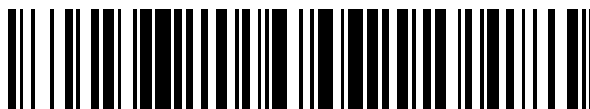


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 816**

51 Int. Cl.:

A01N 59/00	(2006.01) A01P 3/00	(2006.01)
A01N 59/02	(2006.01) A01P 7/04	(2006.01)
A01N 59/04	(2006.01) C05G 1/00	(2006.01)
A01N 59/06	(2006.01)	
A01N 59/12	(2006.01)	
A01N 59/14	(2006.01)	
A01N 59/16	(2006.01)	
A01N 59/20	(2006.01)	
A01N 25/04	(2006.01)	
A01P 1/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2010 PCT/FR2010/050042**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10081987**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2010 E 10706295 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2375906**

54 Título: **Utilización de una composición mineral líquida para mejorar la respuesta adaptativa de plantas a un cambio de las condiciones del entorno**

30 Prioridad:

13.01.2009 FR 0950151

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2016

73 Titular/es:

**PRP HOLDING (100.0%)
46-33 Avenue du Maine
75755 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DARIDON, BRUNO y
VEYRIER, THIBAUT**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 592 816 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de una composición mineral líquida para mejorar la respuesta adaptativa de plantas a un cambio de las condiciones del entorno

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las composiciones de materias fertilizantes que permiten conservar o mejorar el estado sanitario de las plantas, utilizables en agricultura, horticultura, arboricultura y en pastos de ganado. Se refiere más particularmente al campo de las composiciones que favorecen los sistemas de defensa de las plantas contra agresiones exteriores bióticas o abióticas.

10

Técnica anterior

El rendimiento de las plantas, en términos de crecimiento, desarrollo, acumulación de biomasa y de producción depende particularmente de su capacidad de adaptación a los cambios de las condiciones de su entorno, lo que incluye los acontecimientos de agresión física, química y biológica.

15

Con carácter ilustrativo, se ha observado que los acontecimientos de agresión como las tensiones hídricas, osmóticas o térmicas constituyen factores limitantes sobre el crecimiento de las plantas y, por tanto, sobre el nivel de productividad en los campos agrícola, hortícola, arborícola y de pastos de ganado. Las plantas expuestas al calor o a condiciones de sequedad presentan normalmente rendimientos bajos en biomasa vegetal, en semillas, en frutos y otros productos comestibles por el hombre o los animales, incluido el ganado. Las pérdidas de recolectas, comprendidas las pérdidas en rendimiento de material vegetal explotable, por ejemplo, en el cultivo del arroz, maíz o trigo, provocadas por acontecimientos de tensiones, contribuyen a la escasez alimentaria en ciertos países en vías de desarrollo.

20

25

Los acontecimientos de agresión inducen en las plantas mecanismos fisiológicos de defensa que movilizan los recursos para permitir la supervivencia de la planta y para conseguir conservar su estado sanitario en detrimento de los recursos utilizados para mantener el nivel de rendimiento inicial de materia vegetal de interés.

30

De forma general, se conoce en el estado de la técnica una variedad de soluciones técnicas, de naturaleza biológica o química, destinadas a proteger al menos parcialmente las plantas de las consecuencias de los acontecimientos de agresiones externas.

35

Se pueden citar en particular las técnicas de modificación genética de las plantas destinadas para permitir la producción de plantas transgénicas que poseen un carácter transmisible de resistencia mejorada a las tensiones, como se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales PCT nº WO 2007/125531, WO 2007/060514, WO 2008/050350 y WO 2008/145675. No obstante, se trata de soluciones técnicas específicas, largas y costosas, que es necesario repetir para cada variedad vegetal que va a ser genéticamente transformada. Además, en numerosos países, existen actualmente prohibiciones reglamentarias generales o casi generales contra el cultivo en campo abierto de variedades de plantas genéticamente modificadas.

