural y también inoculación artificial.

Figura 17: Protección (expresada como la reducción de gravedad de la plaga en comparación con plántulas no tratadas) de plántulas de pepino frente a *Sphaerotheca fuliginea* ofrecida por un fungicida (LEGEND) aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una vigésima parte de la tasa recomendada máxima), un elicitor (elicitador de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo Dehscifix CO 95), o una combinación de ambos. Se evaluó la gravedad de la plaga 18 días después del tratamiento, cuando se produjo infestación natural y también inoculación artificial.

Figura 18: Protección (expresada como la reducción de la frecuencia y la intensidad de mildiú veloso en hojas en comparación con vides no tratadas) de vides frente a *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) tras el tratamiento con un fungicida que contiene azufre (THIOVIT), un elicitor (elicitador de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo Dehscifix CO 95), o una mezcla de ambos. Se realizó la evaluación de las hojas seis semanas después de que apareciesen los primeros síntomas de mildiú veloso en el control (vides no tratadas).

Figura 19: Comparación de la actividad peroxidasa de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Moneymaker) tras el tratamiento de las plantas de tomate con agua destilada (control) (A), un adyuvante (tensioactivo Dehscifix CO 95, al 0,1% (v/v)) (B), un elicitor (elicitador de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano, 62,5 ppm) (C), o una combinación del elicitor (62;5 ppm) con el adyuvante (0,1% (v/v)) (D). Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de las hojas de tomate 24 horas después del tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E.

Figura 20: Comparación de la actividad peroxidasa de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Moneymaker) tras el tratamiento de las plantas de tomate con un adyuvante (tensioactivo Dehscifix CO 95) (A), un elicitor de oligosacárido (quito-oligosacárido - oligo-galacturonano, 50 ppm) aplicado como una formulación con el adyuvante (B), un elicitor de silicio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) aplicado a 2 mM (C) o 5 mM (D) como una formulación con el adyuvante, o una combinación del adyuvante, el elicitor de oligosacárido (50 ppm) y el elicitor de silicio aplicado a 2 mM (E) o 5 mM (F), o una combinación del elicitor con el adyuvante. Se muestra la actividad peroxidasa normalizada de las hojas de tomate 24 horas después del tratamiento de las plantas tal como se indica. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E.

Figura 21: Protección de hojas de patata (*Solanum tuberosum* var. Bintje) frente a *P. infestans* ofrecida por un elicitor de oligosacárido (quito-oligosacárido - oligo-galacturonano) aplicado como una formulación con un adyuvante (tensioactivo Tensiofix DP400), el fungicida del componente A de Ranman aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una milésima parte de la tasa recomendada), el fungicida Previcur aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una centésima parte de la tasa recomendada), el fungicida Signum aplicado a una tasa reducida (en este caso aproximadamente una centésima parte de la tasa recomendada), o una combinación del elicitor formulado con uno de los fungicidas. Se presentan los datos como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron los datos con la prueba de la t de Student ( $n = 24$ ),  $p < 0,05$  y barras con diferentes letras (por ejemplo "a" o "b") se consideran que son estadísticamente diferentes entre sí.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

Los términos "que comprende", "comprende" y "que se compone de" tal como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son incluyentes o de extremos abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales, no citados. El término también engloba "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende englobar variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones de  $\pm 10\%$  o menos, preferiblemente  $\pm 5\%$  o menos, más preferiblemente  $\pm 1\%$  o menos, y todavía más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones son apropiadas para actuar en la invención dada a conocer. Ha de entenderse que el valor al que hace referencia el modificador "aproximadamente" también se da a conocer en sí mismo específica y preferiblemente.

Todos los documentos citados en la presente memoria descriptiva se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad. En particular, las enseñanzas de todos los documentos a los que se hace referencia específicamente en el presente documento se incorporan como referencia.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos usados al dar a conocer la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Como orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las

enseñanzas de la presente invención. Cuando se definen términos específicos en relación con un aspecto o realización particular, tal connotación pretende aplicarse en toda esta memoria descriptiva, es decir, también en el contexto de otros aspectos o realizaciones, a menos que se defina de otro modo.

5 La presente invención proporciona ventajosamente una composición que es más activa en lo que respecta a su eficacia frente a hongos fitopatógenos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos añadiendo un elicitador del sistema inmunitario de plantas a un fungicida aplicado a una tasa reducida. Esto permite aplicar el fungicida a la tasa reducida, lo que reducirá a su vez la cantidad de residuos de fungicida hallada en plantas.

Una composición típica tal como se define en el presente documento comprende los siguientes componentes:

10 a) un elicitador que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, y

15 b) un fungicida seleccionado del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-(4-metilfenil)-1H-imidazol-1-sulfonamida; N-(triclorometil)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (E)-metoxiimino-{(E)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorom-tolil)etilidenaminoxi]-o-tolil}acetato de metilo; y una combinación de los mismos,

c) opcionalmente sales y/o azúcar,

d) opcionalmente, un elicitador para la defensa de plantas adicional tal como laminarina o silicato de sodio.

20 El término "elicitador" tal como se usa en el presente documento se refiere a un inductor del sistema inmunitario de plantas. Cuando las plantas son atacadas por patógenos, se defienden a sí mismas con un arsenal de mecanismos dirigidos a la lucha contra la infección o a hacer que la planta sea menos atractiva para los patógenos. Como en la mayor parte de respuestas celulares al entorno, se activan mecanismos de defensa cuando entran receptores directa o indirectamente en contacto con patógenos. Los ligandos de estos receptores de plantas son elicitadores del sistema inmunitario de plantas. Existe una amplia variedad de elicitadores, incluyendo los denominados elicitadores inespecíficos o PMAP (patrones moleculares asociados con patógenos) por ejemplo productos de degradación de componentes de pared celular de patógenos o derivados de una pared celular de planta, y elicitadores específicos de patógenos o efectores por ejemplo productos génicos de avirulencia de patógenos tales como AVR 9 (productos génicos de *Avr*). Los elicitadores del sistema inmunitario de plantas comprenden proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, péptidos de diverso origen, lipopéptidos, extractos de algas, extractos de las paredes de material de planta y/o material fúngico, hongos, material bacteriano y material viral, o material de levadura y/o extractos. Los elicitadores también comprenden ácido salicílico, ácido jasmónico, productos de peroxidación de lípidos y/o uno o más de sus ésteres. El elicitador usado preferiblemente en el presente documento es un complejo de oligosacárido de oligo-galacturonanos estabilizados por quito-oligosacáridos, tal como se especifica por ejemplo en el documento WO 2008/065151.

40 El término "oligo-galacturonano" engloba en el presente documento una cadena de ácidos D-galacturónicos con uniones  $\alpha$ -(1-4). Los oligo-galacturonanos se derivan de pectina, que es un constituyente principal de paredes celulares de planta. La pectina consiste en un conjunto complejo de polisacáridos, incluyendo homogalacturonanos, que son cadenas lineales de ácidos D-galacturónicos con uniones  $\alpha$ -(1-4). Los oligogalacturonanos se liberan de estos galacturonanos a través de la acción de enzimas pectolíticas.

Los oligo-galacturonanos presentes en la composición definida en el presente documento tienen un grado de polimerización mayor de 8, preferiblemente comprendido entre 9 y 20 o entre 9 y 15.

45 Los términos "quito-oligosacárido" y "oligosacárido de quitosano" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un oligosacárido lineal que se compone de N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) y D-glucosamina (unidad desacetilada) con uniones  $\beta$ -(1-4) distribuidas al azar. El quitosano se encuentra de manera natural en algunos organismos, pero se produce principalmente a nivel industrial mediante desacetilación de quitina, que es el elemento estructural en el exosqueleto de crustáceos (cangrejos, gambas, etc.), insectos, y en las paredes celulares de algunos hongos y otros organismos.

50 Los quito-oligosacáridos usados en la composición tal como se define en el presente documento tienen un grado de acetilación menor del 50%, menor del 40%, o menor del 30%, preferiblemente de aproximadamente el 25% y un grado de polimerización mayor de 5, preferiblemente comprendido entre 5 y 10.

55 Pueden añadirse sales a la composición tal como se define en el presente documento para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido, en particular para obtener la conformación denominada de "cartón de huevos" del oligo-galacturonano en el mismo. Preferiblemente, se añade una combinación de sales de cationes tanto monovalentes como divalentes. De manera ideal, se añaden cationes tanto de calcio como monovalentes tales como de sodio. La mejor composición puede determinarse con la ayuda de la

prueba de ELISA con el anticuerpo monoclonal 2F4 (remítase a Cabrera *et al.*, 2008, *Glycobiology* 18 (6): 473-482) pero también con la ayuda de bioensayos que deben optimizarse para cada especie de planta seleccionada como objetivo. Demasiada cantidad de calcio desplaza el quitosano del complejo. Demasiada cantidad de catión monovalente desplaza el calcio de la conformación de cartón de huevos de pectina y puede ser fitotóxico. Una pequeña cantidad de cobre puede sustituir al calcio en las conformaciones de cartón de huevos y es beneficioso para la conformación supramolecular del elicitor. Se usa preferiblemente NaCl como sal de catión monovalente. También es adecuado KNO<sub>3</sub>, pero menos preferido debido al posible efecto sobre la apertura de estomas, permitiendo posiblemente la entrada de parásitos en la hoja o planta. Se usa preferiblemente CaCl<sub>2</sub> como sal de catión divalente, pero también son adecuados CuCl<sub>2</sub> o ZnCl<sub>2</sub>. Más preferiblemente, se usa CaCl<sub>2</sub> desde aproximadamente 0,2 hasta 1 mM, lo más preferiblemente 0,5 mM, en combinación con NaCl desde aproximadamente 5 hasta 100 mM, lo más preferiblemente de 20 a 50 mM.

Puede añadirse sacarosa a la composición tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, se añade sacarosa en una concentración de desde aproximadamente 1 mM hasta 20 mM, lo más preferiblemente sacarosa de aproximadamente 5 a 10 mM. La sacarosa desencadena la señalización a través de hexocinasa y también es un agente de mojado.

Preferiblemente, tanto sales como sacarosa pueden añadirse a las composiciones tal como se definen en el presente documento.

El término "fungicida" engloba sustancias o composiciones químicas o biológicas usadas para destruir o inhibir hongos u oomicetos, por ejemplo previniendo la esporulación, o sus esporas. Los fungicidas pueden ejercer su efecto biológico mediante diferentes modos de acción, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante interferencia en la síntesis de ácidos nucleicos, mitosis y división celular, respiración, síntesis de aminoácidos y proteínas, transducción de señales, lípidos y síntesis de membrana, biosíntesis de esteroides, biosíntesis de glucanos en el patógeno o mediante inducción de la defensa de la planta huésped.

Dicho fungicida puede ser por ejemplo, un fungicida seleccionado de: acilalaninas (benalaxil), anilinoimidazoles (ciprodinil o pirimetanil), benzamidas (fluopicolida o zoxamida), bencimidazoles (fuberidazol, tiabendazol o metrafenona), benzotriazolones (acibenzolar-S-metilo), carbamatos (benthiavalicarb, iprovalicarb o propamocarb), carboxamidas (boscalid), cloronitrilos (clorotalonil), clorofenils (tolclofos-metilo), oximas de cianoacetamida (cimoanil), cianoimidazoles (ciazofamida), dicarboximidias (iprodiona), ditiocarbamatos (tiram, metiram, mancozeb, maneb o propineb), guanidinas (dodina), hidroxianilidas (fenhexamida), imidazoles (fenamidona, imazalil o triflumizol), morfolinias (dimetomorf, fenpropimorf, espiroxamina o dodemorf), fosfonatos (fosetil), oxatiinas (flutolanil), oxazoles (famoxadona o himexazol), fenilamidas (metalaxil o metalaxil-M), fenilpiridinamidas (fluazinam), fenilpirroles (fludioxonil), ftalimidias (captan o folpet), quinazolinonas (proquinazida), quinolininas (quinoxifeno), estrobilurinas (dimoxistrobina, fluoxastrobina, cresomin-metilo, piraclostrobina, trifloxistrobina o picoxistrobina), tiofenos (siltiofam), triazoles (difenoconazol, epoxiconazol, fenbuconazol, flusilazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimenol, triticonazol o protioconazol), derivados de cobre (oxicloruro de cobre, clorhidrato de cobre, óxido de cobre o sulfato de cobre) y azufre.

Preferiblemente, el fungicida se elige de la lista que comprende: fosfonatos, benzamidas, carbamatos, ditiocarbamatos, ftalimidias, triazoles, quinolininas, azufre y cianoimidazoles.

– Fosfonatos: El modo de acción de los fosfonatos se desconoce en gran medida pero podría implicar la inhibición de la ATP sintasa mitocondrial. Ejemplos adecuados de fosfonatos son derivados del ácido fosforoso, incluyendo el propio ácido fosforoso y sus sales de metal alcalino o alcalinotérreo. En un ejemplo preferido, los fungicidas son hidrogenofosfonatos de etilo tales como fosetil-Al, fosetil-K y fosetil-Na. Puede hacerse una mención de los fosfonatos vendidos con los nombres comerciales de Aliette, Autograph, Avalon, Flanker, Legion, Linebacker, Novasource, Prodigy Signature y Quali-Pro, que comprenden todos ellos fosetil-Al como componente activo, y Magellan y Phostrol, que comprenden ácido fosforoso como componente activo.

– Las benzamidas interfieren en la mitosis y división celular. En un ejemplo preferido, las benzamidas contienen 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]benzamida (fluopicolida) como componente activo. Puede hacerse una mención de Infinito.

– Los carbamatos actúan interfiriendo en la síntesis de lípidos y de membrana. En un ejemplo preferido, los carbamatos contienen propamocarb, preferiblemente clorhidrato de propamocarb (clorhidrato de [3-(dimetilamino)propil]carbamato de propilo) como componente activo. Puede hacerse una mención de los carbamatos vendidos con los nombres comerciales de Infinito y Stellar (que comprenden fluopicolida y clorhidrato de propamocarb), Banol, Previcur, Proplant (que comprenden clorhidrato de propamocarb) y Previcur Energy (que comprende propamocarb y fosetil-Al).

– Los ditiocarbamatos muestran actividad de contacto en múltiples sitios. En un ejemplo preferido, se usan ditiocarbamatos que contienen complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc (mancozeb) como componente activo. Puede hacerse una mención de los ditiocarbamatos vendidos con los nombres comerciales de Acrobat MZ, Clevis, Cuprofix MZ, Dithane, Evolve, Fore, Gaucho, Gavel, Junction,

Mancozide, Manhandle, Manzate, Maxim, Moncoat, Nubark, Penncozeb, Pentathlon, Potato Seed Treater, Protect, Ridomil Gold MZ, SA-50, Stature, Tops MZ, Wingman y Zyban.

- 5 – Las ftalimidias también muestran actividad de contacto en múltiples sitios. En un ejemplo preferido, las ftalimidias comprenden *N*-(triclorometil)ftalimida o 2-[(triclorometil)tio]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (folpet) como componente activo. Puede hacerse una mención de las ftalimidias vendidas con los nombres comerciales de Folpet y Fungitrol.
- 10 – Los triazoles actúan interfiriendo en la biosíntesis de esteroides en membranas. En un ejemplo preferido, los triazoles contienen (2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1*H*-1,2,4-triazol (epoxiconazol) como componente activo. Puede hacerse una mención del fungicida de triazol vendido con el nombre comercial de Opus.
- 15 – Los cianoimidazoles actúan interfiriendo en la cadena de transporte electrónico a nivel del complejo III en la membrana interna de las mitocondrias, lo que bloquea la fosforilación oxidativa impulsada por transferencia electrónica. En un ejemplo preferido, los cianoimidazoles contienen 4-cloro-2-ciano-*N,N*-dimetil-5-(4-metilfenil)-1*H*-imidazol-1-sulfonamida (ciazofamida) como componente activo. Puede hacerse una mención del cianoimidazol vendido con el nombre comercial de Ranman.
- Las quinolinas actúan interfiriendo en, por ejemplo bloqueando, la transducción de señales. En un ejemplo preferido, las quinolinas contienen 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter (quinoxifeno) como componente activo. Puede hacerse una mención del fungicida de quinolina vendido con los nombres comerciales de Legend o Quintec.
- 20 – Los fungicidas que contienen azufre muestran actividad de contacto en múltiples sitios y contienen azufre como componente activo. Puede hacerse una mención del fungicida que contiene azufre vendido con el nombre comercial de Thiovit®.

25 Las composiciones tal como se definen en el presente documento pueden contener normalmente componentes adicionales, conocidos como coformulantes o adyuvantes, para obtener un producto con buenas propiedades de manipulación, eficacia y estabilidad. Tal como se usa en el presente documento, los términos “coformulante” o “adyuvante” designan cualquier sustancia distinta del componente de elicitador de complejo de oligosacárido principal definido en el presente documento, que se añade deliberadamente a la composición de elicitador tal como se define en el presente documento.

30 La composición tal como se define en el presente documento puede comprender además un coformulante o adyuvante seleccionado del grupo que comprende: tensioactivos, agentes anticongelantes (incluyendo urea, etilenglicol, propilenglicol o glicerol), agentes conservantes (incluyendo sorbato de potasio, parabeno y sus derivados, 1,2-bencisotiazolin-3(2*H*)-ona o aceites esenciales), agentes absorbentes (incluyendo mazorcas de maíz o serrín), espesantes (incluyendo arcillas o goma xantana), tampones, agentes adhesivos (incluyendo látex, silicio o alquilo alcoxilado), diluyentes (incluyendo éster metílico de colza) o cualquier componente inerte habitual usado de manera convencional composiciones para agricultura, o una mezcla de los mismos.

35 La composición tal como se define en el presente documento puede comprender además un tensioactivo.

40 Con “tensioactivo” quiere decirse en el presente documento un compuesto que disminuye la tensión superficial de un líquido, permitiendo una extensión más fácil. El tensioactivo puede ser un detergente, un emulsionante (incluyendo éster de glicerol de alquilpoliglucósidos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano), un agente dispersante (incluyendo cloruro de sodio, cloruro de potasio, nitrato de potasio, cloruro de calcio o almidón de maíz), un agente espumante (incluyendo derivados del ácido tartárico, ácido málico o alcoholes), un potenciador de la penetración, un humectante (incluyendo sulfato de amonio, glicerina o urea) o un agente de mojado de tipo iónico o no iónico o una mezcla de tales tensioactivos. Los tensioactivos usados en la composición tal como se define en el presente documento son potenciadores de la penetración, agentes dispersantes o emulsionantes.

45 El término “potenciador de la penetración” se entiende en el presente documento como un compuesto que acelera la captación del componente activo a través de la cutícula de una planta en el interior de la planta, es decir la tasa de captación, y/o aumenta la cantidad de componente activo absorbido en la planta. Las clases de sustancias conocidas como potenciadores de la penetración, incluyen fosfatos de alquilo, tales como fosfato de tributilo y fosfato de tripropilo, y sales del ácido naftalenosulfónico. Puede hacerse una mención, por ejemplo, de tensioactivos vendidos con el nombre comercial de Dehscofix®, que comprenden aceite de ricino y ácidos grasos etoxilados, tales como Dehscofix CO 95 ® (disponible de Huntsman, EE.UU.), que comprende ácidos grasos etoxilados C18 del aceite de ricino.

55 Con “agente dispersante” quiere decirse una sustancia añadida a una suspensión, habitualmente un coloide, para mejorar la separación de partículas e impedir la sedimentación o la aglutinación. Puede hacerse una mención del agente dispersante que se vende con el nombre comercial de Tensiofix Dp400 (disponible de Ajinomoto OmniChem), que comprende esencialmente sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol.

El término “emulsionante” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que estabiliza una emulsión, es decir una mezcla de dos o más líquidos. Puede hacerse una mención de los emulsionantes vendidos con los nombres comerciales de Tween® 20, que comprende esencialmente monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano (polisorbato 20), y Radia®, que comprende esencialmente alquilpoliglicósidos.

- 5 Como ejemplo, dicho tensioactivo comprende uno o más de los siguientes componentes: etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales del ácido naftalenosulfónico, sulfonato orgánico / 2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucósido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, dioctilsulfosuccinatos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano (polisorbato 20), más preferiblemente dicho  
10 tensioactivo es etoxilato de aceite de ricino C18 (Dehscofix®), sulfonato orgánico / 2-metilpentano-2,4-diol (Tensiofix Dp40) o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano (Tween®20).

En otro ejemplo, las composiciones tal como se definen en el presente documento también pueden comprender uno o más de otros compuestos activos seleccionados del grupo que comprende: herbicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento de plantas u otros elicitors del sistema inmunitario de plantas.

- 15 En un ejemplo preferido, dichas composiciones tal como se definen en el presente documento pueden comprender además un elicitor del sistema inmunitario de plantas adicional elegido entre sílice, cobre, azufre, aluminio, vanadio, cobalto, níquel, hierro, plata, ácido salicílico y sus derivados (incluyendo ácido acetil-salicílico, ácido isonicotínico, acibenzolar-S-metilo), ácido jazmónico y sus derivados (incluyendo jazmonato de metilo), etileno y sus derivados, polisacáridos (incluyendo glucanos, xiloglucanos, quitina, quitosanos, fucanos, galactofucanos, xilanos, galactanos,  
20 alginatos, galacturonanos, apiogalacturonanos, fructans incluyendo inulin, mannans, xilomannans, galactomannans, glucomannanos y galactomananos), extractos de algas (extractos de algas verdes incluyendo ulvanos, extractos de algas pardas incluyendo laminarina, y extractos de algas rojas incluyendo carragenanos), oligosacáridos (incluyendo trehalosa), péptidos (incluyendo sistemina, 13-pep, flg-22, glutatión), aminoácidos, proteínas (incluyendo harpina y flagelina), peptona, extracto de carne de vacuno, aceites esenciales (incluyendo aceites de comino, anís, menta,  
25 canela, timo, albahaca, cardamomo, cilantro, orégano, manzanilla, clavo, jojoba y árbol del té), lípidos (incluyendo ergosterol, anfotericina, esfingolípidos, cerebrósidos), glicolípidos (incluyendo siringólidos), glicoproteínas (incluyendo criptogeínas), lipopéptidos, lipoproteínas (incluyendo volicitina), extractos de levadura (incluyendo extractos de *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Aureobasidium* y más particularmente de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Candida oleophila*, *Pichia guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans*), extractos fúngicos (incluyendo  
30 extractos de *Trichoderma*, *Megasperma*, *Pyricularia*, *Alternaria*, *Pythium*, *Puccinia*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Magnaporthe*), extractos bacterianos (incluyendo extractos de *Escherichia*, *Rhizobia*, *Pseudomonas*), BABA, probenazol, isotianilo, ácido fosforoso y sus derivados (incluyendo fosetil-aluminio, sodio y potasio), extractos de cola de caballo, yoduro de potasio y tiocianato de potasio, extractos de *Citrus*, extractos de *Yucca*, extractos de *Salix* y decocciones vegetales (incluyendo decocción de ortiga).
- 35 Preferiblemente, dicho elicitor del sistema inmunitario de plantas adicional contiene laminarina (un  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucano lineal con uniones  $\beta(1\rightarrow6)$ ) tal como, por ejemplo Vacciplant Fruit®.

Las composiciones tal como se definen en el presente documento pueden estar listas para aplicarse a la planta mediante un dispositivo adecuado, tal como un dispositivo de pulverización, o pueden ser las composiciones concentradas comerciales que tienen que diluirse antes de aplicarse a la planta.

- 40 Las composiciones tal como se definen en el presente documento pueden estar en formas bastante diversas, sólidas o líquidas. Como formas de composición sólida, puede hacerse una mención de polvos para espolvoreo y gránulos, en particular aquellos obtenidos mediante extrusión, mediante compactación, mediante impregnación de un soporte granulado o mediante granulación a partir de un polvo, comprimidos o pastillas efervescentes. Como formas de composición líquida o formas destinadas a constituir composiciones líquidas cuando se aplican, puede hacerse  
45 mención de disoluciones, en particular concentrados solubles en agua, emulsiones, suspensiones concentradas, dispersiones, aerosoles y gránulos y polvos mojables (o polvos para pulverización), pastas, geles y embalajes solubles en agua.

- En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de las composiciones tal como se definen en el presente documento en aplicaciones agrícolas, más particularmente para proteger a plantas frente a (la infección por)  
50 patógenos de plantas.

- La presente divulgación no sólo provee el uso simultáneo de los diferentes componentes de las composiciones, es decir el uso de las composiciones, sino que también provee el uso secuencial de los diferentes componentes de las composiciones. Por ejemplo, los inventores han encontrado que el uso secuencial del elicitor de oligosacárido del sistema inmunitario de plantas que comprende oligo-galacturonanos estabilizados por quito-oligosacáridos y un  
55 fungicida también da como resultado una eficacia potenciada del fungicida. Por “uso secuencial” quiere decirse en el presente documento que en primer lugar se añade el elicitor de oligosacárido y posteriormente se aplica el fungicida, adyuvante, tensioactivo u otro elicitor a la planta, o viceversa.

“Patógenos de plantas” se refiere a organismos que provocan enfermedades infecciosas en plantas e incluye

hongos, oomicetos, bacterias, virus, viroides, organismos pseudovirales, fitoplasmas, protozoos, nematodos y plantas parasitarias. En una realización preferida, los patógenos de plantas son hongos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos.

5 La mayoría de los hongos fitopatógenos pertenecen a los ascomicetos y los basidiomicetos, reproduciéndose de manera tanto sexual como asexual mediante la producción de esporas que pueden propagarse a través del aire (viento) o el agua, o pueden portarse por el suelo tales como zoosporas que pueden vivir de manera saprotrófica, llevando a cabo la primera parte de su ciclo vital en el suelo. Los deuteromicetos (hongos imperfectos) son hongos de los que sólo se conoce la forma de reproducción asexual, lo que significa que este grupo de hongos produce sus esporas de manera asexual. Los oomicetos no son verdaderos hongos sino organismos similares a hongos que  
10 usan los mismos mecanismos que los hongos para infectar las plantas.

Los organismos fúngicos y similares a hongos son heterotróficos, es decir necesitan una fuente externa de nutrientes para su crecimiento, desarrollo y reproducción. Una comprensión de otras características clave de estos organismos puede ayudar en su identificación:

- 15 – Hifas: los filamentos de tipo filar con un hábito de crecimiento filamentoso son una característica común en la mayor parte de los hongos. Las hifas colonizan (crecen a su través) sustratos de modo que el organismo puede obtener nutrientes. Las especies patógenas de plantas colonizan plantas a través de la superficie del huésped, a veces, a través de penetración directa de superficies de plantas intactas. Los hongos saprófitos tienden a penetrar en y colonizar tejido vegetal enfermo, plantas senescentes (moribundas) y residuos de plantas. Estos hongos son los principales descomponedores de materia orgánica en el suelo.
- 20 – Paredes celulares hifales: los hongos verdaderos tienen paredes celulares que se componen principalmente de glucanos y quitina, mientras que los organismos similares a hongos tienen paredes celulares que se componen de celulosa y glicanos.
- Hifas tabicadas: los hongos verdaderos tienen paredes transversales dentro de las hifas, mientras que los organismos similares a hongos no. Esto puede ayudar en la diferenciación de estos dos grupos con examen  
25 microscópico.
- Esporas móviles: los hongos verdaderos no tienen esporas móviles, con la excepción de *Chytrids*. Las zoosporas (esporas producidas de manera asexual) móviles son comunes en muchas especies en los *Oomycota* (por ejemplo, *Pythium* y *Phytophthora*) y algunos mildiús lanuginosos. Las zoosporas permiten la dispersión a través de agua en el suelo y sobre superficies de plantas.
- 30 – Esporas dispersadas por el viento: muchas especies de verdaderos hongos producen esporas asexuales o sexuales para su dispersión por el viento. Esto es una característica común de patógenos fúngicos foliares (por ejemplo, *Erysiphe*). Sin embargo, algunas esporas están adaptadas para la dispersión por salpicadura.
- Estructuras de supervivencia: las esporas de pared gruesa (por ejemplo, oosporas y clamidosporas), esclerocios y estructuras reproductoras multicelulares (por ejemplo, picnidios y peritecios) son importantes en el ciclo  
35 patológico. Durante condiciones ambientales desfavorables o en ausencia de un huésped vegetal adecuado u otro sustrato, estos organismos persisten en tales estructuras de supervivencia especializadas.

Los ejemplos no limitativos de hongos fitopatógenos y organismos similares a hongos incluyen *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) en el arroz y trigo y otros *Pyricularia* spp. en otros huéspedes; *Puccinia* spp. por ejemplo *Puccinia sorghi*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia asparagi*, *Puccinia recondita* o *Puccinia arachidis*, *Puccinia triticina* (o *recondita*), *Puccinia striiformis* y otras royas en el trigo, *Puccinia hordei*, *Puccinia striiformis* y otras royas en la cebada, y royas en otros huéspedes (por ejemplo, césped, centeno, café, peras, manzanas, cacahuetes, remolacha azucarera, verduras y plantas ornamentales); *Erysiphe cichoracearum* en cucurbitáceas (por ejemplo, melón); *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) en la uva, *Blumeria* (o *Erysiphe*) *graminis* (mildiú vellosos) en la cebada, trigo, centeno y césped y otros mildiús vellosos en diversos huéspedes, tales como *Sphaerotheca macularis* en el  
45 lúpulo, *Sphaerotheca fusca* (*Sphaerotheca fuliginea*) en cucurbitáceas (por ejemplo, pepino), *Leveillula taurica* en tomates, berenjena y pimiento verde, *Podosphaera leucotricha* en manzanas; *Cochliobolus* spp., *Helminthosporium* spp. (por ejemplo, *Helminthosporium turcicum*, *Helminthosporium carbonum*, *Helminthosporium mavidis* o *Helminthosporium sigmoideum*), *Drechslera* spp. (*Pyrenophora* spp. por ejemplo *Pyrenophora tritici-repentens* o *Pyrenophora teres*), *Rhynchosporium* spp., *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) y *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum* o *Septoria nodorum*), *Pseudocercospora herpotrichoides* y *Gaeumannomyces graminis* en cereales (por ejemplo, trigo, cebada, centeno), césped y otros huéspedes (por ejemplo, *Septoria lycopersici*, *Septoria glycines*, *Septoria*); *Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum* en cacahuetes y otros *Cercospora* spp. (por ejemplo, *Cercospora kikuchii* o *Cercospora zaeamaydis*) en otros huéspedes, por ejemplo remolacha azucarera, plátanos, sojas y arroz; *Botrytis* spp. (por ejemplo, *Botrytis cinerea* o *Botryotinia fuckeliana*),  
55 *Botrytis cinerea* (moho gris) en tomates, fresas, verduras, vides y otros huéspedes y otros *Botrytis* spp. en otros huéspedes; *Alternaria* spp. (por ejemplo, *Alternaria brassicola* o *Alternaria solani*) en verduras (por ejemplo, zanahorias), colza, manzanas, tomates, patatas, cereales (por ejemplo, trigo) y otros huéspedes; *Venturia* spp. (incluyendo *Venturia inaequalis* (scab) o *Venturia pirina*) en manzanas, peras, fruta de hueso, frutos de cáscara y

otros huéspedes; *Cladosporium* spp. (por ejemplo, *Cladosporium fulvum*) en una gama de huéspedes incluyendo cereales (por ejemplo, trigo) y tomates; *Monilinia* spp. en fruta de hueso, frutos de cáscara y otros huéspedes; *Didymella* spp. en tomates, césped, trigo, cucurbitáceas y otros huéspedes; *Phoma* spp. (por ejemplo, *Phoma betae* en remolacha azucarera y *Phoma lingam* en colza), en el césped, arroz, patatas, trigo y otros huéspedes; *Aspergillus* spp. y *Aureobasidium* spp. en el trigo, madera y otros huéspedes; *Ascochyta* spp. (por ejemplo, *Ascochyta pisi*) en guisantes, trigo, cebada y otros huéspedes; *Stemphylium* spp. (*Pleospora* spp.) en manzanas, peras, cebollas y otros huéspedes; enfermedades de verano (por ejemplo, podredumbre amarga (*Glomerella cingulata*), podredumbre negra o cercosporiosis (*Botryosphaeria obtusa*), manchas del fruto de Brooks (*Mycosphaerella pomii*), la roya del cedro-manzana (*Gymnosporangium juniper-ivirginianae*), fumagina (*Gloeodespomigena*), punteado (*Schizothyrium pomii*) y podredumbre blanca (*Botryosphaeria dothidea*)) en manzanas y peras; *Plasmopara viticola* en vides; otros mildiús lanuginosos, tales como *Bremia lactucae* en la lechuga, *Peronospora* spp. (por ejemplo, *Peronospora manshurica* o *Peronospora tabacina*) en sojas, tabaco, cebollas y otros huéspedes, *Pseudoperonospora humuli* en el lúpulo y *Pseudoperonospora cubensis* en cucurbitáceas; *Pythium* spp. (incluyendo *Pythium ultimum*) en el césped y otros huéspedes (por ejemplo, *Pythium aphanidermatum*); *Phytophthora infestans* en patatas y tomates y otros *Phytophthora* spp. en verduras, fresas, aguacate, pimienta, plantas ornamentales, tabaco, cacao y otros huéspedes (por ejemplo, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora phaseoli*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora porri*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora megasperma f.sp. soiae* o *Phytophthora infestans*); *Thanatephorus cucumeris* en el arroz y césped y otros *Rhizoctonia* spp. en diversos huéspedes tales como trigo y cebada, cacahuètes, verduras, algodón y césped; *Sclerotinia* spp. en el césped, cacahuètes, patatas, colza y otros huéspedes (por ejemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*); *Sclerotium* spp. en el césped, cacahuètes y otros huéspedes; *Gibberella fujikuroi* en el arroz; *Colletotrichum* spp. (por ejemplo, *Colletotrichum lindemuthianum*) en una gama de huéspedes incluyendo césped, café y verduras; *Laetisaria fuciformis* en el césped; *Mycosphaerella* spp. en plátanos, cacahuètes, cítricos, pacanas, papaya y otros huéspedes; *Diaporthe* spp. en cítricos, soja, melón, peras, altramuz y otros huéspedes; *Elsinoe* spp. en cítricos, vides, aceitunas, pacanas, rosas y otros huéspedes; *Verticillium* spp. (por ejemplo, *Verticillium dahliae* o *Verticillium albo-atrum*) en una gama de huéspedes incluyendo lúpulo, patatas y tomates; *Pyrenopeziza* spp. en colza y otros huéspedes; *Oncobasidium theobromae* en cacao que provoca muerte regresiva vascular; *Fusarium* spp. (por ejemplo, *Fusarium nivale*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium germinearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* o *Fusarium roseum*), *Typhula* spp., *Microdochium nivale*, *Ustilago* spp. por ejemplo *Ustilago maydis* (por ejemplo, carbón del maíz), *Urocystis* spp., *Tilletia* spp. y *Claviceps purpurea* en una variedad de huéspedes pero particularmente trigo, cebada, césped y maíz; *Ramularia* spp. en remolacha azucarera, cebada y otros huéspedes; enfermedades tras la cosecha particularmente de frutos (por ejemplo, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Trichoderma viride* en naranjas, *Colletotrichum musae* y *Gloeosporium musarum* en plátanos y *Botrytis cinerea* en las uvas); otros patógenos en vides, especialmente *Eutypa lata*, *Guignardia bidwellii*, *Phellinus igniarius*, *Phomopsis viticola*, *Pseudopeziza tracheiphila* y *Stereum hirsutum*; otros patógenos en árboles (por ejemplo, *Lophodermium seditiosum*) en madera, especialmente *Cephaloascus fragrans*, *Ceratocystis* spp., *Ophiostoma piceae*, *Penicillium* spp., *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, *Leptographium lindbergi* y *Aureobasidium pullulans*; y vectores fúngicos de enfermedades virales (por ejemplo, *Polymyxa graminis* en cereales como el vector del virus del mosaico amarillo de la cebada (BYMV) y *Polymyxa betae* en remolacha azucarera como el vector de rizomanía), *Acremonia* spp., *Allomyces* spp., *Amorphotheca* spp., *Aspergillus* spp., *Blastocladiella* spp., *Candida* spp., *Chaetomium* spp., *Coccidioides* spp., *Conidiobolus* spp., *Coprinopsis* spp., *Corynascus* spp., *Cryphonectria* spp., *Cryptococcus* spp., *Cunninghamella* spp., *Curvularia* spp., *Debaryomyces* spp., *Diplodia* spp. (por ejemplo, *Diplodia maydis*), *Emericella* spp., *Encephalitozoon* spp., *Eremothecium* spp., *Gaeumanomyces* spp. (por ejemplo, *Gaeumanomyces graminis f.sp. tritici*), *Geomyces* spp., *Gibberella* spp. (por ejemplo, *Gibberella zeae*), *Gloeophyllum* spp., *Glomus* spp., *Hypocrea* spp., *Kluyveromyces* spp., *Lentinula* spp., *Leptosphaeria salvinii*, *Leucosporidium* spp., *Macrophomina* spp. (por ejemplo, *Macrophomina phaseolina*), *Magnaportha* spp. (por ejemplo *Magnaporthe oryzae*), *Metarhizium* spp., *Mucor* spp., *Neurospora* spp., *Nectria* spp. (por ejemplo, *Nectria heamatococca*), *Paracoccidioides* spp., *Phaeoheria* spp., *Phanerochaete* spp., *Phakopsora* spp. (por ejemplo, *Phakopsora pachyrhizi*), *Phymatotrichum* spp. (por ejemplo, *Phymatotrichum omnivorum*), *Pneumocystis* spp., *Pyronema* spp., *Rhizosporium secalis*, *Rhizoctonia* spp. (por ejemplo, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* o *Rhizoctonia cerealis*), *Rhizopus* spp. (por ejemplo, *Rhizopus chinensis*), *Saccharomyces* spp., *Scerotium* spp. (por ejemplo, *Scerotium rolfsii*), *Spizellomyces* spp., *Thermomyces* spp., *Thielaviopsis* spp. (por ejemplo, *Thielaviopsis basicola*), *Trametes* spp., *Trichophyton* spp., o *Yarrowia* spp.

55 Enfermedades de plantas provocadas por hongos incluyendo levaduras, royas, carbones, mildiús, mohos, setas y hongos venenosos que pueden ser tratadas usando las composiciones tal como se definen en el presente documento son por ejemplo:

“Roya” es una enfermedad fúngica en plantas, que produce una alteración del color parda rojiza de los tallos y las hojas.

60 “Podredumbre negra” se caracteriza por el oscurecimiento y la pudrición de hojas de plantas de frutas y verduras.

“Mancha negra” es una de las muchas enfermedades fúngicas en plantas. Se denomina “mancha negra” porque produce pequeñas manchas negras en plantas.

- “Podredumbre apical” es una enfermedad fúngica que se encuentra en plantas de lechuga. La característica de este hongo es que afecta en primer lugar a las hojas en la parte inferior de la planta y luego se desplaza hacia arriba para afectar a la parte superior.
- 5 “Cancro” afecta a las raíces y la corteza, se encuentra en árboles leñosos y es conocido por provocar daño localizado a la corteza de los árboles.
- “Cápsula de algodón” es conocida por atacar plantas de arándano.
- “Agalla de la corona” como el cancro ataca las cortezas de los árboles leñosos, este hongo ataca el tallo de las plantas de alfalfa. Forma protrusiones blancas en la base del tallo de la planta.
- 10 “Verruga de la patata” es una enfermedad fúngica que provoca excrecencias oscuras, verrugosas y esponjosas en los ojos de tubérculos de patata, de manera similar a la agalla de la corona en plantas de alfalfa.
- “Marchitamiento” provoca condiciones de humedad excesiva de las plántulas.
- “Podredumbre seca” provoca el desecamiento y desmenuzamiento de madera, bulbos, patatas o frutos.
- “Enfermedad por *Rhizoctonia*” está provocada por hongos denominados *Pellicularia* y *Corticium*. Se observa a menudo que afecta a patatas pequeñas.
- 15 “Podredumbre de las raíces” infecta las raíces provocando pudrición de las raíces, provocando eventualmente que muera la planta.
- “Podredumbre con esclerocios” está provocada por hongos del género *Sclerotium* que provocan la formación de esclerocios en plantas.
- 20 “Grafiosis del olmo” es una enfermedad fúngica que afecta a los olmos. Se propaga de una planta a otra a través de injertos de raíz o por escólitos del olmo que se alimentan de pequeñas ramitas.
- “Raíz rosada” ataca a las plantas de cebolla y hace que sean inadecuadas para el consumo.
- “Podredumbre blanda” es una pudrición viscosa, pastosa provocada por hongos.
- “Mancha amarilla” se caracteriza por manchas amarillas en las hojas de plantas.
- 25 “Mildiús vellosos” es específico a menudo del huésped que invade. Se observa normalmente en rosas, lila, roble común, zinnias, etc.
- “Marchitez de plantas” recibe su nombre porque provoca que se marchite la planta que infecta. La invasión por el hongo se inicia en las raíces y luego lentamente se abre camino al interior del tallo y obstruye el sistema vascular de la planta.
- 30 “Pudrición” es descomposición de madera que está provocada por hongos. Cuando ataca tejido vegetal vivo, mata las plantas.
- Los ejemplos no limitativos de bacterias fitopatógenas incluyen los géneros *Erwinia* (incluyendo *Erwinia amylovora*, que provoca fuego bacteriano en peras), *Pseudomonas* (incluyendo *Pseudomonas syringae*), *Xanthomonas* (incluyendo *Xanthomonas orizae*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas fuscans* (cáncer de los cítricos) y *Xanthomonas fragariae*) y *Ralstonia*.
- 35 Los ejemplos no limitativos de virus fitopatógenos incluyen el virus del mosaico del pepino, el virus del mosaico amarillo de la cebada, el virus del amarilleo marginal tenue del fresal, el virus latente del mosaico anular del fresal, el virus del amarilleo necrótico de la remolacha y el virus Y de la patata.
- Los insectos fitopatógenos que pueden seleccionarse como objetivo mediante la aplicación de las composiciones tal como se definen en el presente documento incluyen pulgones, escarabajos, chinches, saltamontes, langostas, ácaros, hormigas, garrapatas, trips, moscas blancas, gusanos de la raíz, larvas, gorgojos, barrenadores (de tallos), orugas, mariposas, cigarreros, minadores de las hojas, etc.
- 40 “Protección de plantas” tal como se usa en el presente documento se refiere a la activación de mecanismos que tiene como objetivo controlar o reducir los patógenos y/o minimizar sus efectos sobre la planta. Puede lograrse la protección de plantas destruyendo los patógenos, retrasando su crecimiento y/o reproducción, reduciendo la esporulación, etc..
- 45 Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para proteger a plantas frente a (la infección por) patógenos de plantas, caracterizado porque se aplica una cantidad eficaz y sustancialmente no fitotóxica de una composición tal como se define en el presente documento a las plantas. La expresión “cantidad eficaz y no fitotóxica” significa una cantidad de composición de elicitador tal como se define en el presente documento

que es suficiente para inducir el control o la destrucción de los patógenos de plantas presentes o susceptibles de aparecer en las plantas, y que no conlleva ningún síntoma de fitotoxicidad apreciable para dichas plantas. Tal cantidad puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo del patógeno de plantas que ha de controlarse, el tipo de planta, las condiciones climáticas y los compuestos incluidos en la composición según la invención. Esta cantidad puede determinarse mediante ensayos de campo sistemáticos que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica.