40

Según otras vías de resolución del problema de la resistencia de las plantas a los acontecimientos de tensiones, se comercializan actualmente composiciones fertilizantes orgánicas u órgano-minerales, en particular composiciones líquidas, como las descritas en la solicitud de patente US 4.654.294, que se presentan para poseer propiedades globales o específicas contra las carencias de elementos nutricionales. Se conocen también composiciones destinadas a estimular reacciones de defensa naturales de las plantas contra las agresiones por organismos biológicos patógenos, por ejemplo, composiciones que contienen sustancias como moléculas extraídas de plantas, hidrolizados de agro-polímeros, extractos de microorganismos, polisacáridos naturales o modificados, fitohormonas, péptidos o proteínas o incluso sustancias agonistas o antagonistas de proteínas vegetales conocidas por estar implicadas en los mecanismos de defensa de las plantas.

45

50

Las composiciones que anteceden, por ejemplo, las descritas en el documento WO 91/16844, pueden manifestarse satisfactorias, en particular para paliar las carencias de elementos nutricionales o bien para estimular las defensas vegetales contra organismos biológicos patógenos como ciertos virus, microorganismos o insectos.

55

No obstante, por lo que sabe el solicitante, no existe una composición puramente mineral capaz de proteger o estimular las plantas contra acontecimientos de agresión de tipo abióticos, como las condiciones de tensión hídrica, osmótica o térmica y contribuir al mismo tiempo a la reacción de la planta contra agresores con elevados contenidos de quitina como los hongos.

60

En todo caso, teniendo en cuenta la importancia económica y la importancia para la alimentación humana o animal de disponer de plantas que posean un buen estado sanitario, en particular disponer de plantas que presenten buenos rendimientos de producción en el campo agrícola, hortícola, arborícola o de pastos de ganado, existe una necesidad en el estado de la técnica de una disponibilidad para el público de composiciones alternativas o

65

mejoradas, de coste accesible, con respecto a las composiciones conocidas.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere a la utilización de una composición mineral líquida, que tiene la fórmula (I) especificada en detalle en lo que sigue la presente descripción, para mejorar la respuesta adaptativa de una planta a un cambio de las condiciones del entorno.

10 La composición mineral líquida de fórmula (I) consiste en una composición concentrada que es usada para su utilización mediante pulverización foliar, en una forma diluida en agua en un líquido acuoso.

Más particularmente, la invención se refiere a la utilización de una composición mineral líquida que tiene la fórmula (I) descrita con posterioridad, para mejorar la respuesta adaptativa de una planta a un acontecimiento de tensión biótica o abiótica.

15 Los acontecimientos de tensión abióticos incluyen particularmente una tensión hídrica, una tensión osmótica, una tensión térmica o incluso una carencia nutricional.

20 Los acontecimientos de tensiones bióticas incluyen particularmente un contacto o una infección por organismos biológicos, comprendidos los microorganismos patógenos que contienen quitina, así como sustancias producidas o derivadas de diversos organismos biológicos, comprendida la quitina.

Descripción de las figuras

25 Las figuras 1A y 1B ilustran las curvas de la respuesta cálcica en plantas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas diez días, inducida por un tratamiento con cantidades crecientes de una composición de fórmula (I). En el eje de abscisas: el tiempo, expresado en segundos. En el eje de ordenadas: la concentración de iones Ca^{2+} en citosol, expresada en micromolar (μM).

30 Las figuras 2A y 2B ilustran las curvas de respuesta cálcica en plántulas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas diez días, inducida por un choque térmico frío, 24 horas después de un pretratamiento de las plantas en presencia o ausencia de una composición de fórmula (I). Las figuras 2A y 2B ilustran los resultados de dos series de ensayos iguales. El eje de abscisas: el tiempo, expresado en segundos. En el eje de ordenadas: la concentración de iones Ca^{2+} en citosol, expresada en micromolar (μM).