Como ejemplo, el fungicida en la composición tal como se define en el presente documento se aplica a una tasa reducida. Preferiblemente, la tasa del fungicida está reducida en al menos un factor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 en comparación con la tasa recomendada, o está reducida en el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o incluso el 95% o más de la dosificación recomendada para dicha planta y/o condiciones. Más preferiblemente, la tasa del fungicida está reducida en del 50% al 90%, del 60% al 90%, del 70% al 90%, del 80% al 90%, del 60% al 80%, o del 60% al 70% de la tasa recomendada para dicha planta y/o condiciones.

La aplicación de la composición tal como se define en el presente documento puede llevarse a cabo según técnicas que conocen bien los expertos en la técnica. La composición tal como se define en el presente documento puede aplicarse a la planta completa, o a hojas, flores, frutos, semillas y/o raíces de la planta, así como al suelo o sustrato inerte en el que la planta está creciendo o en el que se desea que crezca (por ejemplo, sustratos inorgánicos como arena, lana de roca, lana de vidrio; minerales expandidos como perlita, vermiculita, zeolita o arcilla expandida), piedra pómez, materiales o toba volcánica, sustratos orgánicos sintéticos (por ejemplo, poliuretano), sustratos orgánicos (por ejemplo, turba, compost, productos residuales de árboles como fibra de coco, fibra o virutas de madera, corteza de árbol) o a un sustrato líquido (por ejemplo, sistemas hidropónicos por flotación, técnica de película nutritiva, sistema aeropónico). La aplicación puede realizarse mediante pulverización, rociado, empapado, inmersión, inyección, etc., o mediante sistemas de fertirrigación.

También puede ser útil aplicar las composiciones tal como se definen en el presente documento a material de propagación tal como tubérculos o rizomas, pero también semillas, plántulas o trasplante repicado de plántulas y plantas o trasplante repicado de plantas. Las composiciones tal como se definen en el presente documento también pueden aplicarse tras la cosecha para controlar la pudrición.

Entre las plantas que pueden protegerse mediante el método tal como se define en el presente documento, puede hacerse una mención de algodón; lino; vid; cultivos de frutas o verduras tales como *Rosaceae* sp. (por ejemplo, frutos de pepitas tal como manzanas y peras, pero también frutas de hueso tales como albaricoques, almendras y melocotones), *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp., *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp., *Musaceae* sp. (por ejemplo, plátanos y bananos), *Rubiaceae* sp., *Theaceae* sp., *Sterculiaceae* sp., *Vitaceae* sp., *Rutaceae* sp. (por ejemplo, limones, naranjas y pomelos); *Solanaceae* sp. (por ejemplo, tomates), *Liliaceae* sp., *Asteraceae* sp. (por ejemplo, lechugas), *Umbelliferae* sp., *Cruciferae* sp., *Chenopodiaceae* sp., *Cucurbitaceae* sp., *Papilionaceae* sp. (por ejemplo, guisantes), *Rosaceae* sp. (por ejemplo, fresas); cultivos principales tales como *Graminae* sp. (por ejemplo, maíz, hierba o cereales tales como trigo, arroz, cebada y triticale), *Asteraceae* sp. (por ejemplo, girasol), *Brassicaceae* sp. (por ejemplo, canola y colza), *Fabaceae* sp. (por ejemplo, cacahuetes), *Papilionaceae* sp. (por ejemplo, soja), *Solanaceae* sp. (por ejemplo, tomates y patatas), *Chenopodiaceae* sp. (por ejemplo, remolachas); cultivos hortícolas y forestales; así como homólogos modificados genéticamente de estos cultivos.

La invención se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

Ejemplo 1. Comparación de la eficacia de un fungicida aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Phytophthora infestans* en patata (ensayo de campo).

Se hicieron crecer en el campo plantas de patata (*Solanum tuberosum*) de la variedad Bintje sensible a *Phytophthora infestans* cerca de Gembloux, Bélgica. 28 días después de plantarse, se realizó la primera aplicación de los tratamientos. Se aplicaron los tratamientos 10 veces a intervalos de 7 días entre aplicaciones. Se trataron las plantas mediante pulverización de 0,4 L de una disolución de prueba por hectárea. Las disoluciones de prueba se componían de elicitor solo, fungicida solo o una mezcla de ambos. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Se proporcionó el elicitor como un polvo que comprendía el 70,4% de componente activo y se aplicó a 50 g de componente activo/ha (71 g de polvo). El fungicida usado era Infinito (Bayer, Alemania), que se eligió por su alto nivel de protección de patata frente a *P. infestans*. Infinito comprende los componentes activos propamocarb y fluopicolid a 625 g/L y 62,5 g/L, respectivamente. Se aplicó el fungicida a 0,4 L/ha, que es una tercera parte de la tasa recomendada. Se detalla el resumen de las disoluciones de prueba en la tabla 1.

Tabla 1. Composiciones de las disoluciones de prueba aplicadas en patata frente a *P. infestans*.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (p/ha)
fungicida (Infinito)	0,4	L/ha	propamocarb (250) + fluopicolid (25)

elicitor	71	g/ha	complejo de oligosacárido (50)
fungicida (Infinito)	0,4	L/ha	propamocarb (250) + fluopicolid (25)
+ elicitor	71	g/ha	complejo de oligosacárido (50)

Se evaluó el porcentaje de esporulación en hojas (superficie de esporulación en comparación con superficie foliar) cada 3-4 días desde la aparición de la enfermedad en las plantas no tratadas (58 días después de plantarse), y durante 46 días, por tanto, hasta 104 días después de plantarse. Se transformaron estos valores en valores de protección mediante una comparación de los síntomas con las plantas no tratadas.

- 5 La figura 1 muestra los efectos de las disoluciones de prueba aplicadas sobre la protección de plantas de patata frente a *P. infestans* como la reducción de los síntomas en comparación con plantas no tratadas.

Durante todo el experimento, el elicitor aplicado solo no ofreció ninguna protección de plantas de patata frente a *P. infestans* en comparación con plantas no tratadas. El fungicida aplicado solo ofreció una protección total durante las dos primeras observaciones. Después de eso, se observó una reducción de la protección (desde el 100 hasta el 95%) entre los días 61 y 71 después de plantarse. Entonces se vió una disminución más brusca entre los días 71 y 104 después de plantarse. Al final del experimento, la protección disminuyó hasta el 57%. Con la mezcla del fungicida y el elicitor, también se observó una protección total durante las dos primeras observaciones. Después de que la protección alcanzase el 95% y se mantuviera esta meseta hasta el día 78 después de plantarse, que representa el mismo nivel de protección que el ofrecido por el fungicida solo una semana antes. Se alcanzó el nivel del 75% de protección en el día 89 después de plantarse para el fungicida solo mientras que este umbral sólo se alcanzaba en el día 96 cuando se mezclaba con el elicitor. Este retraso de una semana corresponde a dos ciclos de desarrollo de *P. infestans*. Por tanto, es posible retrasar la infección gracias a la adición del elicitor al fungicida. Al final del experimento, la protección ofrecida por la mezcla correspondía al 66,2%, lo que representa un aumento del 16% de la protección en comparación con el fungicida solo. Esto es inesperado, puesto que la aplicación del elicitor solo no tuvo ningún efecto sobre la infección de las plantas de patata por *P. infestans*.

Ejemplo 2. Comparación de la eficacia de un fungicida aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Plasmopara viticola* (mildíu lanuginoso) en la uva (ensayo en invernadero)

Se hicieron crecer plántulas de vid de la variedad Marselan en condiciones controladas en un invernadero.

Se trataron las plántulas mediante pulverización de una disolución de prueba en ambas caras de las hojas. Las disoluciones de prueba se componían de elicitor solo, fungicida solo o una mezcla de ambos. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Se proporcionó el elicitor como una disolución concentrada, que se diluyó para obtener una disolución de prueba que comprendía 20 mg de componente activo/L. El fungicida usado era Aliette (Bayer, Alemania), que se eligió por su alto nivel de protección de la uva frente a *P. viticola*, a pesar de la ausencia de registro en este cultivo. Se proporcionó Aliette como un polvo que comprendía el 80% de su componente activo fosetil. Se aplicó Aliette a 1,73 g/L, que es aproximadamente una cuarta parte de la tasa recomendada aplicada en manzana frente a *Erwinia amylovora*. Se detalla el resumen de las disoluciones de prueba en la tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de las disoluciones de prueba aplicadas en uva frente a *P. viticola*.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
fungicida (Aliette)	1730	mg/L	fosetil (1380)
elicitor	20	mg/L	complejo de oligosacárido (20)
fungicida (Aliette)	1730	mg/L	fosetil (1380)
+ elicitor	20	mg/L	complejo de oligosacárido (20)

- 35 Se aplicaron los tratamientos 3 días antes de se inocularan artificialmente las plántulas (mediante nebulización).

Después de la inoculación, se incubaron las plántulas en una cámara con alto grado de humedad durante 6 días después de la inoculación. Se evaluó el porcentaje de esporulación en hojas (superficie de esporulación en comparación con superficie foliar) era evaluado 7 días después de la inoculación. Se transformaron estos valores en valores de protección mediante una comparación de los síntomas con las plántulas no tratadas.

- 40 La figura 2 muestra los efectos de las disoluciones de prueba aplicadas sobre la protección de plántulas de vid frente a *P. viticola* como la reducción de los síntomas en comparación con plantas no tratadas.

El elicitor aplicado solo ofreció una protección del 64,8% frente a *P. viticola* en plántulas de vid. La protección ofrecida por el fungicida solo era mayor (90,6%) pero no total. Una vez en mezcla, estas dos compuestos ofrecieron una protección total (99,7%) frente a *P. viticola*.

- 45 Ejemplo 3. Comparación de la eficacia de un fungicida aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Phytophthora infestans* en patata (ensayo en invernadero).

Se hicieron crecer microtubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) sanos certificados de la variedad Bintje sensible a *Phytophthora infestans* en compost en recipientes individuales en condiciones controladas en un invernadero (24°C, régimen de 16 h de día/8 h de noche) durante 6 semanas. 6 semanas después de plantarse, se etiquetaron las 3 últimas hojas de cada planta justo antes del primer tratamiento, asegurándose de tener hojas de la misma edad fisiológica para inoculación adicional.

Se realizó la primera aplicación de los tratamientos 6 semanas después de plantarse y 7 días antes de la inoculación planificada. Se realizó una segunda aplicación 3 días antes de inoculación. Se aplicaron los tratamientos mediante pulverización de 50 mL de una disolución de prueba en la planta completa y en ambas caras de las hojas. Se seleccionaron 8 plantas para cada disolución de prueba que había que evaluar. Se detalla el resumen de las disoluciones de prueba en la tabla 3.

Tabla 3. Composiciones de las disoluciones de prueba aplicadas en patata frente a *P. infestans*.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
adyuvante (Dehscofix CO 95) (control)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	800	mg/L	fosetil-Al (640)
elicitor	50	mg/L	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	800	mg/L	fosetil-Al (640)
+ elicitor	50	mg/L	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-

Se aplicó el elicitor como una formulación con el adyuvante Dehscofix CO 95 (Huntsman, Bélgica). El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos (con grados de polimerización de entre 9 y 20) y quito-oligosacáridos (con grados de polimerización de entre 5 y 10 y con un grado de acetilación de aproximadamente el 25%) en proporciones iguales. El elicitor contenía además las sales CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM) y NaCl (50 mM) para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido. Se aplicó el elicitor a 50 mg de componente activo/L. El fungicida usado era Aliette, que se eligió por su perfil ecotoxicológico favorable y el efecto versátil de protección de plantas frente a oomicetos. Se proporcionó Aliette como un polvo que comprendía el 80% de su componente activo fosetil-Al. Se aplicó Aliette a 800 mg/L, que es aproximadamente una décima parte de la tasa recomendada. Se pulverizaron plantas de control con Dehscofix CO 95, el adyuvante usado en la formulación de elicitor.

3 días después del segundo tratamiento, se recogieron las 3 hojas etiquetadas de cada planta en cajas de plástico transparente individuales sobre papel de filtro con una pequeña cantidad de agua. Se recogió el inóculo de *P. infestans* de las hojas de patata y se ajustó la concentración de esporas a 10<sup>4</sup> esporas/mL antes de la inoculación. Se pusieron 2 gotas de 10 µL en cinco folíolos de las hojas de patata produciendo 10 puntos de inoculación por hoja para evaluaciones adicionales. Se incubaron todas las cajas que contenían las hojas en una cabina de crecimiento a una humedad relativa del 90% y 24°C con un régimen de 16 h de día/8 h de noche.

6 y 8 días después de la inoculación, se evaluaron las hojas para determinar la aparición de enfermedad, aparición de esporulación y superficie de esporulación.

Se evalúan la aparición de enfermedad y aparición de esporulación atribuyendo en primer lugar una puntuación, correspondiente a la fase de la lesión observada, a cada punto de inoculación.

0 : sin síntomas

1 : leve necrosis ubicada bajo la gota de inoculación, que puede ser una reacción de hipersensibilidad

2 : lesión que se extiende en forma de necrosis extensa ubicada bajo y alrededor de la gota de inoculación

3 : ligera esporulación

4 : importante esporulación

Entonces se calcula la aparición de enfermedad para cada hoja como el número de puntuaciones observadas iguales a o mayores de 2 dividido entre el número de puntos de inoculación. Produce un valor comprendido entre 0 y 1. El valor 0 de aparición de enfermedad se considera para una hoja como sin desarrollo de enfermedad para todos los puntos de inoculación y el valor 1 como desarrollo de enfermedad en todos los puntos de inoculación.

Se calcula la aparición de esporulación para cada hoja como el número de puntuaciones observadas iguales a o mayores de 3 dividido entre el número de puntos de inoculación. También produce un valor comprendido entre 0 y 1. El valor 0 de aparición de esporulación se considera para una hoja como sin esporulación de tizón tardío para todos los puntos de inoculación y el valor 1 como presencia de esporulación de tizón tardío en todos los puntos de inoculación.

La superficie de esporulación es una estimación visual de la superficie de la hoja con esporulación expresada. La figura 3 representa la media de aparición de enfermedad, la figura 4 la media de aparición de esporulación y la figura 5 el porcentaje de superficie foliar con esporulación.

5 El fungicida Aliette, aplicado a una tasa 10 veces menor de la recomendada, confiere protección parcial. Esta protección es especialmente notable en cuanto a la aparición de esporulación y porcentaje de esporulación. El elicitor también reduce la aparición de enfermedad y esporulación, pero la reducción de los síntomas conferidos por el fungicida es mayor de la obtenida después de la aplicación del elicitor. De manera más interesante, estos datos destacan el hecho de que la reducción de los síntomas de la mezcla de fungicida y elicitor es mayor que la de los dos compuestos de prueba solos. Por tanto, la adición del elicitor a una baja tasa del fungicida mejora el control del desarrollo de enfermedad.

Ejemplo 4. Comparación de la eficacia de un fungicida aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) en trigo de invierno (ensayo de campo).

Se hizo crecer en el campo trigo de invierno de la variedad Istabraq muy sensible a *Septoria tritici* cerca de Namur, Bélgica.

15 Se trataron las plantas o bien con fungicida solo, elicitor solo o bien con una combinación de ambos. El fungicida usado era Opus (BASF, Alemania), que se eligió por su alto nivel de protección de trigo de invierno frente a *S. tritici*. Opus comprende el componente activo epoxiconazol a 125 g/L. Se aplicó el fungicida a 0,25 L/ha, que es una cuarta parte de la tasa recomendada. Se aplicó el fungicida solo en las fases 32 (segundo nudo detectable) y 55 (emergencia de inflorescencia al 50%).

20 El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Se proporcionó el elicitor como una disolución concentrada que comprendía 10 g/L de componente activo y se aplicó solo a 1 L/ha solo en las fases 30 (espiga a 1 cm), 32 (segundo nudo detectable), 39 (lígula de hoja apical apenas visible) y 55 (emergencia de inflorescencia al 50%).

25 También se aplicaron el fungicida y el elicitor en combinación como un programa: se aplicó el fungicida en las fases 32 y 55 mientras que se aplicó el elicitor en las fases 30, 32, 39 y 55. Se resumen los tratamientos en la tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos aplicados sobre trigo de invierno frente a *S. tritici*.

Disolución de prueba	Fase	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (g/ha)
fungicida (Opus)	32, 55	0,25	L/ha	epoxiconazol (31,25)
elicitor	30,32,39,55	1	L/ha	complejo de oligosacárido (10)
fungicida (Opus) + elicitor	32,55 30,32,39,55	0,25 1	L/ha L/ha	epoxiconazol (31,25) complejo de oligosacárido (10)

30 Se realizaron evaluaciones de las enfermedades de las hojas en 15 plantas seleccionadas al azar en cada parcela de cuatro réplicas. Se evaluó visualmente el porcentaje de la superficie foliar (gravedad de la plaga) colonizada por la enfermedad en las diferentes capas de hojas. También se calcularon los porcentajes de hojas con síntomas de la enfermedad (incidencia de la plaga).

Se evaluaron los efectos sinérgicos mediante la aplicación del método definido por Colby (1967, "Calculation of the synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations", Weeds, 15, páginas 20-22) usando la siguiente fórmula, que también se denomina la fórmula de Colby:

$$35 \quad E = X + Y - \frac{XY}{100}$$

en la que E representa el porcentaje esperado de inhibición de la plaga para la combinación de los dos compuestos a dosis definidas, X es el porcentaje de inhibición observado para la plaga por el compuesto (A) a una dosis definida, Y es el porcentaje de inhibición observado para la plaga por el compuesto (B) a una dosis definida. Cuando el porcentaje de inhibición observado para la combinación es mayor que E, existe un efecto sinérgico.

40 La figura 6 muestra los efectos de los tratamientos aplicados sobre la gravedad de la enfermedad provocada por *S. tritici* sobre trigo de invierno.

45 Los porcentajes de gravedad de la plaga con los dos compuestos solos fueron del 18,1 (para el fungicida) y el 18,8% (para el elicitor), mientras que se evaluó el mismo parámetro al 24,7% para el control no tratado. La reducción de la gravedad en comparación con el control no tratado corresponde al 26,8 y al 23,9% en presencia del fungicida y el elicitor, respectivamente. Una vez en combinación estos dos tratamientos presentan un porcentaje de gravedad del 9,1%, que corresponde a una reducción de los síntomas del 63,1% en comparación con el control no tratado. El análisis de Colby demuestra un efecto sinérgico referente a la gravedad de la plaga entre el fungicida y el elicitor. El

porcentaje observado de protección (63,1%) es mayor que el porcentaje esperado de protección E (44,3%), en el que E se calculó como:

$$E = 26,8 + 23,9 - \frac{26,8 \times 23,9}{100} = 44,3\%$$

5 La figura 7 muestra los efectos de los tratamientos aplicados en la incidencia de la enfermedad provocada por *S. tritici* sobre trigo de invierno.

Los porcentajes de incidencia de la plaga con los dos compuestos solos fueron del 83,3 (para el fungicida) y el 78,3% (para el elicitor), mientras que se evaluó el mismo parámetro al 95,0% para el control no tratado. La reducción de la incidencia en comparación con el control no tratado corresponde al 12,3 y al 17,5% en presencia del fungicida y el elicitor, respectivamente. Una vez en combinación, estos dos tratamientos presentan un porcentaje de incidencia del 66,7%, que corresponde a una reducción de los síntomas del 29,8% en comparación con el control no tratado. El análisis de Colby también demuestra un efecto sinérgico referente a la incidencia de la plaga entre el fungicida y el elicitor. El porcentaje observado de protección (29,8%) es mayor que el porcentaje esperado de protección E (27,6%), en el que E se calculó como:

$$E = 12,3 + 17,5 - \frac{12,3 \times 17,5}{100} = 27,6\%$$

15 Ejemplo 5. Comparación de la actividad peroxidasa de tomate tratado con un elicitor solo, un fungicida solo o una mezcla de ambos (ensayo en invernadero).

Se hicieron crecer plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, variedad Saint Pierre) en condiciones controladas en un invernadero (24°C, régimen de 16 h de día/8 h de noche) durante 4 semanas. 1 día antes del tratamiento, se colocaron plantas de 4 semanas de edad en una cabina de crecimiento (Weiss) a 18°C con un régimen de 16 h/8 h de día/noche y una humedad relativa del 90%. Se regaron las plantas 2 h antes del tratamiento. Para cada tratamiento, se pulverizaron 12 plantas de tomate con 200 mL de una disolución de prueba en ambos lados de las hojas hasta escurrirse. La composición de las disoluciones de prueba se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en tomate.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
adyuvante (Dehscofix CO 95) (control)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	400	mg/L	fosetil-Al (320)
fungicida (Aliette)	800	mg/L	fosetil-Al (640)
fungicida (Aliette)	1600	mg/L	fosetil-Al (1280)
fungicida (Aliette) + elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	400 50 0,1%	mg/L mg/L v/v	fosetil-Al (320) complejo de oligosacárido (50) -
fungicida (Aliette) + elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	800 50 0,1%	mg/L mg/L v/v	fosetil-Al (640) complejo de oligosacárido (50) -
fungicida (Aliette) + elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	1600 50 0,1%	mg/L mg/L v/v	fosetil-Al (1280) complejo de oligosacárido (50) -
elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50) -

25 Se aplicó el elicitor como una formulación con el adyuvante Dehscofix CO 95. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos (con grados de polimerización de entre 9 y 20) y quito-oligosacáridos (con grados de polimerización de entre 5 y 10 y con un grado de acetilación de aproximadamente el 25%) en proporciones iguales. El elicitor contenía además las sales CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM) y NaCl (50 mM) para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido y sacarosa (10 mM). Se aplicó el elicitor a 50 mg de componente activo/L. El fungicida usado era Aliette, que se eligió por su perfil ecotoxicológico favorable y el efecto versátil de protección de plantas frente a oomicetos. Se proporcionó Aliette como un polvo que comprendía el 80% de su componente activo fosetil-Al. Se aplicó Aliette a 400, 800 ó 1600 mg/L, mientras que la tasa recomendada es de 8000 g/L. Se pulverizaron plantas de control con Dehscofix CO95, el adyuvante usado en la formulación de elicitor. 24 h después del tratamiento, se tomaron muestras de las hojas de cada planta individualmente, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa según el procedimiento de ensayo (N.º de ref. FGAP001) para peroxidasa (unidades de guayacol) proporcionado por Faizyme Laboratories

(<http://www.faizyme.com/assaperg.htm>). Se molieron las muestras congeladas en nitrógeno líquido hasta un polvo fino con un triturador MM 400 de RETSCH. Se extrajeron las proteínas usando tampón acetato (0,1 M, pH 5,2) que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol (0,014 M). En resumen, se homogeneizaron 0,5 g de polvo de hojas con un aparato Ultra-Turrax (IKA) y se centrifugó a 4000 rpm (4°C) durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se filtró a través de Miracloth (Calbiochem) y se congeló directamente con nitrógeno líquido. Se midió el contenido de proteína a 630 nm usando el reactivo de ensayo de proteínas de Bio Rad con albúmina sérica bovina como patrón. Se realizaron los ensayos de actividad peroxidasa con extractos frescos. Se usaron guayacol (0,17 M) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,19 M) como sustratos. Se determinó la cinética de formación de tetraguayacol midiendo la absorbancia cada minuto a 420 nm. La pendiente de los datos permitió expresar la actividad peroxidasa en “mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>” y se normalizaron los resultados ajustando el tratamiento con adyuvante (control) al 100%. Se realizaron todas las mediciones usando el espectrofotómetro con lector de microplacas ELx800 Universal (Bio-Tek, instruments, INC) y se realizaron análisis estadísticos con el software Minitab (Minitab, 2007).

La figura 8 muestra el efecto de las diferentes disoluciones de prueba sobre la actividad peroxidasa de las hojas de tomate.

El fungicida (Aliette) aplicado solo no modificó significativamente la actividad peroxidasa de las hojas de tomate. La adición del elicitor estadísticamente aumentó la actividad peroxidasa. Por tanto, el mezclado del elicitor con Aliette confiere actividad peroxidasa a la planta además del efecto fungicida intrínseco. Inesperadamente, el fungicida usado parece influir negativamente en el efecto del elicitor. Reduciendo la concentración del fungicida, pudo aumentarse la inducción del sistema inmunitario de plantas por el elicitor.

#### Ejemplo 6. Comparación de la actividad peroxidasa de tomate tratado con un elicitor solo o combinado con un fungicida (ensayo en invernadero).

Se trataron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, variedad Saint Pierre) como en el ejemplo 4. La composición de las disoluciones de prueba se detalla en la tabla 6.

Tabla 6. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en tomate.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
adyuvante (Dehscofix CO 95) (control)	0,1%	v/v	-
elicitor	25	mg/L	complejo de oligosacárido (25)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
elicitor	50	mg/L	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
elicitor	75	mg/L	complejo de oligosacárido (75)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	400	mg/L	fosetil-Al (320)
+ elicitor	25	mg/L	complejo de oligosacárido (25)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	400	mg/L	fosetil-Al (320)
+ elicitor	50	mg/L	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
fungicida (Aliette)	400	mg/L	fosetil-Al (320)
+ elicitor	75	mg/L	complejo de oligosacárido (75)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-

Se aplicó el elicitor como una formulación con el adyuvante Dehscofix CO 95. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos (con grados de polimerización de entre 9 y 20) y quito-oligosacáridos (con grados de polimerización de entre 5 y 10 y con un grado de acetilación de aproximadamente el 25%) en proporciones iguales. El elicitor contenía además las sales CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM) y NaCl (50 mM) para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido y sacarosa (10 mM). Se aplicó el elicitor a 25, 50 ó 75 mg de componente activo/L. El fungicida usado era Aliette, que se eligió por su perfil ecotoxicológico favorable y el efecto versátil de protección de plantas frente a oomicetos. Se proporcionó Aliette como un polvo que comprendía el 80% de su componente activo fosetil-Al. Se aplicó Aliette a 400 mg/L, mientras que la tasa recomendada es de 8000 g/L. Se pulverizaron plantas de control con Dehscofix CO 95, el adyuvante usado en la formulación de elicitor. 24 h después del tratamiento, se tomaron muestras de las hojas de cada planta individualmente, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa según el experimento 5.

La figura 9 muestra los efectos del elicitor aplicado solo o en combinación con fungicida sobre la actividad peroxidasa de las hojas de tomate.

La actividad peroxidasa aumentó significativamente mediante la aplicación del elicitor a tomate. En el intervalo de elicitor sometido a prueba solo (0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L) la actividad peroxidasa parece aumentar de modo lineal con la concentración del elicitor. El R<sup>2</sup> (coeficiente de determinación) de esta relación es de

aproximadamente el 87%, lo que es bastante bueno para una respuesta biológica. El fungicida (Aliette) aplicado solo no modificó significativamente la actividad peroxidasa de las hojas de tomate. Cuando se aplica en combinación con el elicitor, la actividad peroxidasa de las hojas también aumenta con la concentración de elicitor. Sin embargo, en combinación con el fungicida, la concentración de elicitor debe ser mayor para producir una actividad similar a la obtenida con el elicitor pulverizado solo a la misma tasa. El mezclado del elicitor con el fungicida confiere actividad peroxidasa a la planta además del efecto fungicida intrínseco de Aliette.

Ejemplo 7. Comparación de la actividad peroxidasa de tomate tratado con un elicitor solo o formulado con diferentes tensioactivos (ensayo en invernadero).

Se trataron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, variedad Saint Pierre) como en el ejemplo 4. La composición de las disoluciones de prueba se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en tomate.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
elicitor	50	mg/L	complejo de oligosacárido (50)
elicitor + Dehscofix CO 95	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50) -
elicitor + Tensiofix Dp400	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50) -
elicitor + Tensiofix D33	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50) -

El elicitor o bien se aplicó solo o bien se formuló con diferentes tensioactivos. Se añadieron los tensioactivos al 0,1 por ciento en volumen a la formulación de elicitor. Dehscofix CO 95 es un aceite de ricino etoxilado, un aceite vegetal no iónico. Tensiofix D33 (Ajinomoto OmniChem, Bélgica) es un agente extensor de mojado no iónico y Tensiofix Dp400 (Ajinomoto OmniChem, Bélgica) es una sal aniónica que presenta propiedades de dispersión. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos (con grados de polimerización de entre 9 y 20) y quito-oligosacáridos (con grados de polimerización de entre 5 y 10 y con un grado de acetilación de aproximadamente el 25%) en proporciones iguales. El elicitor contenía además las sales CaCl<sub>2</sub> (0,07 mM) y KNO<sub>3</sub> (8 mM) para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido y sacarosa (10 mM). Se aplicó el elicitor a 50 mg de componente activo/L. 24 h después del tratamiento, se tomaron muestras de las hojas de cada planta individualmente, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa según el experimento 5.

La figura 10 muestra el efecto de los tensioactivos sobre la actividad peroxidasa de las hojas de tomate inducida por el elicitor.

Dehscofix CO 95, un potenciador de la penetración, y Tensiofix Dp 400, un agente dispersante, ambos en combinación con el elicitor dieron un aumento doble de la actividad peroxidasa en comparación con el elicitor solo.

Ejemplo 8. Comparación de la actividad peroxidasa de patata tratada con combinaciones de elicitor (ensayo en invernadero).

Se hicieron crecer plantas de patata (*Solanum tuberosum*, variedad Bintje) en condiciones controladas en un invernadero (24°C, régimen de 16 h de día/8 h de noche) durante 6 semanas.

Se trataron las plantas dos veces: se realizó una primera aplicación de los tratamientos 7 días antes de la cosecha de las hojas, se realizó una segunda aplicación 3 días antes de la cosecha. Para cada tratamiento, se pulverizaron 8 plantas de patata con 200 mL de una disolución de prueba en ambos lados de las hojas hasta escurrirse. La composición de las disoluciones de prueba se detalla en la tabla 8.

Tabla 8. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en patata.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
adyuvante (Dehscofix CO 95) (control)	0,1%	v/v	-
elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50) -
elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	50 0,1%	mg/L v/v	complejo de oligosacárido (50)
+ elicitor Vacciplant Fruit	0,25%	v/v	laminarina (45000)
elicitor Vacciplant Fruit	0,25%	v/v	laminarina (45000)

Se aplicó el elicitor como una formulación con el adyuvante Dehscofix CO 95. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos (con grados de polimerización de entre 9 y 20) y quito-oligosacáridos (con grados de polimerización de entre 5 y 10 y con un grado de acetilación de

aproximadamente el 25%) en proporciones iguales. El elicitor contenía además las sales CaCl<sub>2</sub> (0,07 mM) y KNO<sub>3</sub> (14 mM) para garantizar buenas condiciones iónicas para la estabilidad del complejo de oligosacárido. Se aplicó el elicitor a 50 mg de componente activo/L. En un tratamiento, se combinó el elicitor con un segundo elicitor, Vacciplant Fruit. Vacciplant Fruit se obtuvo de Belchim (Bélgica) y contenía laminarina (un β(1→3)-glucano lineal con uniones β(1 →6)) como componente activo. Se aplicó Vacciplant Fruit a la tasa recomendada del 0,25% (v/v). Se pulverizaron plantas de control con Dehscofix CO 95, el adyuvante usado en la formulación de elicitor.

3 días después de la segunda aplicación de los tratamientos, se tomaron muestras de 3 hojas en la misma fase fisiológica por planta. Se combinaron las hojas de 2 plantas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa como se detalla en el ejemplo 5.

La figura 11 muestra el efecto de combinar el elicitor de quito-oligosacárido - oligo-galacturonano (COS-OGA) con un segundo elicitor (Vacciplant Fruit) en la inducción de actividad peroxidasa.

Cuando se aplicó solo, el segundo elicitor, Vacciplant Fruit, no mejoró la actividad peroxidasa en comparación con el control. La pulverización de plantas con el elicitor COS-OGA produjo un aumento significativo de la actividad peroxidasa. Se obtuvo un efecto sinérgico cuando se combinó el elicitor COS-OGA con el elicitor Vacciplant Fruit.

Ejemplo 9. Eficacia del elicitor de oligosacárido en el control de *Chaetosiphon fragaefolii* (pulgones) en fresa.

Se hicieron crecer fresas (cultivar Anaís) en jaulas. Se usaron tres jaulas, que contenían cada una 3 fresaes en este experimento.

En los días D-7 y D-1 se trataron los fresaes con un elicitor. Se proporcionó el elicitor como una formulación líquida que comprendía 10 g/L de componente activo, que era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Después de dilución (200 veces), se aplicó el elicitor a 50 ppm. Se pusieron seis pulgones adultos (*Chaetosiphon fragaefolii*) en cada fresal en el día D-0.

Se realizaron evaluaciones de los números de pulgones en 3 plantas seleccionadas al azar (una en cada una de 3 réplicas) en los días D+19 y D+26.

La figura 12 muestra los efectos del elicitor sobre el desarrollo de los pulgones en fresaes 19 días después de la inoculación. El número de pulgones era de 139 por planta para el control no tratado, mientras que el número de pulgones se redujo a 114 por planta tras las aplicaciones de elicitor. Esto corresponde a una reducción de los pulgones en el 18% en presencia del elicitor.

La figura 13 muestra los efectos del elicitor sobre el desarrollo de los pulgones en fresaes 26 días después de la inoculación. El número de pulgones era de 315 por planta para el control no tratado, mientras que el número de pulgones se redujo a 260 por planta tras las aplicaciones de elicitor. Esto corresponde a una reducción de los pulgones en el 17,5% en presencia del elicitor. Eso significa que la protección obtenida después de sólo dos aplicaciones del elicitor dura al menos un mes.

Ejemplo 10. Comparación de la eficacia de un fungicida aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Sphaerotheca fuliginea* (mildió vellosa) en plántulas de pepino (ensayo en invernadero).

Se hicieron crecer plántulas de pepino en un invernadero.

Se trataron las plántulas con fungicida solo, elicitor solo o una combinación de ambos tal como se resume en la tabla 9. Se aplicaron las disoluciones de prueba una vez en el día 0 y una segunda vez en el día +7 (fase de 2/4 hojas).

Tabla 9. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en pepino.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (mg/L)
fungicida (LEGEND)	0,001	L/hL	quinoxifeno (2,5)
elicitor	0,8	L/hL	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,08	L/hL	-
fungicida (LEGEND)	0,001	L/hL	quinoxifeno (2,5)
+ elicitor	0,8	L/hL	complejo de oligosacárido (50)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,008	L/hL	-

El fungicida usado era LEGEND (Dow Agrosiences), que se eligió por su alto nivel de protección de pepino frente a *S. fuliginea* y porque su modo de acción consiste en el bloqueo de la ruta de transducción de señales tempranas. LEGEND comprende el componente activo quinoxifeno a 250 g/L. Se aplicó el fungicida a 0,001 L/hL, que es una vigésima parte de la tasa recomendada máxima. Se aplicó el elicitor como una formulación con el adyuvante Dehscofix CO 95. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-

galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente en presencia de sales recomendadas. Se proporcionó el elicitor como una disolución concentrada que comprende 6,25 g/L de componente activo. Se aplicó el elicitor a 0,8 L diluido en 100 L. Se aplicó el elicitor con 0,08 L de adyuvante Dehscofix CO 95 en 100 L, lo que se requiere para la penetración del elicitor en las hojas. También se aplicaron el fungicida y el elicitor (+ 0,08 L/hL de Dehscofix CO 95) en la mezcla. Se produjo infestación natural (desde el día +7) y se llevó a cabo inoculación artificial adicional en el día + 10.

Se realizaron evaluaciones de la enfermedad de las hojas en 16 plantas a partir de 4 réplicas. Se evaluaron visualmente los porcentajes de hojas con síntomas de la enfermedad (frecuencia de plagas) y los porcentajes de la superficie foliar colonizada por la enfermedad (gravedad de la plaga). Se realizaron estas evaluaciones en el día +7 (sólo infestación natural) y +18 (también inoculación artificial) y se calculó la protección con referencia al control no tratado.

La figura 14 muestra los efectos de los tratamientos sobre la frecuencia de la enfermedad provocada por *S. fuliginea* en plántulas de pepino en el día +7. En este momento, sólo se produjo infestación natural. La protección (expresada como la reducción de la frecuencia de plagas) era del 50% para el fungicida y el 81% para el elicitor (complejo de oligosacárido + Dehscofix CO 95), mientras que protección alcanzó el 100% para la mezcla de ambos (fungicida y elicitor). El análisis de Colby muestra que existe un efecto sinérgico entre el fungicida y el elicitor referente a la frecuencia de plagas. El porcentaje observado de protección (100%) es mayor que el porcentaje esperado de protección (90,5%), en el que E se calculó como:

$$E = 50 + 81 - \frac{50 \times 81}{100} = 90,5$$

La figura 15 muestra los efectos de los tratamientos sobre la gravedad de la enfermedad provocada por *S. fuliginea* en plántulas de pepino en el día +7. El porcentaje de protección (expresada como la reducción de gravedad de la plaga) era del 82% (para el fungicida) y el 93% (para el elicitor), mientras que se evaluó el mismo parámetro al 100% para la mezcla de tanto fungicida como elicitor. El análisis de Colby muestra que existe un ligero efecto sinérgico entre el fungicida y el elicitor referente a la gravedad de la plaga. El porcentaje observado de protección (100%) es mayor que el porcentaje esperado de protección E (98,7%), en el que E se calculó como:

$$E = 82 + 93 - \frac{82 \times 93}{100} = 98,7$$

La figura 16 muestra los efectos de los tratamientos sobre la frecuencia de la enfermedad provocada por *S. fuliginea* en plántulas de pepino en el día +18. En este momento, los síntomas también resultaron de la inoculación artificial. El porcentaje de protección (expresada como la reducción de la frecuencia de plagas) era del 53% para el fungicida y el 9% para el elicitor (complejo de oligosacárido + Dehscofix CO 95), mientras que se evaluó la protección al 88% para la mezcla de ambos (fungicida y elicitor). El análisis de Colby muestra que existe un efecto sinérgico entre el fungicida y el elicitor referente a la frecuencia de plagas. El porcentaje observado de protección (88%) es mucho mayor que el porcentaje esperado de protección E (57,2%), en el que E se calculó como:

$$E = 53 + 9 - \frac{53 \times 9}{100} = 57,2$$

La figura 17 muestra los efectos de los tratamientos sobre la gravedad de la enfermedad provocada por *S. fuliginea* en plántulas de pepino en el mismo momento (día +18). El porcentaje de protección (expresada como la reducción de gravedad de la plaga) era del 89% (para el fungicida) y el 24% (para el elicitor), mientras que se evaluó el mismo parámetro al 99% para la mezcla de ambos (fungicida y elicitor). El análisis de Colby muestra de nuevo un claro efecto sinérgico entre el fungicida y el elicitor referente a la gravedad de la plaga. El porcentaje observado de protección (99%) es mayor que el porcentaje esperado de protección E (91,6%), en el que E se calculó como:

$$E = 89 + 24 - \frac{89 \times 24}{100} = 91,6$$

En conclusión, cualesquiera que sean el parámetro (frecuencia de plagas y gravedad de la plaga) y la evaluación (en el día +7 y el día +18), se observa un efecto sinérgico entre el elicitor y una tasa muy baja del fungicida LEGEND (quinoxifeno).

Ejemplo 11. Comparación de la eficacia de un fungicida que contiene azufre aplicado solo o mezclado con un elicitor en el control de *Erysiphe necator* (mildió velloso) (ensayo de campo).

Se llevó a cabo el ensayo de campo en un viñedo en Francia.

Se trataron las vides con fungicida solo, elicitor solo o una combinación de ambos tal como se resume en la tabla 10. El volumen de pulverización total era de 400 L/ha.

Tabla 10. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en vid.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos (g/ha)
fungicida (THIOVIT)	25	kg/ha	azufre (20000)
elicitor	4	L/ha	complejo de oligosacárido (25)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,4	L/ha	-
fungicida (THIOVIT)	20	kg/ha	azufre (16000)
+ elicitor	4	L/ha	complejo de oligosacárido (25)
+ adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,4	L/hL	-

5 El fungicida aplicado era THIOVIT, que contiene el 80% de azufre como componente activo. THIOVIT se eligió porque el azufre se usa ampliamente para proteger de manera preventiva la vid frente a *E. necator* (mildíu veloso) y especialmente porque es un fungicida de múltiples sitios junto con compuestos tales como cobre, ditiocarbamatos, ftalimidias, cloronitrilos y triazinas (<http://frac.info/frac/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202011-final.pdf>). Se aplicó THIOVIT a 25 kg/ha/estación, que es aproximadamente una tercera parte de la tasa recomendada. El componente activo en el elicitor COS-OGA es un complejo de oligosacárido que consiste en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Se proporcionó el elicitor como una disolución concentrada que comprendía 6,25 g/L de componente activo. Se aplicó el elicitor a 4 L/ha como una formulación con 0,4 L/ha de adyuvante Dehscofix CO 95, lo que se requiere para la penetración del elicitor en las hojas. También se aplicaron THIOVIT y el elicitor (con 0,4 L/ha Dehscofix CO 95) en combinación.

15 Se realizó la evaluación de las hojas seis semanas después de la aparición de infestación en frutos. Se evaluaron visualmente los porcentajes de hojas con síntomas de la enfermedad (frecuencia de plagas) y los porcentajes de la superficie foliar colonizada por la enfermedad (intensidad de la plaga) y se calculó la protección con respecto al control no tratado.

20 La figura 18 muestra los efectos de los tratamientos sobre la frecuencia y la gravedad de la enfermedad provocada por *E. necator* en hojas seis semanas después de aparecer los primeros síntomas en el control no tratado. La reducción de la frecuencia para el fungicida THIOVIT solo era del 60,6% mientras que se evaluó este parámetro al 57,6% para el elicitor (complejo de oligosacárido + Dehscofix CO 95) solo. La reducción de la frecuencia para la mezcla tanto de THIOVIT como de elicitor era del 93,1%. El análisis de Colby demuestra que existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA y el fungicida de múltiples sitios THIOVIT referente a la frecuencia de plagas. El porcentaje observado de protección (93,1%) es mayor que el porcentaje esperado de protección E (83,3%), que se calculó como:

$$E = 60,6 + 57,6 - \frac{60,6 \times 57,6}{100} = 83,3$$

Ejemplo 12. Comparación de la actividad peroxidasa de tomate tratado con un elicitor solo o formulado con un tensioactivo (ensayo en invernadero).

30 Se hicieron crecer plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. MoneyMaker) durante cuatro semanas a 24°C con un régimen de 16 h/8 h de día/noche y se regaron todas cada dos a tres días.

Veinticuatro horas antes del tratamiento, se transfirieron las plantas bien regadas a una cabina de crecimiento a temperatura (18°C) y humedad (90%) constantes con el mismo fotoperiodo. Para cada tratamiento, se pulverizaron 12 plantas hasta escurrirse en ambas caras de las hojas con 200 mL de una disolución de prueba y se devolvieron al incubador durante un día más. Las composiciones de las disoluciones de prueba se detallan en la tabla 11.