35 La figura 3 ilustra las curvas de producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas diez días, inducida por choque osmótico, 24 horas después de un pretratamiento de las plantas en presencia o ausencia de una composición de fórmula (I). En el eje de abscisas: el tiempo, expresado en segundos. En el eje de ordenadas: unidades arbitrarias de luminiscencia (RLU).

40 La figura 4 ilustra las curvas de producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas diez días, inducida por un choque inductor por una sustancia química, la quitina, 24 horas después de un pretratamiento de las plantas en presencia o ausencia de una composición de fórmula (I). En el eje de abscisas: el tiempo, expresado en segundos. En el eje de ordenadas: unidades arbitrarias de luminiscencia (RLU).

45 La figura 5 ilustra los efectos a largo plazo de una composición de fórmula (I) sobre el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* previamente sometidos a diferentes acontecimientos de tensión. En el eje de ordenas: medición del crecimiento de las plántulas, expresado en centímetros de aumento de las raíces durante las dos semanas de aplicación de las condiciones de tensión. Los histogramas en el eje de abscisas: (a) plántulas testigos no tratadas y no sometidas a un estado de tensión; (b) plántulas testigos no tratadas sometidas a una tensión hídrica mediante NaCl; (c) plántulas no tratadas sometidas a una tensión osmótica con manitol; (d) plántulas tratadas con una composición de fórmula (I) y no sometidas a un estado de tensión; (e) plántulas tratadas con una composición de fórmula (I) y sometidas a una tensión hídrica mediante NaCl; (f) plántulas tratadas con una composición de fórmula (I) y sometidas a una tensión osmótica con manitol.

Descripción detallada de la invención

Después de largas investigaciones, el solicitante ha desarrollado una composición mineral líquida que ha mostrado que posee la propiedad de mejorar la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno.

En particular, ha mostrado que una composición mineral líquida de fórmula (I) como se define con posterioridad en la presente descripción posee, cuando es utilizada en una dilución apropiada, la propiedad de mejorar la respuesta adaptativa de las plantas en reacción a un cambio de una diversidad de condiciones del entorno que incluyen un choque hídrico, un choque osmótico y una reacción contra el contacto con ciertas sustancias procedentes de organismos biológicos como hongos.

La presente invención se refiere por tanto a la utilización de una composición mineral líquida para pulverización foliar, que comprende la fórmula (I) siguiente:

- nitrógeno amoniacal total (N%)	0,08% a 2%
- potasio expresado como K ₂ O (%)	3% a 6%
- magnesio expresado como MgO (%)	0,4% a 0,8%
- sodio expresado como Na ₂ O (%)	1 % a 2%
- calcio expresado como CaO (%)	0% a 0,5%
- sulfatos totales expresados como SO ₃ (%)	3% a 6%
- fósforo total expresado como en P ₂ O ₅ (%)	0%
- cloruros Cl (%)	1% a 2%
- bicarbonatos (% de HCO ₃)	1,2% a 3,0%
- boro (%)	0,1 % a 0,2%
- cobre (%)	0,018% a 0,03%
- manganeso (%)	0,00005% a 0,006%
- yodo (%)	0,02% a 0,04%
- cinc (%)	0,00005% a 0,006%
- hierro (mg/kg)	0,0002% a 0,003%
- agua	Cantidad suficiente para 100%

5 los porcentajes consisten en porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición, para mejorar la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno.

10 La composición mineral de fórmula (I) consiste en una composición mineral en forma concentrada. Para su utilización para la pulverización foliar, la composición mineral de fórmula (I) es diluida de forma apropiada en agua o en un líquido acuoso. Para verificar que una composición posee las características cualitativas y cuantitativas en elementos minerales de la composición de fórmula (I) anterior, el experto en la técnica se referirá ventajosamente a técnicas bien conocidas de dosificación para este tipo de composiciones.