35 Tabla 11. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en tomate.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos
agua destilada (control)	-	-	-
adyuvante (Dehscofix CO 95)	0,1%	v/v	-
elicitor	62,5	ppm	complejo de oligosacárido
elicitor + adyuvante (Dehscofix CO 95)	62,5 0,1%	ppm v/v	complejo de oligosacárido (25)

Veinticuatro horas después del tratamiento, se tomaron muestras de las hojas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la trituración en nitrógeno líquido, extracción de proteínas y cuantificación de peroxidases. Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa según el ejemplo 5.

40 La figura 19 muestra los efectos de los tratamientos sobre la actividad peroxidasa de las hojas de tomate. El

adyuvante solo sólo ofreció un ligero aumento de la actividad peroxidasa (10,7%) en comparación con el tratamiento de control, mientras que el aumento de la actividad peroxidasa alcanzó el 85,7% con el tratamiento con elicitor COS-OGA. El aumento de la actividad peroxidasa observado con la combinación del elicitor COS-OGA y el adyuvante Dehscofix CO 95 (225% en comparación con agua) es mucho mayor que el aumento esperado E (87,2%), que se calculó como:

$$E = 10,7 + 85,7 - \frac{10,7 \times 85,7}{100} = 87,2\%$$

Por consiguiente, existe un efecto sinérgico entre el adyuvante Dehscofix CO 95 y el elicitor COS-OGA referente a la actividad peroxidasa.

Ejemplo 13. Comparación de la actividad peroxidasa de tomate tratado con el elicitor COS-OGA coformulado con o sin elicitor de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (ensayo en invernadero).

Se hicieron crecer plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. Moneymaker) durante cuatro semanas a 24°C con un régimen de 16 h/8 h de día/noche y se regaron bien cada dos a tres días.

Veinticuatro horas antes del tratamiento, se transfirieron las plantas bien regadas a una cabina de crecimiento a temperatura (18°C) y humedad (90%) constantes con el mismo fotoperiodo. Para cada tratamiento, se pulverizaron 12 plantas hasta escurrirse en ambas caras de las hojas con 200 mL de una disolución de prueba y se devolvieron al incubador durante un día más. Las composiciones de las disoluciones de prueba se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Composiciones de disoluciones de prueba aplicadas en tomate.

Disolución de prueba	Tasa	Unidad de la tasa	Componentes activos
A: agua destilada (control)	-	-	-
B: elicitor COS-OGA + adyuvante (Dehscofix CO 95)	50 0,1%	ppm v/v	complejo de oligosacárido -
C: elicitor de Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> + adyuvante (Dehscofix CO 95)	2 0,1%	mM v/v	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>
D: elicitor de Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> + adyuvante (Dehscofix CO 95)	5 0,1%	mM v/v	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> -
E: elicitor COS-OGA + elicitor de Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> + adyuvante (Dehscofix CO 95)	2 0,1%	mM v/v	complejo de oligosacárido Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>
F: elicitor COS-OGA + elicitor de Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> + adyuvante (Dehscofix CO 95)	5 0,1%	mM v/v	complejo de oligosacárido Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> -

Veinticuatro horas después del tratamiento, se tomaron muestras de las hojas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la molienda en nitrógeno líquido, extracción de proteínas y cuantificación de peroxidasas. Se sometieron a prueba todas las muestras para determinar la actividad peroxidasa según el ejemplo 5.

La figura 20 muestra los efectos de los tratamientos sobre la actividad peroxidasa de las hojas de tomate. El tratamiento con el elicitor COS-OGA en combinación con el adyuvante Dehscofix dio como resultado un aumento de la actividad peroxidasa del 165% en comparación con el tratamiento de control, mientras que el aumento de la actividad peroxidasa sólo alcanzó el 16,1% en presencia de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 2 mM solo e incluso disminuyó ligeramente (-7%) en presencia de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 5 mM solo. El análisis de Colby demuestra que existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA y Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 2 mM referente a la actividad peroxidasa. El aumento de la actividad peroxidasa observado (209%) es mucho mayor que el aumento esperado E (154%), que se calculó como:

$$E = 165 + 16 - \frac{165 \times 16}{100} = 154\%$$

El análisis de Colby muestra que existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA en combinación con Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 5 mM referente a la actividad peroxidasa. El aumento de la actividad peroxidasa observado con la combinación de elicitor COSOGA y Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 5 mM (308% con respecto a agua) es mucho mayor que el aumento esperado a partir de los componentes solos (170%), que se calculó como:

$$E = 165 + (-7) - \frac{165 \times (-7)}{100} = 170\%$$

En conclusión, existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA en combinación con el adyuvante Dehscofix CO

95 y el elicitor de silicio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) referente a la actividad peroxidasa.

Ejemplo 14. Comparación de la eficacia de los fungicidas componente A de Ranman, Previcur N y Signum aplicados solos o mezclados con un elicitor en el control de *Phytophthora infestans* en patata (en condiciones controladas).

5 Se hicieron crecer plantas de patata (*Solanum tuberosum*, variedad Bintje) en condiciones controladas. Se trataron las plantas dos veces en el día -7 y el día -1 antes de la inoculación artificial de las hojas de patata (día 0) mediante pulverización de una disolución de prueba en las plantas. Se llevó a cabo la inoculación artificial mediante la aplicación de gotas de 10 µL que contenían 5·10<sup>4</sup> esporas de *P. infestans* por mL en los lados inferiores de las hojas.

10 Las disoluciones de prueba se componían de elicitor solo, fungicida solo o una combinación de ambos. Los fungicidas sometidos a prueba fueron componente A de Ranman, Previcur N y Signum, que se eligieron porque se usan ampliamente para proteger a patata frente a *P. infestans* (mildíu lanuginoso). El componente A de Ranman contenía ciazofamida 400 g/L (un inhibidor del complejo II de la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias) como componente activo, Previcur N contenía propamocarb 722 g/L (un disruptor de la permeabilidad de la membrana celular) como componente activo y Signum contenía el 26,7% (p/p) de piraclostrobina y el 6,7% (p/p) de boscalid como componentes activos. Se aplicó el fungicida del componente A de Ranman a una milésima parte de su tasa recomendada. Se aplicaron los fungicidas Previcur N y Signum a una centésima parte de su tasa recomendada. También se aplicaron los fungicidas en combinación con la formulación de elicitor. El componente activo en el elicitor era un complejo de oligosacárido que consistía en oligo-galacturonanos cargados negativamente estabilizados por quito-oligosacáridos cargados positivamente. Se proporcionó el elicitor como una disolución lista para usar que contenía 50 mg/L de componente activo y el 0,1% (v/v) del adyuvante Tensiofix DP400. Se realizó la evaluación de la superficie de esporulación en las hojas cada día entre el tercer y el sexto día después de la inoculación artificial para calcular el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC). Al final de la prueba, el 100% de la superficie foliar de los controles (plantas no tratadas) estaba cubierto con esporulación.

25 La figura 21 muestra la protección de los tratamientos frente a la esporulación provocada por *P. infestans* en hojas de patata calculada a partir de la AUDPC del control (plantas no tratadas). Los fungicidas aplicados solos ofrecieron una protección del 81,3% (componente A de Ranman), del 39,3% (Previcur N) y del 99,2% (Signum). El elicitor aplicado solo ofreció una protección del 63,1%. El porcentaje observado de protección (97,5%) ofrecido por la combinación del fungicida del componente A de Ranman y el elicitor es mayor que el porcentaje esperado de protección (93,1%), que se calculó como:

30 
$$E = 81,3 + 63,1 - \frac{81,3 \times 63,1}{100} = 93,1\%$$

Por consiguiente, existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA y el fungicida del componente A de Ranman referente a la protección de patata frente a *P. infestans*. El porcentaje observado de protección (80,7%) ofrecido por la combinación del fungicida Previcur N y el elicitor es mayor que el porcentaje esperado de protección (77,6%), que se calculó como:

35 
$$E = 39,3 + 63,1 - \frac{39,3 \times 63,1}{100} = 77,6\%$$

Por consiguiente, también existe un efecto sinérgico entre el elicitor COS-OGA y el fungicida Previcur N referente a la protección de patata frente a *P. infestans*.

40 El porcentaje observado de protección ofrecido por la combinación del fungicida Signum y el elicitor era de sólo el 79,8%, lo que indica que no existía sinergia entre el elicitor COS-OGA y este fungicida. En cambio, la adición del elicitor COS-OGA al fungicida Signum tuvo un claro efecto antagonista referente a la protección de patata frente a *P. infestans*. También se observó un efecto antagonista sobre la protección de plantas de la adición del elicitor COS-OGA a un fungicida con otros fungicidas (Tabla 13).

Tabla 13. Ejemplos de fungicidas que actúan de manera antagonista con el elicitor COS-OGA.

Fungicida			Ensayo
Nombre comercial	Componente activo	Clase de fungicida	
Signum	26,7% (p/p) de piraclostrobina y 6,7% (p/p) de boscalid	metoxicarbamatos y piridincarboxamidas	Ensayo <i>in vitro</i> en hojas de patata desprendidas e inoculación artificial con <i>P. infestans</i>
Paraat	50% (p/p) de dimetomorf	amidas del ácido cinámico	Ensayo <i>in vitro</i> en hojas de patata desprendidas e inoculación artificial con <i>P. infestans</i>

## REIVINDICACIONES

1. Composición para proteger a plantas frente a patógenos de plantas, que comprende:
  - a) un elicitador que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, y
  - b) un fungicida seleccionado del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-(4-metilfenil)-1H-imidazol-1-sulfonamida; N-(triclorometil)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (E)-metoxiimino-((E)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-m-tolil)etilidenaminooxi]-o-tolil)acetato de metilo; y una combinación de los mismos,
  - c) opcionalmente sales y/o azúcar,
  - d) opcionalmente, un elicitador adicional para la defensa de plantas tal como laminarina o silicato de sodio.
2. Composición según la reivindicación 1, que comprende además un coformulante seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes, agentes de mojado de tipo iónico o no iónico, agentes anticongelantes, agentes conservantes, agentes absorbentes, espesantes, tampones, agentes adhesivos, diluyentes o una mezcla de los mismos, preferiblemente un tensioactivo seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes o agentes de mojado de tipo iónico o no iónico, o una mezcla de los mismos.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho tensioactivo comprende uno o más de los siguientes componentes: etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales del ácido naftalenosulfónico, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucósido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, dioctilsulfosuccinatos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano, preferiblemente etoxilato de aceite de ricino C18, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano.
4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en aplicaciones agrícolas, o para proteger a plantas frente a patógenos de plantas.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dichos patógenos de plantas se seleccionan del grupo que comprende: hongos fitopatógenos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos.
6. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para potenciar la eficacia de dicho fungicida en dicha composición, o para estimular el sistema inmunitario de plantas.
7. Método para proteger a plantas frente a patógenos de plantas, que comprende aplicar una cantidad eficaz y sustancialmente no fitotóxica de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a dichas plantas.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dichos patógenos de plantas se seleccionan del grupo que comprende: hongos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos e insectos.
9. Método para potenciar la eficacia de un fungicida, que comprende añadir un elicitador que comprende uno o más oligogalacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, a dicho fungicida, en el que dicho fungicida se selecciona del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-(4-metilfenil)-1H-imidazol-1-sulfonamida; N-(triclorometil)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (E)-metoxiimino-((E)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-m-tolil)etilidenaminooxi]-o-tolil)acetato de metilo; o una combinación de los mismos.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la composición se aplica antes de la cosecha o tras la cosecha a toda la planta, las hojas, las flores, frutos, semillas, plántulas o trasplante repicado de plántulas, material de propagación tal como tubérculos o rizomas, trasplante repicado de plantas, y/o al suelo o sustrato inerte en el que está creciendo la planta o en el que se desea que crezca,

mediante pulverización, rociado, empapado, inmersión, inyección o administración a través de sistemas de fertilización o irrigación.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicha planta se selecciona del grupo que comprende: algodón, lino, vid, frutas, verduras, principales cultivos hortícolas y forestales tales como: *Rosaceae* sp., *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp., *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp., *Musaceae* sp., *Rubiaceae* sp., *Theaceae* sp., *Sterculiaceae* sp., *Rutaceae* sp., *Solanaceae* sp., *Vitaceae* sp., *Liliaceae* sp., *Asteraceae* sp., *Umbelliferae* sp., *Cruciferae* sp., *Chenopodiaceae* sp., *Cucurbitaceae* sp., *Papilionaceae* sp., tales como *Graminae* sp., *Fabaceae* sp..
12. Uso de un elicitador que comprende uno o más oligo-galacturonano(s) con un grado de polimerización de entre 9 y 20 y uno o más quito-oligosacárido(s) con un grado de polimerización de entre 5 y 10 y un grado de acetilación menor del 50% en proporciones que oscilan entre 1:10 y 10:1, para potenciar la eficacia de un fungicida, en el que dicho fungicida se selecciona del grupo que comprende: 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinilmetil]benzamida; clorhidrato de 3-(dimetilamino)propilcarbamato de propilo; (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazol; 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter; azufre; 4-cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-(4-metilfenil)-1H-imidazol-1-sulfonamida; N-(triclorometil)ftalimida; complejo (polimérico) de etilenbis(ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc; (E)-metoxiimino-[(E)- $\alpha$ -[1-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-m-tolil)etilidenaminoxi]-o-tolil]acetato de metilo; o una combinación de los mismos.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicha composición comprende adicionalmente un tensioactivo seleccionado del grupo que comprende: detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, potenciadores de la penetración, humectantes o agentes de mojado de tipo iónico o no iónico, o una mezcla de los mismos.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho tensioactivo comprende uno o más de los siguientes componentes: etoxilato de aceite de ricino, éster metílico de colza, fosfatos de alquilo, fosfato de tributilo, fosfato de tripropilo, sales del ácido naftalenosulfónico, una combinación de sulfonato orgánico y 2-metilpentano-2,4-diol, alquilpoliglucósido, derivados de siloxanos, alquilsulfonatos, policarboxilatos, lignosulfonatos, triglicéridos alcoxilados, polímeros de aminas grasas, dioctilsulfosuccinatos o monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano.

FIG. 1

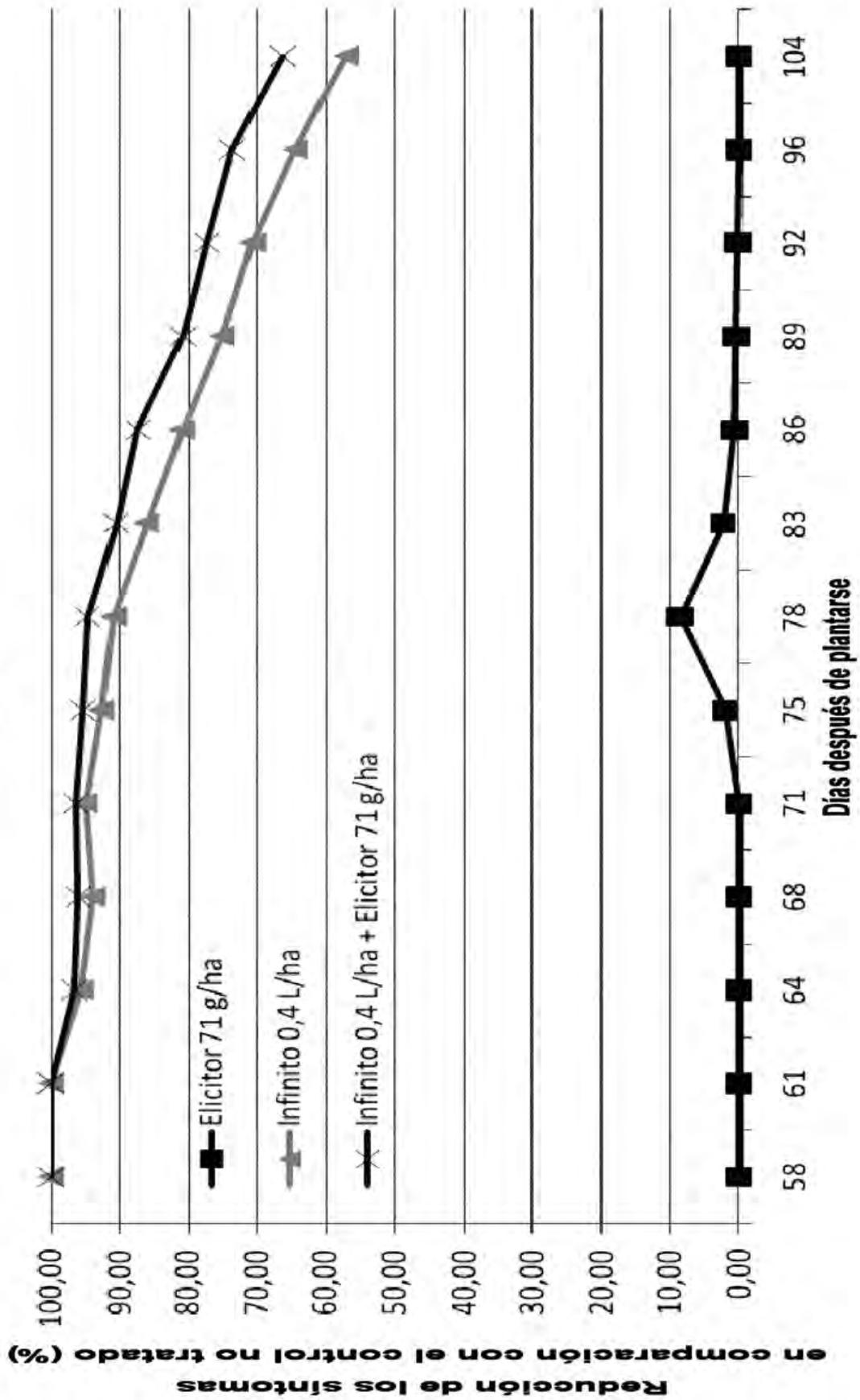


FIG. 2

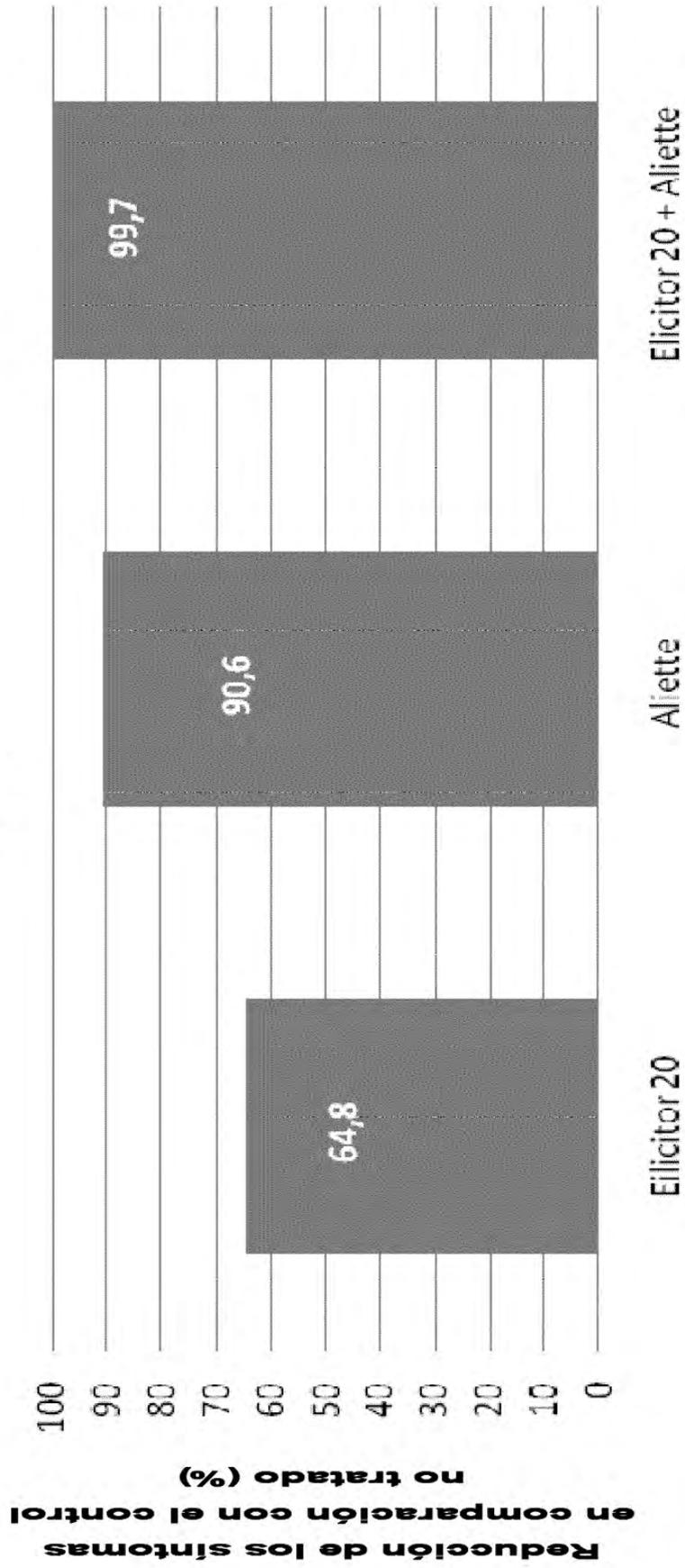


FIG. 3

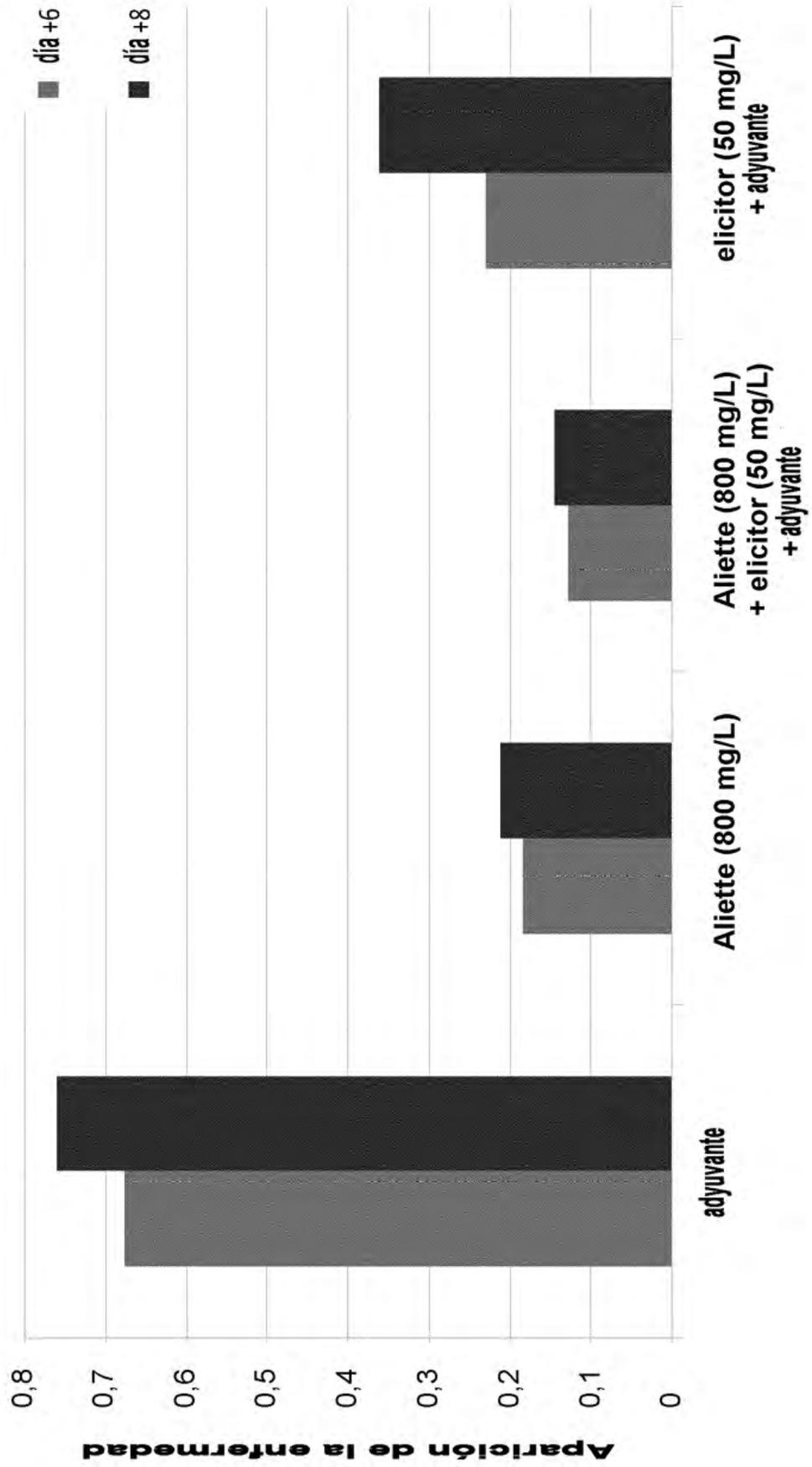


FIG. 4

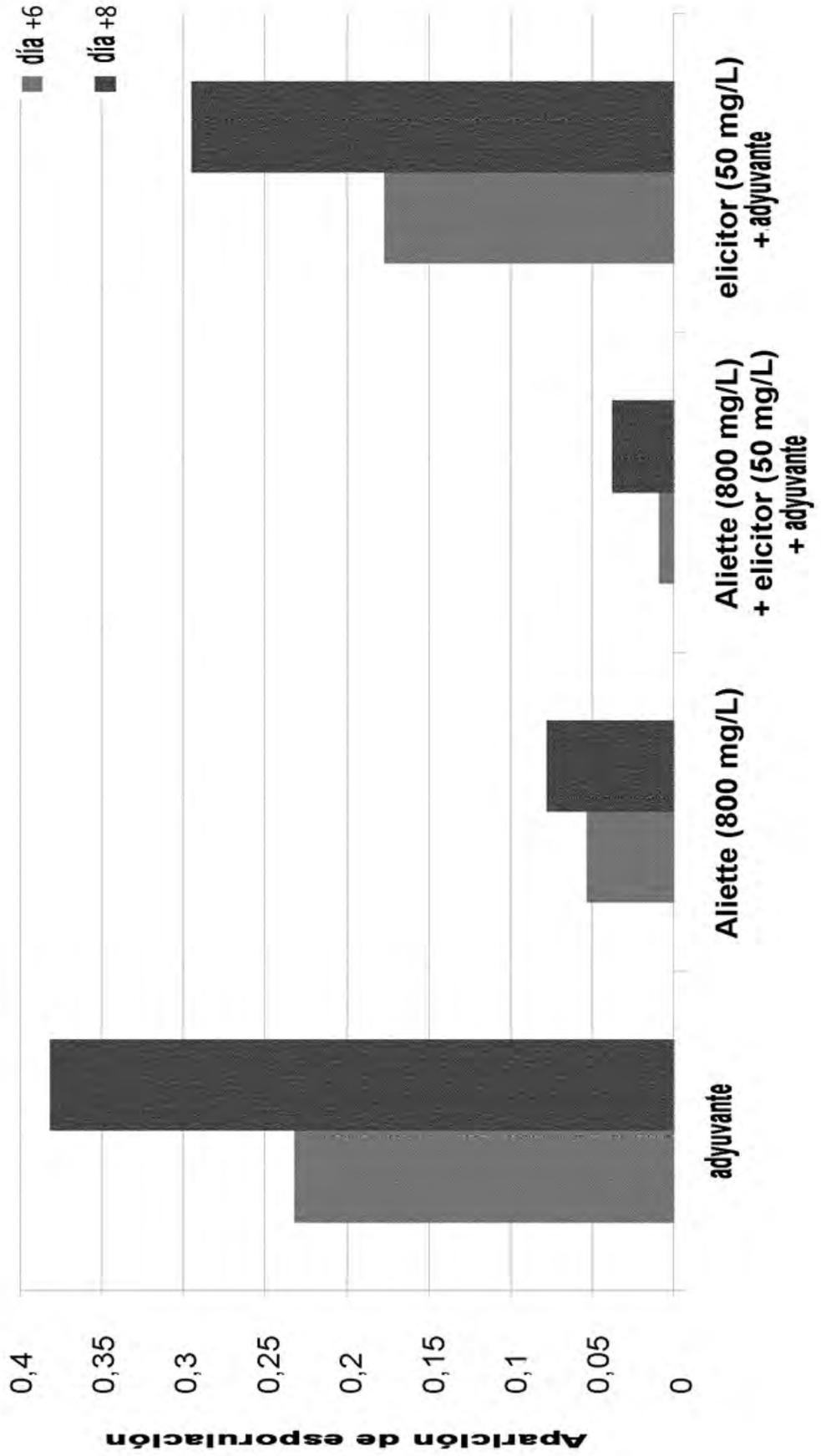


FIG. 5

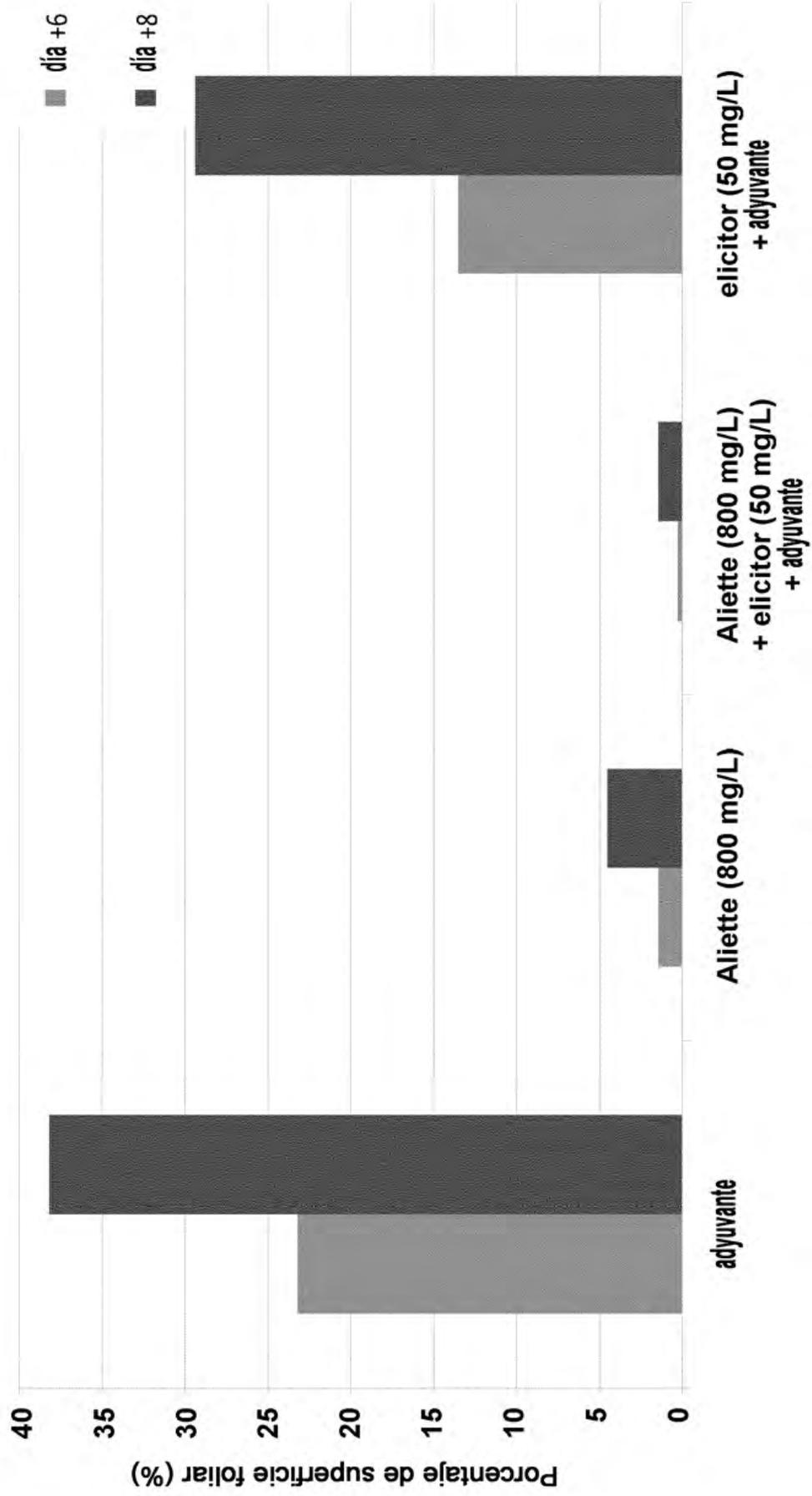


FIG. 6

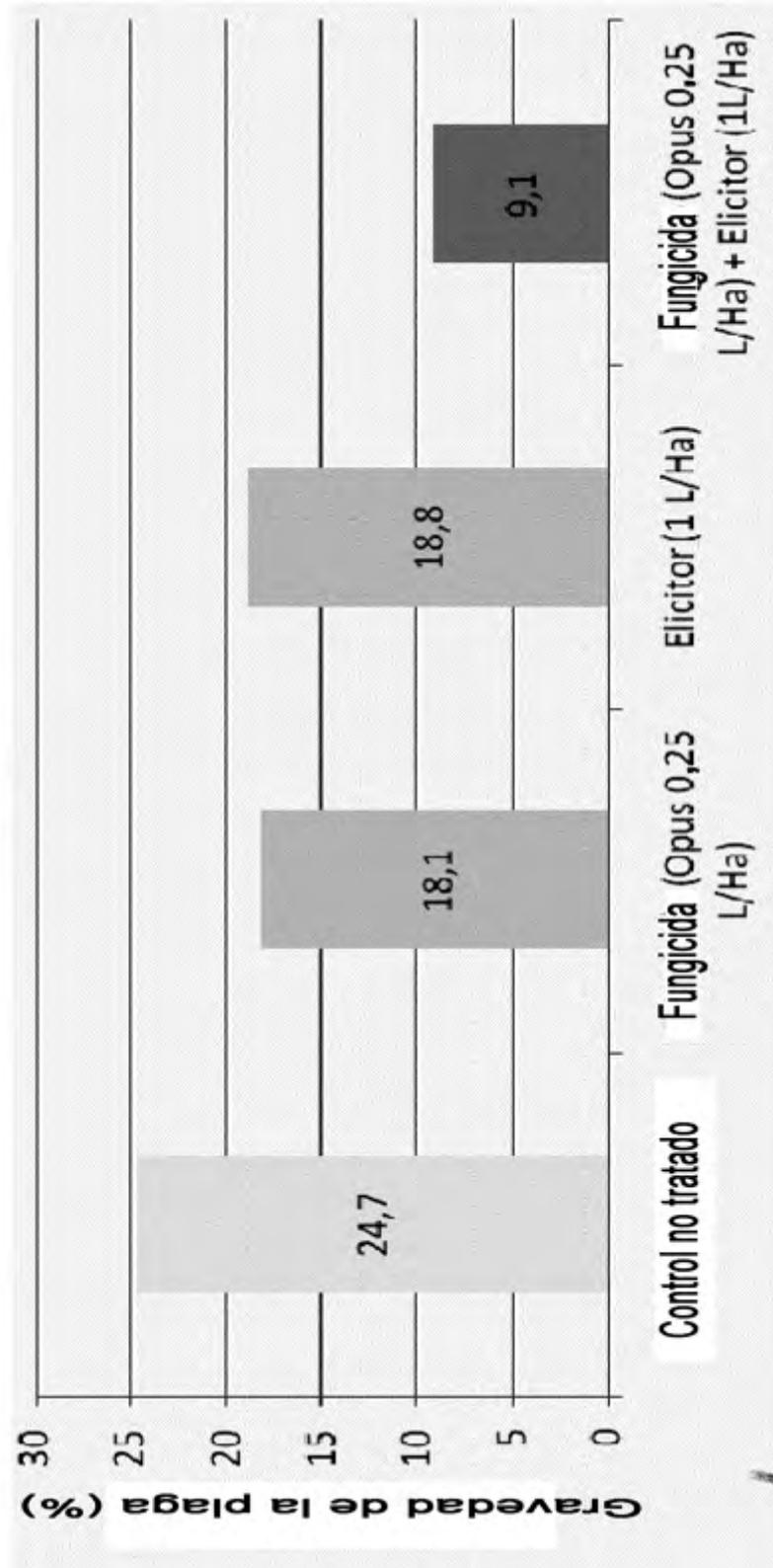


FIG. 7

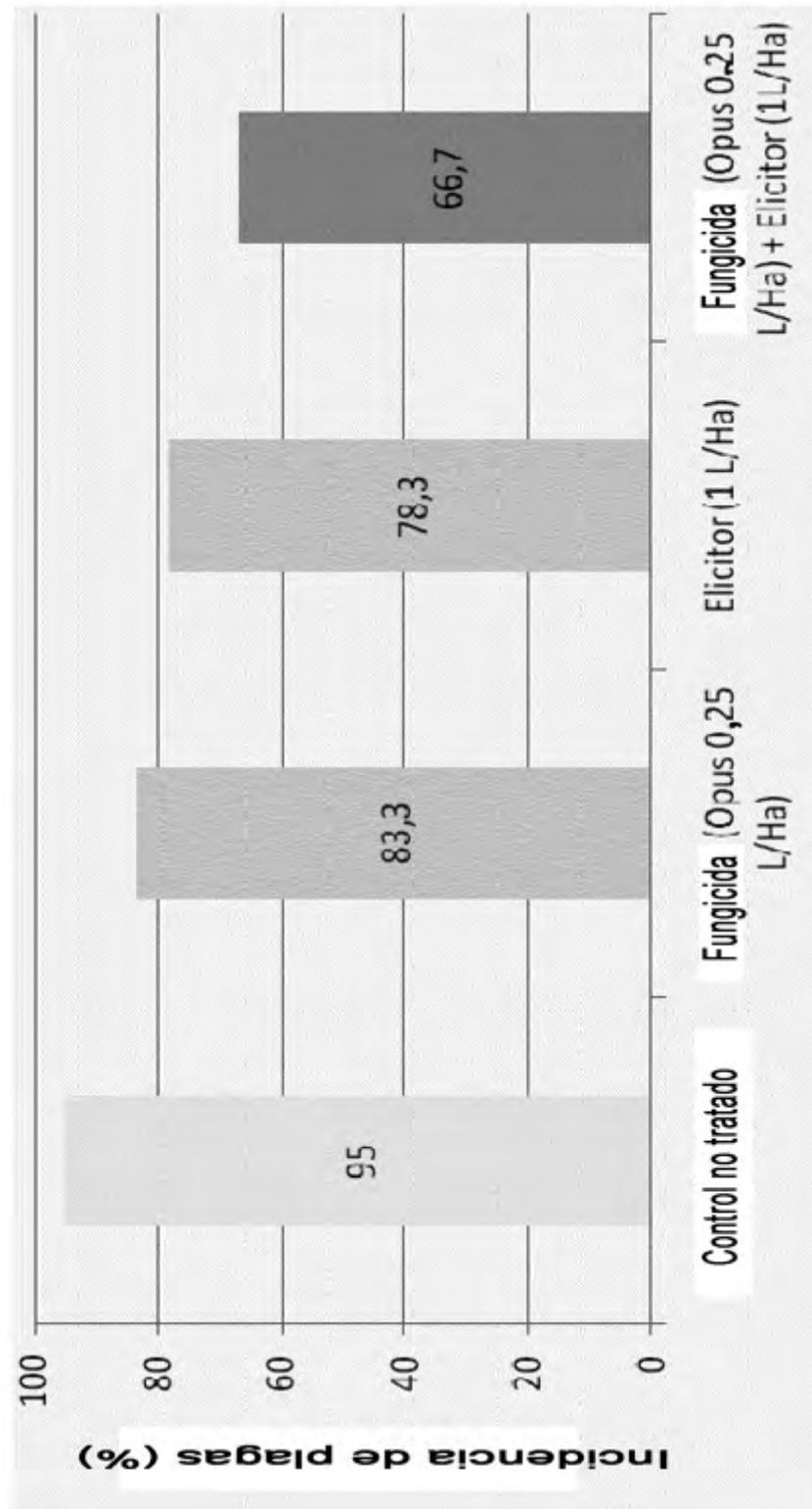
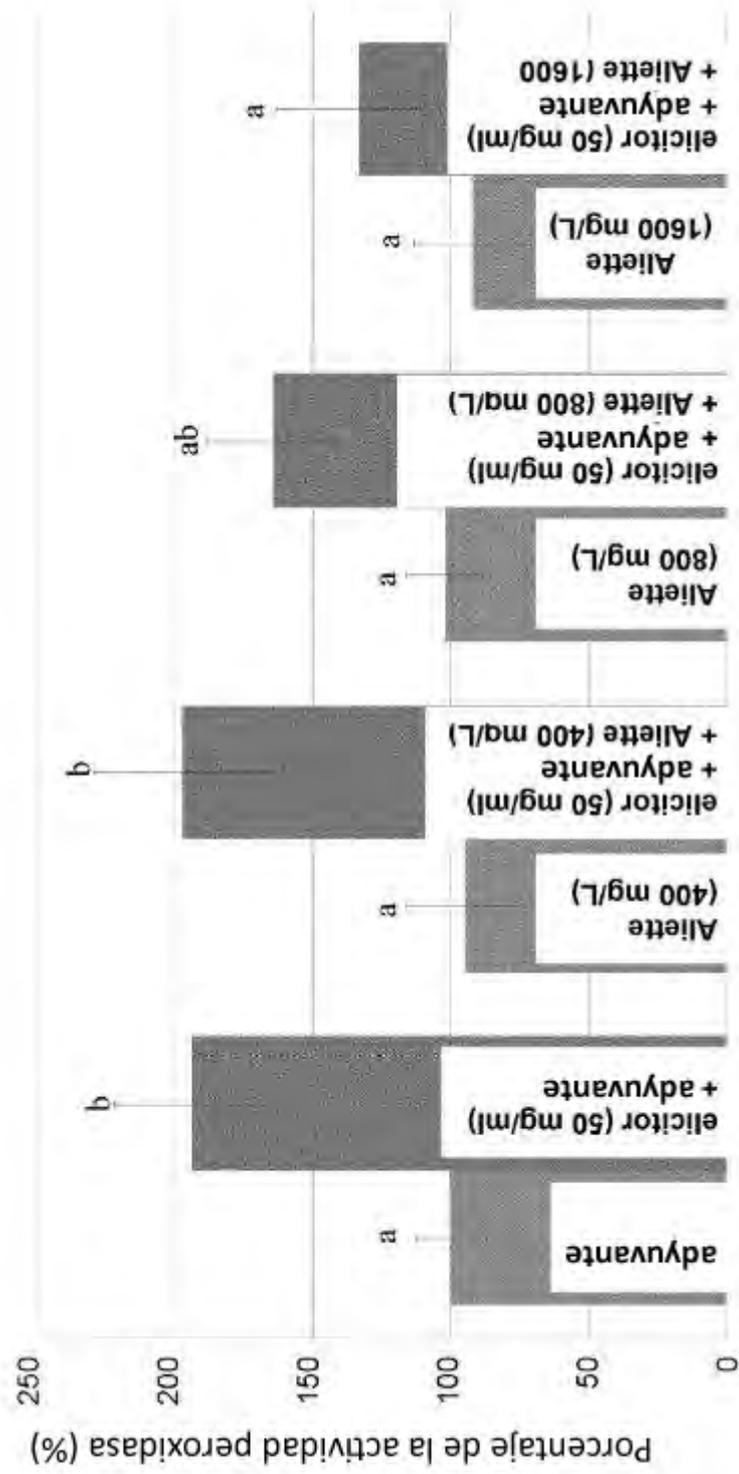