15 Con carácter ilustrativo, el experto en la técnica puede utilizar las técnicas de análisis de composición siguientes:

(i) para la dosificación de nitrógeno amoniacal, se utiliza la técnica descrita por Conway (Directiva Comunitaria Europea nº 71/393, como ha sido modificada por las Directivas Europeas nº 73/47 y nº 81/681),

20 (ii) para la dosificación de potasio, se utiliza la técnica de dosificación de K₂O según la Norma Francesa nº NF U 44-140 y la técnica de emisión de llama,

(iii) para la dosificación de magnesio, se utiliza la técnica de dosificación descrita por la Norma Francesa nº NF U 44-140 y NF U 44-146 y la técnica por absorción atómica,

25 (iv) para la dosificación de sodio Na₂O, se utiliza la técnica descrita por la Norma Francesa nº NF U 44-140 y la técnica de fotometría de llama,

30 (v) para la dosificación de calcio, se utiliza el método por espectrometría de absorción atómica definida en la Norma Francesa nº NF U 44-140 y la técnica por absorción atómica,

(vi) para la dosificación de sulfatos totales, se utiliza el método definido según la Norma Europea nº CEE 8.1 y la técnica por gravimetría,

35 (vii) para la dosificación de fosfato total expresado en porcentaje (peso/peso) de P₂O₅, se utiliza la técnica definida según las normas NF U 42-241 (CEE 3.1) y NF U 42-246 (espectrofotometría),

(viii) para la dosificación de cloruros, se utiliza la técnica en la Norma Francesa nº NF U 42-371,

40 (ix) para la dosificación de bicarbonatos, se utiliza la técnica de dosificación de iones hidrogenocarbonato según la técnica descrita en la norma nº NF EN ISO 9963-1 (T 90-036),

(x) para la dosificación de boro, se utiliza la técnica de dosificación definida según la Norma Europea nº CEE 9-1 y nº CEE 9-5, si la concentración final es inferior a 10% (peso/peso), o la Norma Europea nº CEE 10-1 y nº CEE 10-5 si la concentración final es superior a 10% (peso/peso),

(xi) para la dosificación de cobre, se utiliza la técnica definida según la Norma Europea nº CEE 9-1 y nº CEE 9-7 y la técnica por absorción atómica,

(xii) para la dosificación de manganeso, se utiliza la técnica de dosificación definida según la norma nº ICP NF EN ISO 11885,

(xiii) para la dosificación de yodo, se utiliza la técnica siguiente: la muestra se reduce en cenizas según el método preparativo de Grote-Krekeler (en pequeñas cubetas de porcelana, deslizar un tubo cuarzo-norma DIN 53 474). El yodo gaseoso es absorbido en sosa cáustica, seguidamente se procede a la dosificación fotométrica según el método de Sandell-Kolthoff (con influencia catalítica del par redox Ce (IV)/ As (III) a 436 nm,

(xiv) para la dosificación de cinc, se utiliza la técnica de dosificación definida en la norma ICP NF EN ISO 11885, y

(xv) para la dosificación de hierro, se utiliza la técnica de dosificación definida según la norma ICP NF EN ISO 11885.

En modos de realización preferidos, la composición de fórmula (I) consiste en una composición que comprende exclusivamente elementos o compuestos minerales. En estos modos de realización, la composición de fórmula (I) consiste en una composición pura o exclusivamente mineral y no contiene consecuentemente ningún elemento o compuesto orgánico, es decir, ningún compuesto hidrocarbonado. Con carácter ilustrativo, la composición de fórmula (I) no comprende vitaminas, aminoácidos, azúcares, ácidos o bases orgánicos, etc.

Según otras características, la composición de fórmula (I) se presenta en una forma concentrada, que es en general diluida antes de su utilización sobre las plantas.

Para fabricar la composición de fórmula (I) anterior, el experto en la técnica se referirá ventajosamente al contenido técnico de la presente descripción, comprendidos los ejemplos.

Por “planta”, se entiende según la invención las plantas monocotiledónicas y las plantas dicotiledónicas.

Las plantas en el sentido de la invención abarcan las utilizadas para la agricultura, para horticultura, para arboricultura y para pastos de ganado.