FIG. 8



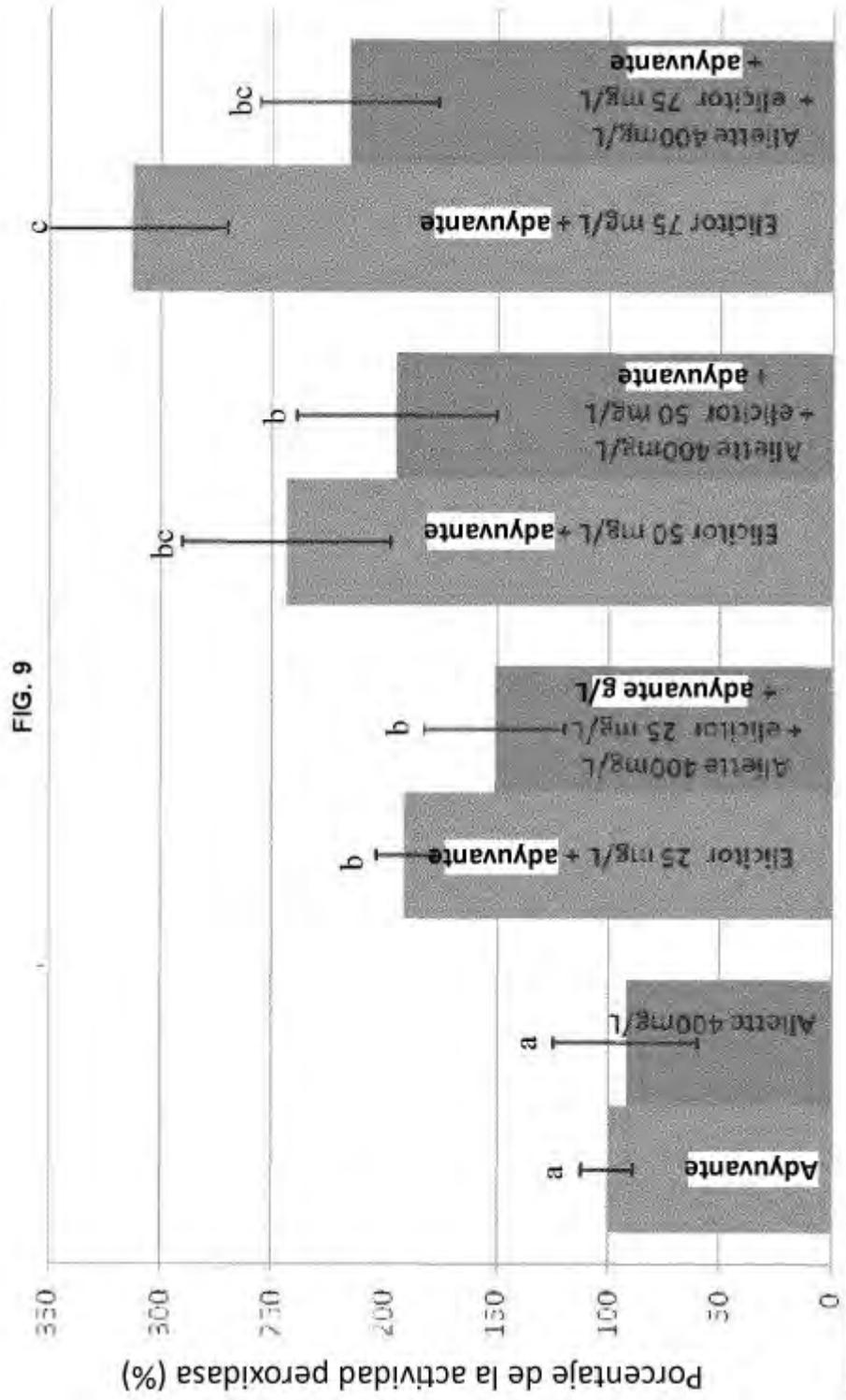


FIG. 10

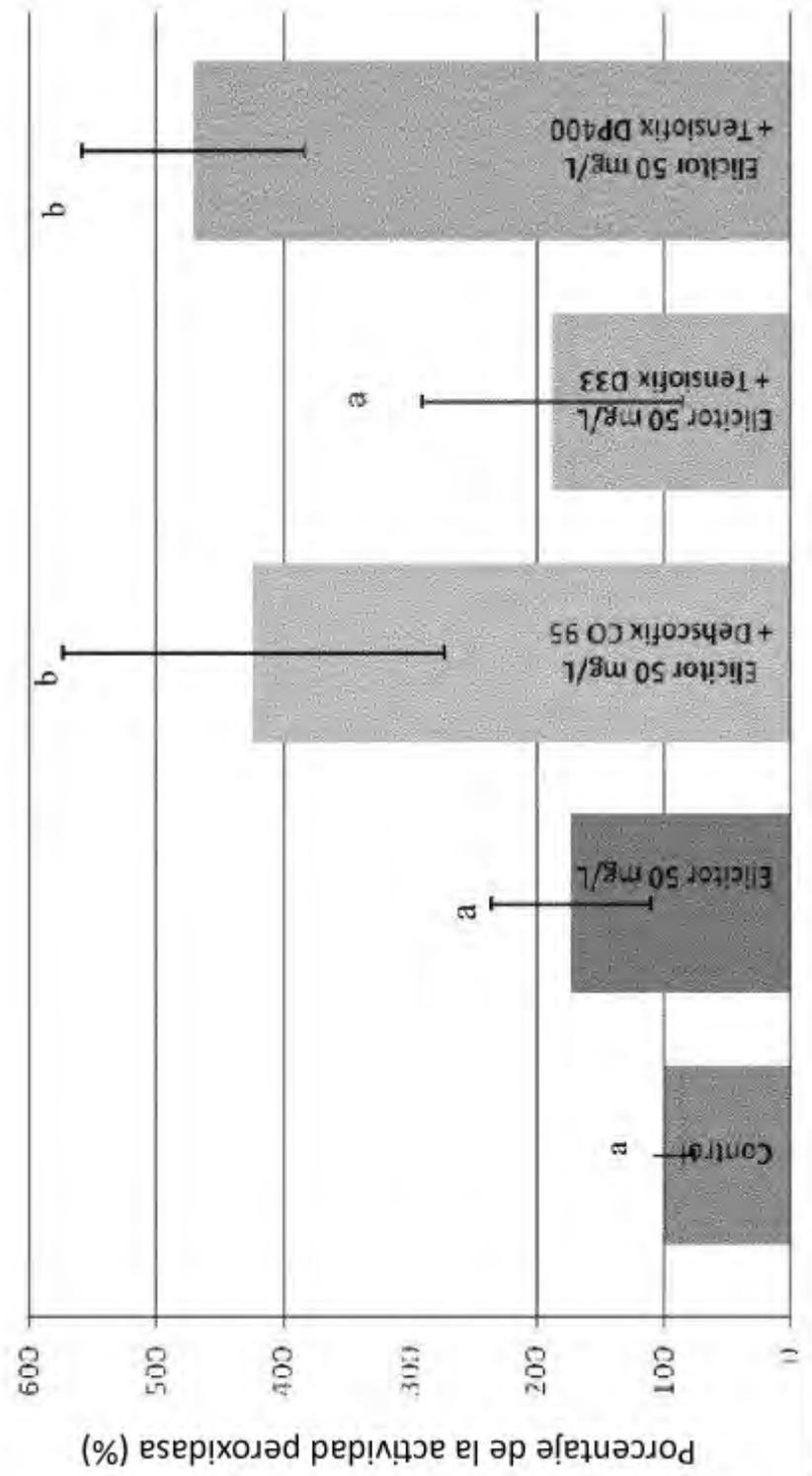


FIG. 11

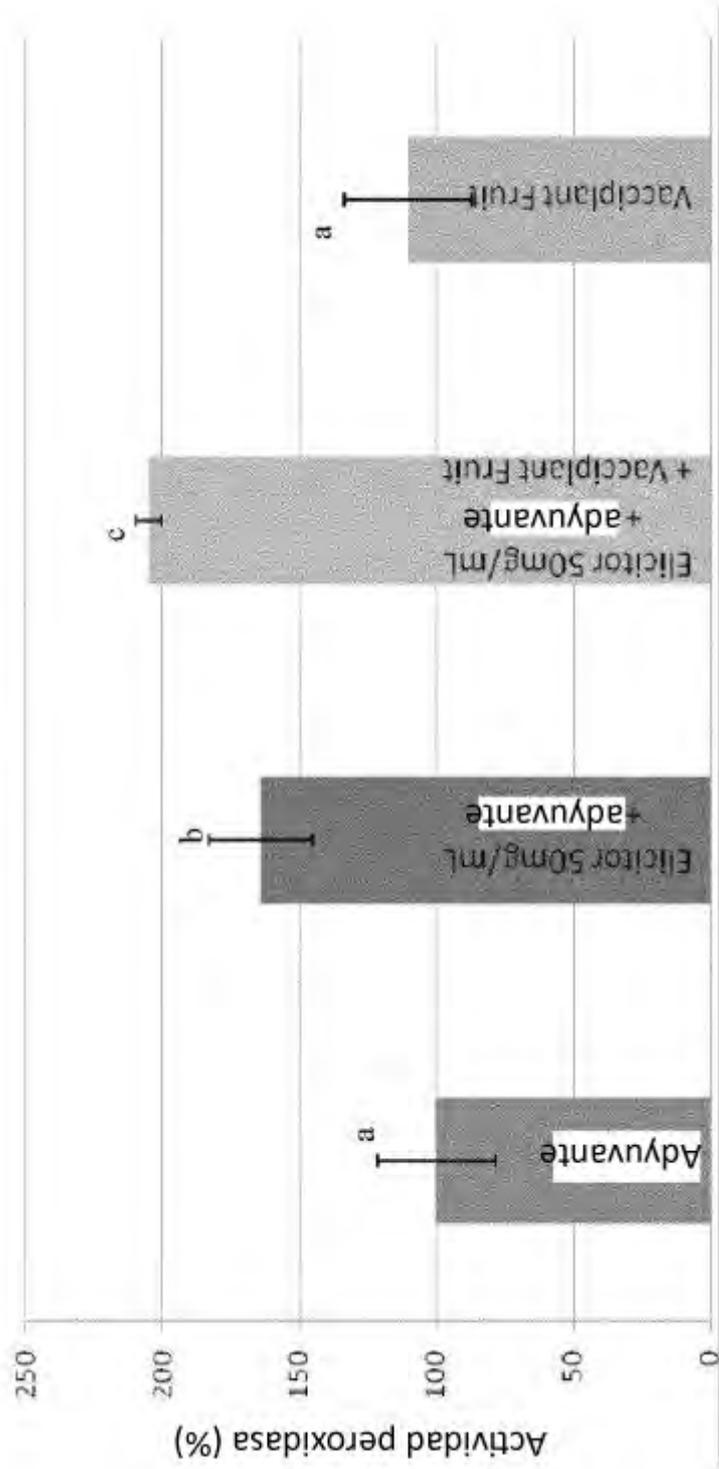


FIG. 12

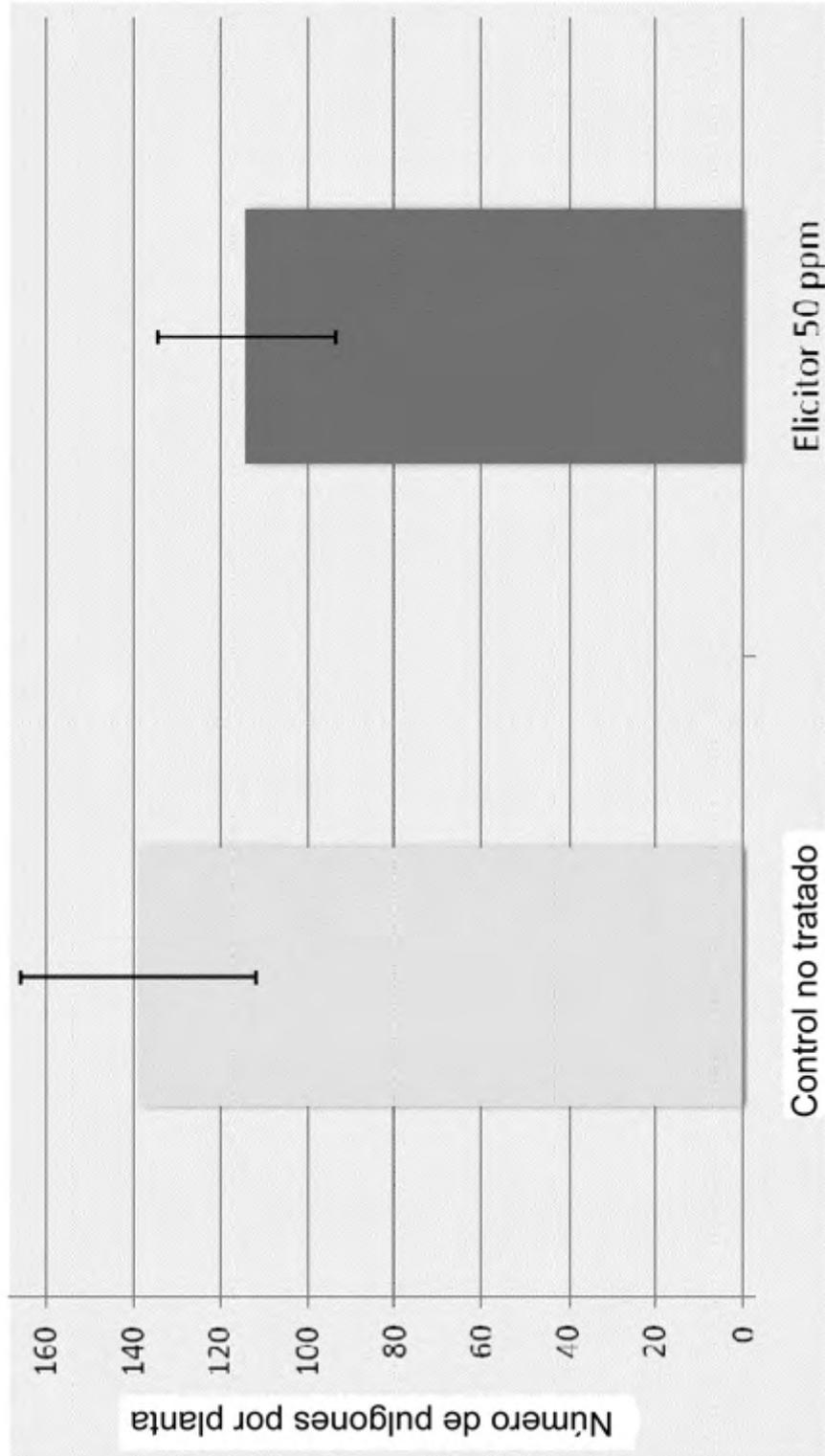


FIG. 13

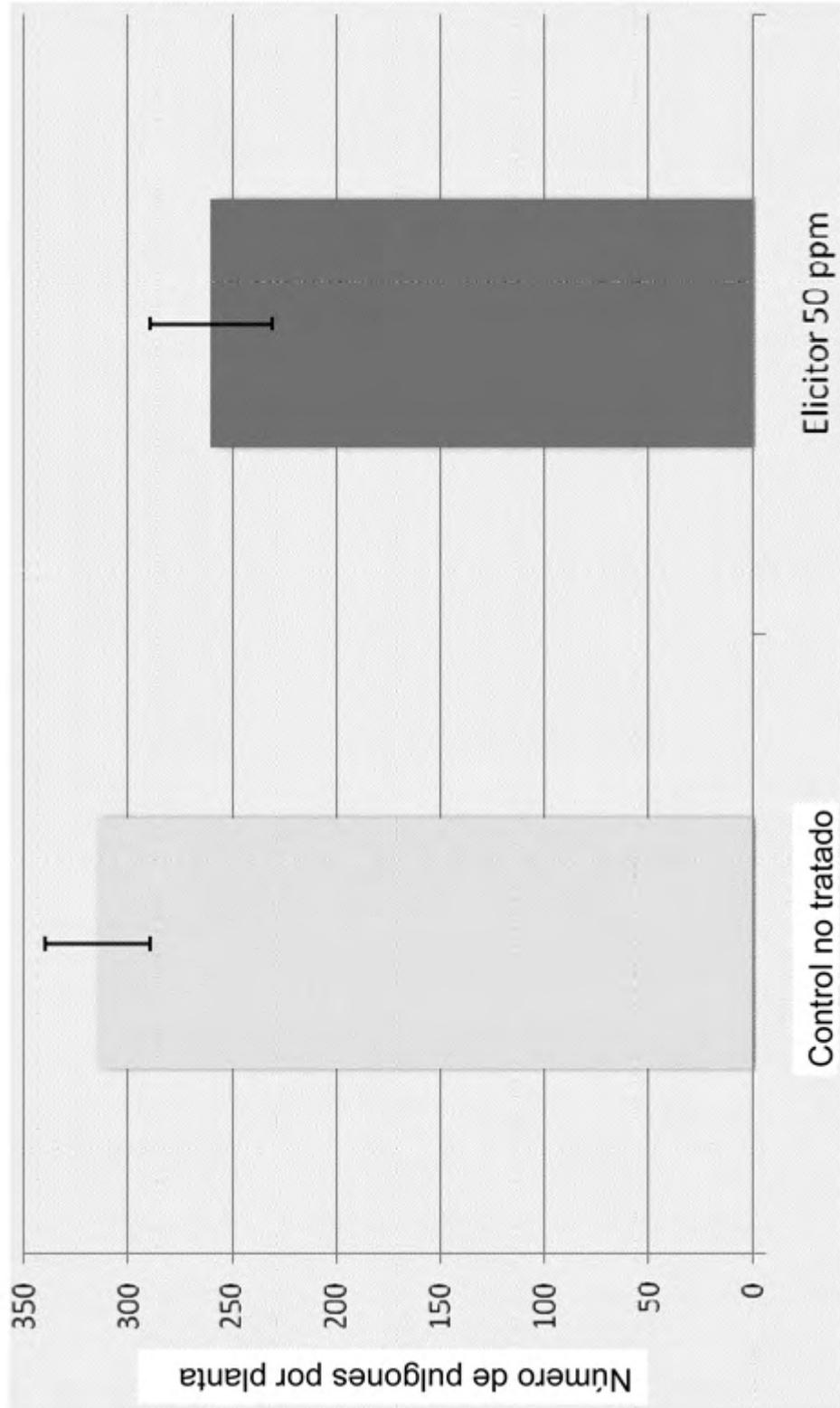


FIG. 14

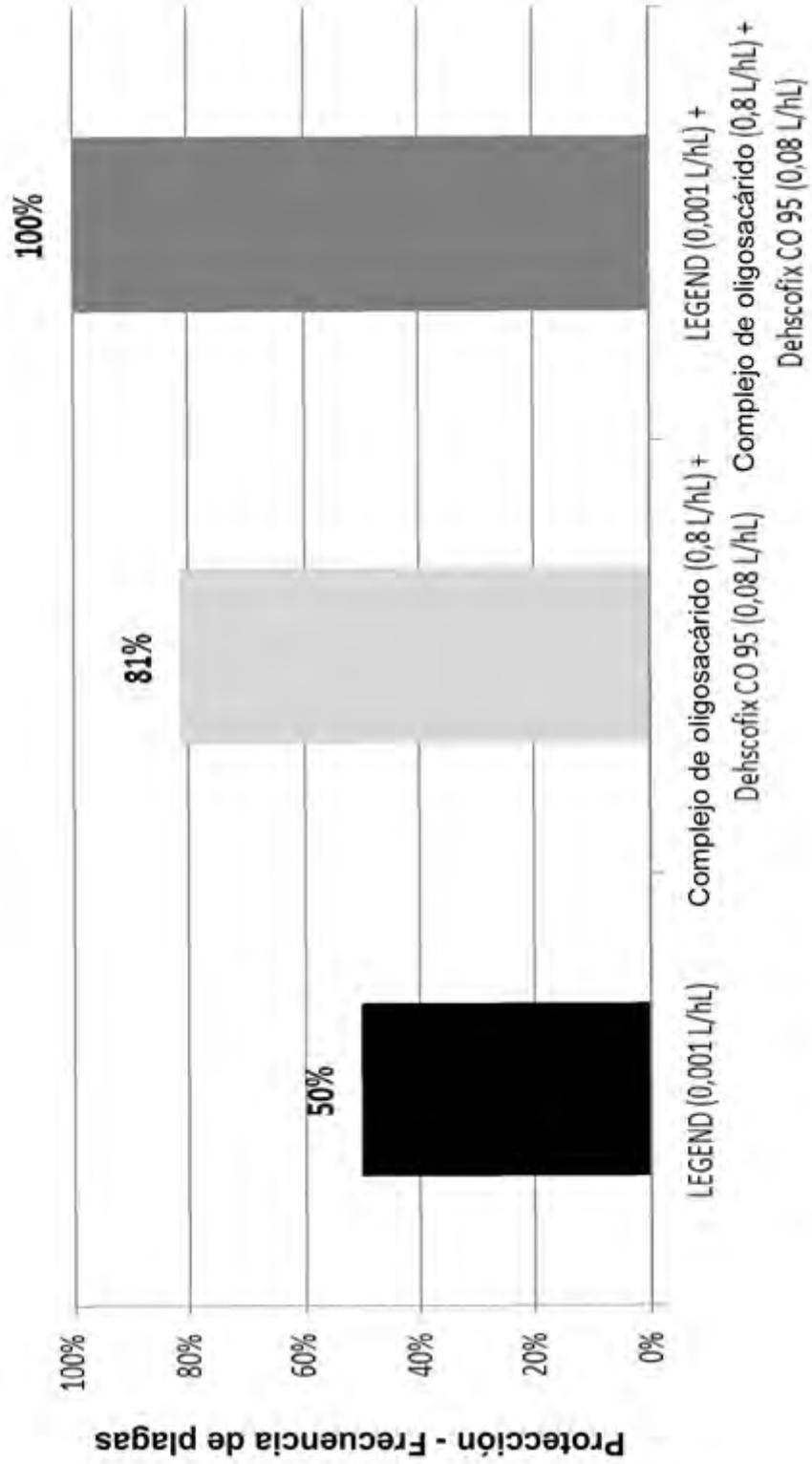


FIG. 15

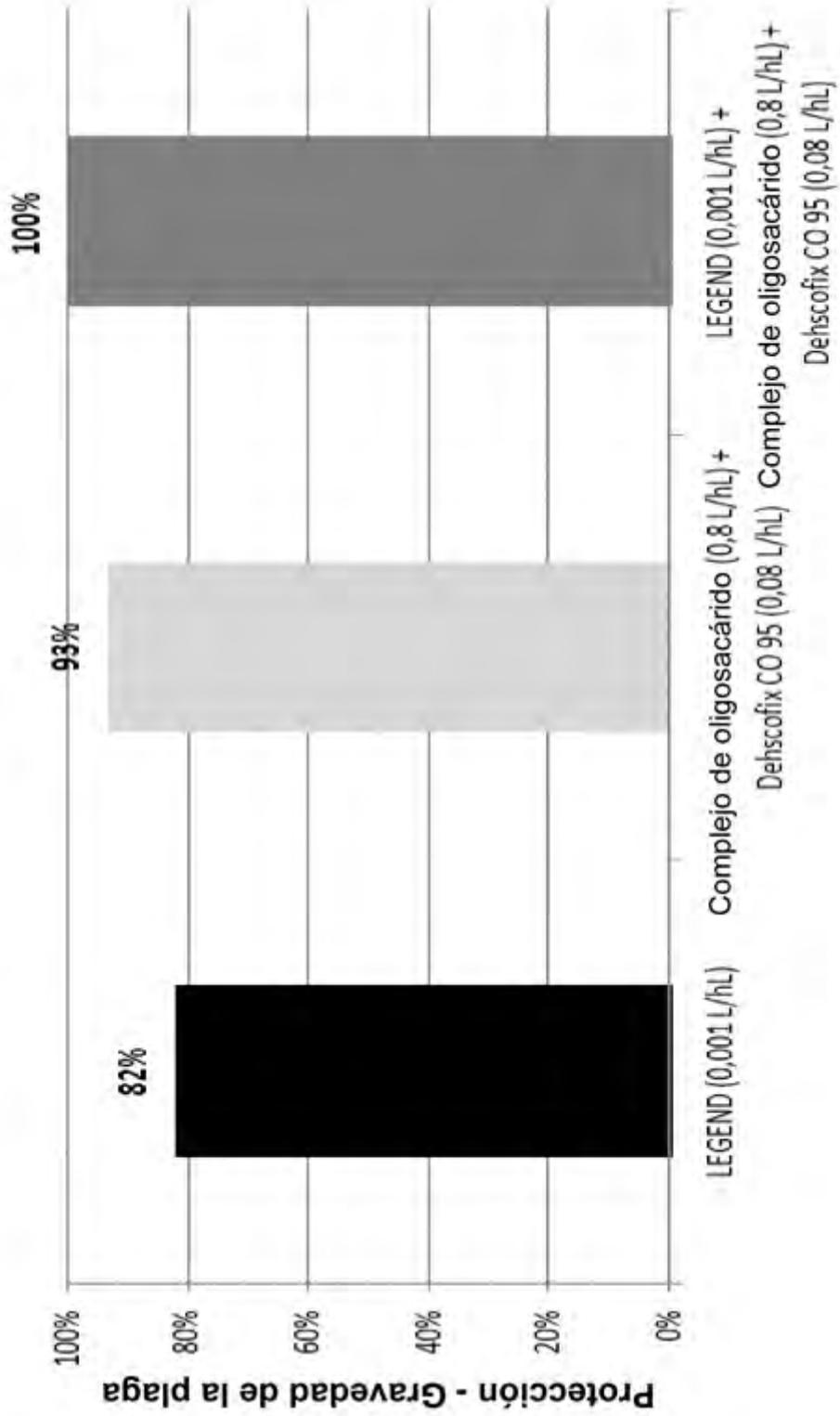


FIG. 16

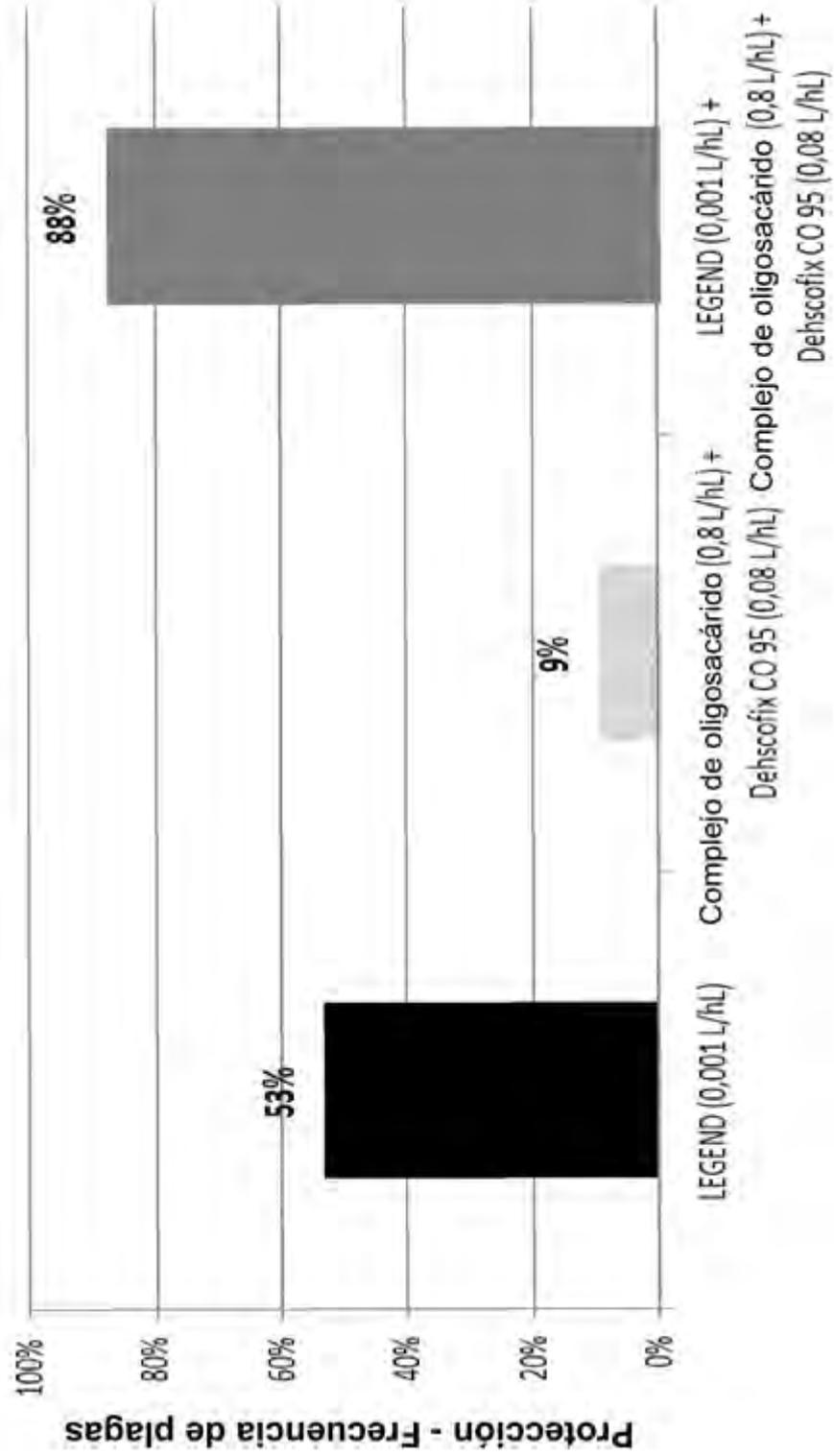


FIG. 17

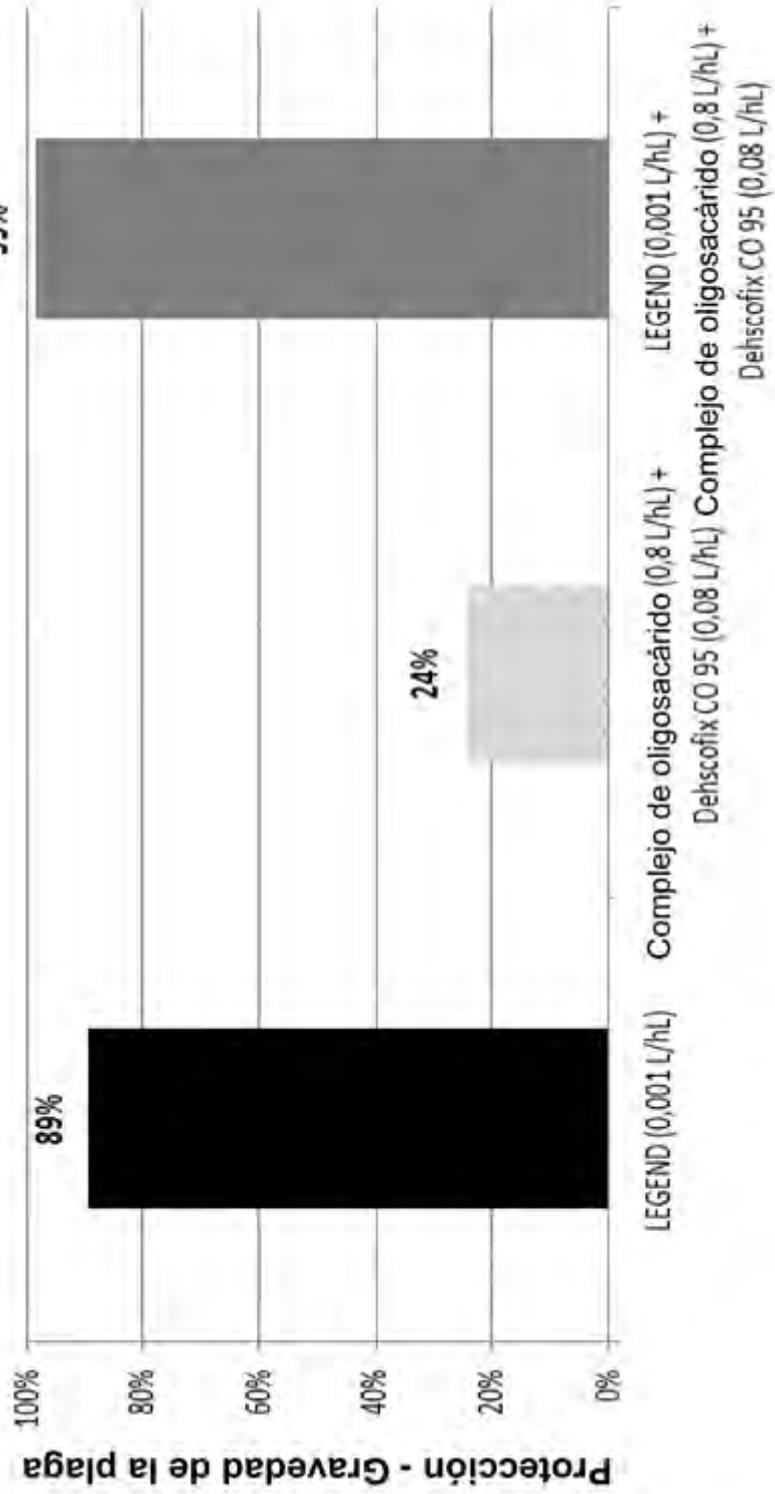


FIG. 18

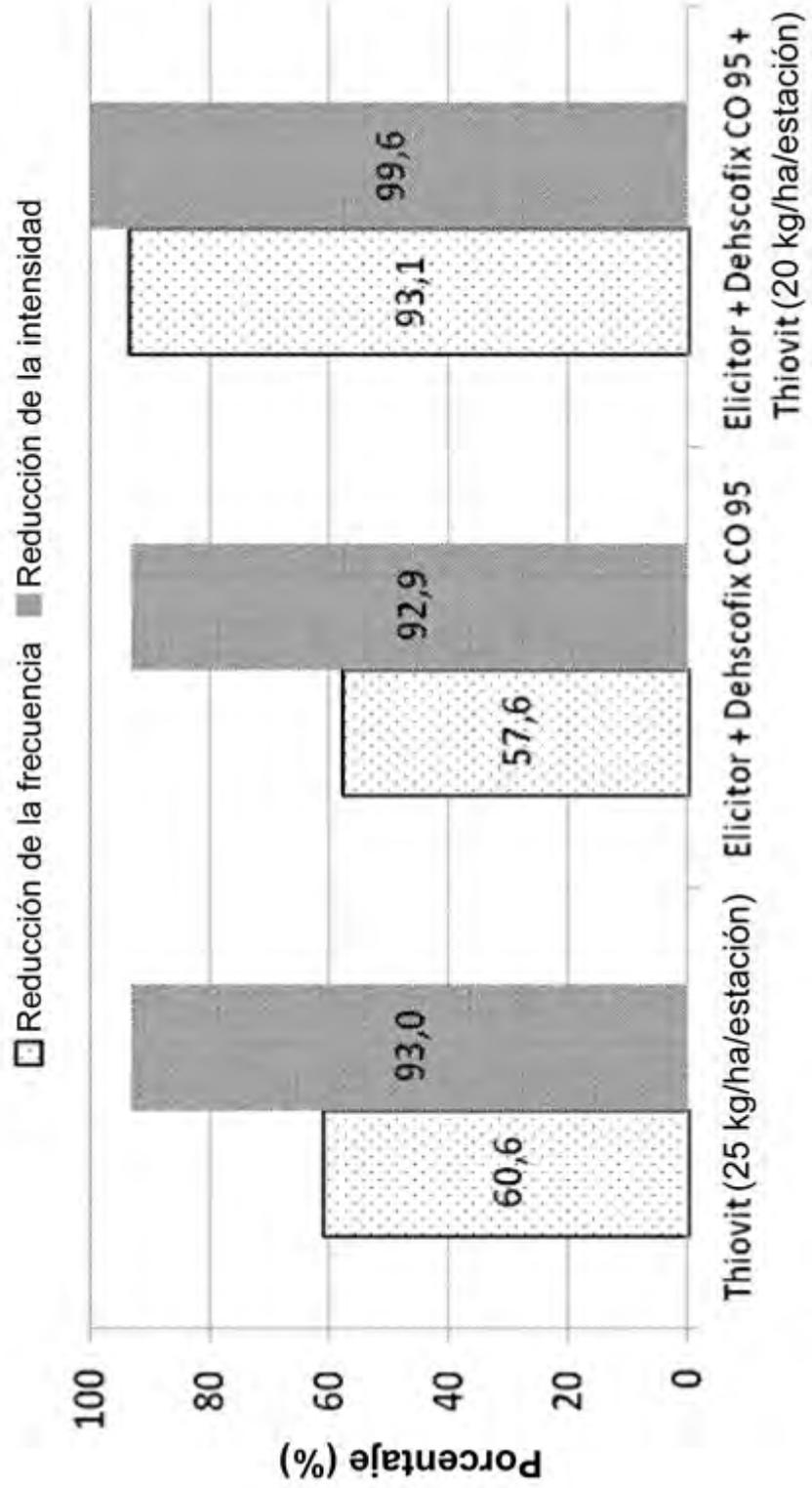


FIG. 19

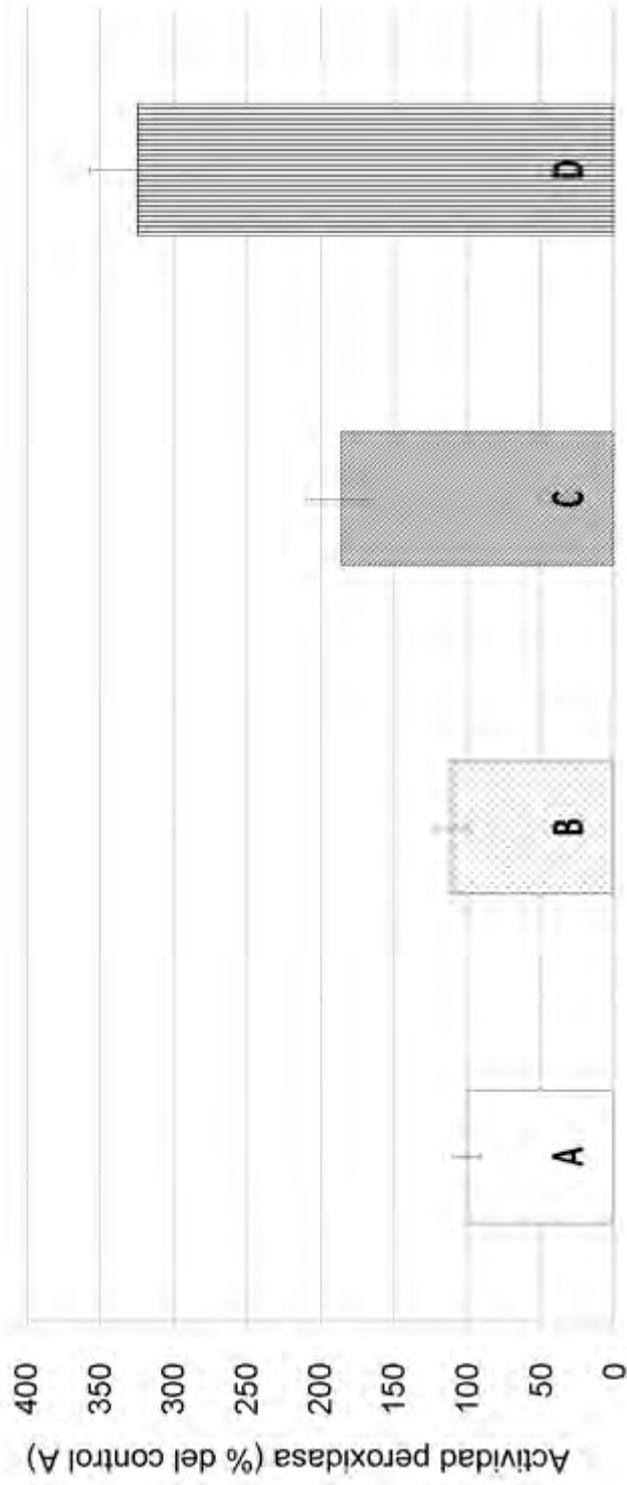


FIG. 20

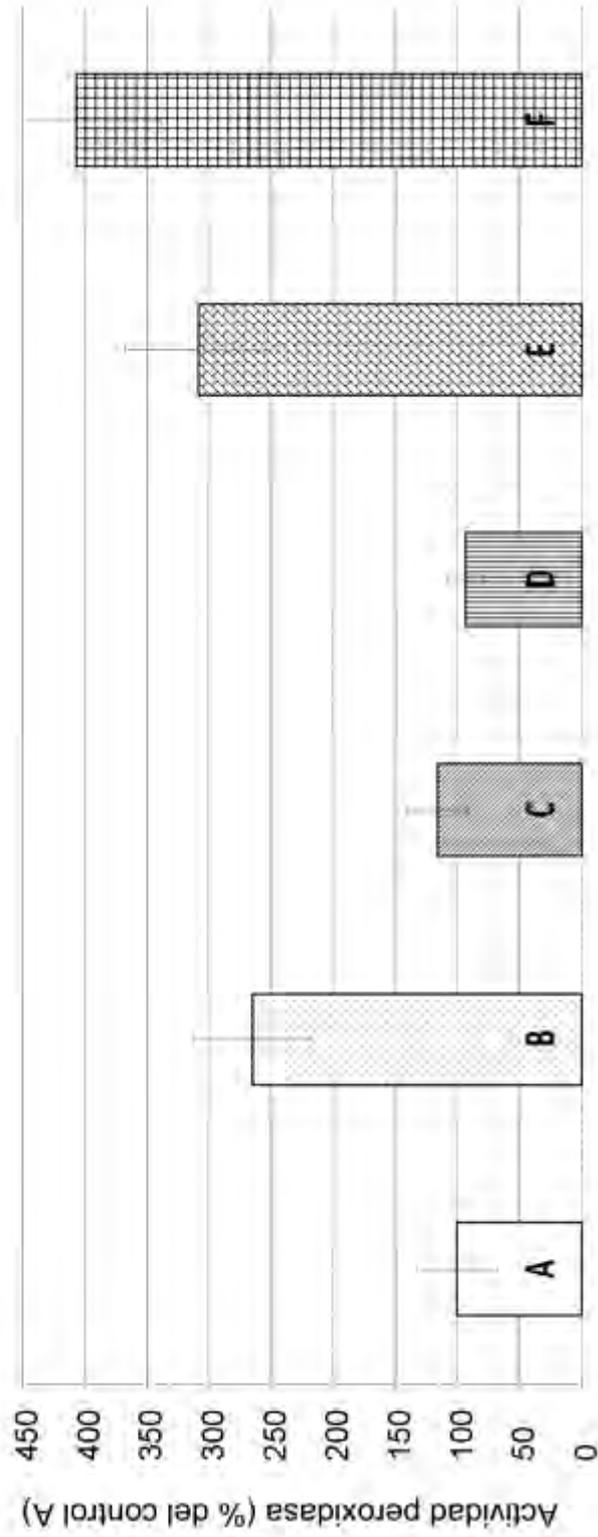


FIG. 21