Están abarcadas particularmente las plantas de cereales de gran cultivo, los árboles frutales y las plantas de flores. Las plantas abarcan particularmente trigo, cebada, colza, maíz y arroz y las especies de árboles como manzanos, perales, ciruelos, melocotoneros, albaricoqueros, etc.

Las dicotiledónicas abarcan las especies y familias siguientes: *Nymphaeaceae*, *Ceratophyllaceae*, *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Ulmaceae*, *Cannabaceae*, *Urticaceae*, *Myricaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Aizoaceae*, *Chenopodiaceae*, *Portulacaceae*, *Caryophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Plumbaginaceae*, *Elatinaceae*, *Guttiferae*/ *Hypericaceae*/ *Clusiaceae*, *Malvaceae*, *Malvaceae*, *Droseraceae*, *Violaceae*, *Cucurbitaceae*, *Salicaceae*, *Cruciferae*/ *Brassicaceae*, *Resedaceae*, *Empetraceae*, *Ericaceae*, *Pyrolaceae*, *Monotrooaceae*, *Primulaceae*, *Grossulariaceae*, *Crassulaceae*, *Saxifragaceae*, *Rosaceae*, *Leguminosae*/ *Fabaceae*, *Elaeagnaceae*, *Halagaraceae*, *Lythraceae*, *Onagraceae*, *Viscaceae*, *Celastraceae*, *Aquifoliaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rhamnaceae*, *Linaceae*, *Polygalaceae*, *Aceraceae*, *Oxalidaceae*, *Geraniaceae*, *Balsaminaceae*, *Araliaceae*, *Umbelliferae*/ *Apiaceae*, *Gentianaceae*, *Apocynaceae*, *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Cuscutaceae*, *Menyanthaceae*, *Boraginaceae*, *Lamiaceae*, *Hippuridaceae*, *Callitrichaceae*, *Plantaginaceae*, *Buddlejaceae*, *Oleaceae*, *Scrophulariaceae*, *Orobanchaceae*, *Lentibulariaceae*, *Campanulaceae*, *Rubiaceae*, *Caprifoliaceae*, *Adoxaceae*, *Valerianaceae*, *Dipsacaceae* y *Compositae*/ *Asteraceae*.

Mediante “respuesta adaptativa” de una planta, se entiende cualquier modificación fisiológica detectable de una planta como consecuencia de la aplicación a dicha planta de un cambio rápido de las condiciones de su entorno. Las modificaciones fisiológicas detectables abarcan cualquier modificación en la cantidad o la concentración de uno o varios metabolitos de tejidos, comprendidos los intracelulares o incluso cualquier modificación cualitativa o cuantitativa detectable de la(s) actividad(es) enzimática(s) de dicha planta, o incluso cualquier modificación detectable de la morfología de dicha planta. Las respuestas adaptativas de las plantas incluyen particularmente la producción por las células de las plantas de metabolitos denominados “segundos mensajeros”. Los segundos mensajeros abarcan iones de calcio y las especies reactivas de oxígenos (EOS).

Las “condiciones del entorno” abarcan las condiciones hídricas, condiciones de salinidad, condiciones osmóticas, condiciones oxidativas y condiciones térmicas. Un cambio rápido de las condiciones del entorno de la planta se

denomina también “choque” o “tensión” para los fines de la presente invención. Las condiciones del entorno abarcan (i) las condiciones “bióticas” que resultan del entorno biológico de la planta y (ii) las condiciones “abióticas” que resultan del entorno físico-químico de la planta.

5 Los cambios de condiciones del entorno consisten en una tensión o choque abiótico que abarcan las tensiones o choques de salinidad, osmóticos, oxidativos, térmicos, hídricos y los choques provocados por el contacto de la planta con sustancias tóxicas como ciertos metales o ciertas sustancias químicas tóxicas orgánicas de síntesis o incluso ciertas sustancias químicas minerales naturales o de síntesis. Abarcan también una exposición a una radiación ionizante o no ionizante y una carencia o un exceso nutricional.

10 Una tensión o choque de salinidad puede ser provocado cuando la planta crece en un terreno con un elevado contenido de cloruro de sodio, por ejemplo, en campos o pastos en las proximidades de las costas marítimas. Una tensión de salinidad engendra particularmente una desregulación de la homeostasis y de la distribución iónica en los tejidos vegetales, lo que implica una alteración de la germinación de las semillas y del crecimiento de la planta.

15 Una tensión o choque osmótico puede ser provocado artificialmente por un cultivo en un sustrato con elevado contenido de manitol. Una tensión osmótica implica particularmente una desregulación de la homeostasis y de la distribución iónica en los tejidos vegetales, lo que implica una alteración de la germinación de las semillas y del crecimiento de la planta.

20 Una tensión o choque oxidativo puede ser provocado artificialmente por un cultivo sobre viológeno de metilo. Una tensión oxidativa implica particularmente la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), una desnaturalización de las proteínas y una degradación de la clorofila, lo que implica un blanqueo de la planta y puede conducir a su muerte.

25 Una tensión o choque térmico abarca una tensión provocada por el calor y una tensión provocada por el frío. Una tensión provocada por el cultivo a temperatura elevada implica particularmente una desnaturalización de las proteínas, lo que implica una alteración del crecimiento vegetal. Una tensión provocada por el cultivo en frío implica particularmente la formación de especies reactivas de oxígeno, la interrupción de las membranas celulares, lo que implica una alteración del crecimiento vegetal.

30 Una tensión hídrica puede estar provocada por un cultivo en condiciones secas. Una tensión hídrica implica particularmente una represión del crecimiento celular y de la fotosíntesis, lo que implica una alteración del crecimiento vegetal.

35 Los cambios de condiciones del entorno consisten en una tensión o choque biótico que abarcan las tensiones o choques provocados por contactos de la planta con organismos unicelulares o pluricelulares, por ejemplo, bacterias, virus, hongos, organismos fitófagos, insectos y organismos patógenos o incluso tensiones o choques provocados por contacto de la planta con sustancias procedentes de organismos unicelulares o pluricelulares. Una tensión biótica puede ser provocada por bacterias, virus u hongos o partes de estos, o incluso sustancias de origen bacteriano, viral o fúngico.

40 Una composición de fórmula (I) según la invención posee la propiedad de inducir directamente una vía fisiológica implicada en la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno, en la aparición de la inducción de la vía de señalización cálcica, como ilustra el efecto del aumento de la concentración de iones Ca^{2+} que se muestra en los ejemplos. Por tanto, una composición de fórmula (I) induce en el citosol de las células variaciones cálcicas cuyo nivel depende de la cantidad de composición de fórmula (I) que se ha puesto en contacto con la planta.

50 Se muestra también que la composición de fórmula (I) induce cambios en la respuesta de las plantas a una tensión abiótica como un choque térmico por frío.

Igualmente, los resultados presentados en los ejemplos ilustran que una composición de fórmula (I) según la invención es capaz de estimular un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en reacción a la aplicación de una tensión osmótica.

55 Por tanto, en algunos de sus aspectos, la mejora de la respuesta adaptativa de las plantas que es provocada por la composición de fórmula (I), en el contexto de la presente invención, abarca:

60 (i) la propiedad de aumentar de forma detectable la respuesta cálcica de la planta a una tensión abiótica o biótica, siendo detectado el aumento de la respuesta por la medición de la concentración de iones Ca^{2+} en tejidos vegetales y, en particular, en el citosol de células vegetales; y

65 (ii) la propiedad de aumentar de forma detectable la producción de peróxido de hidrógeno en tejidos vegetales en respuesta a una tensión abiótica o biótica.

El hecho de que la composición de fórmula (I) según la invención posea la propiedad de aumentar la respuesta cálcica de la planta en reacción a una tensión biótica o abiótica es importante, debido a que los iones de calcio producidos en el momento de la respuesta cálcica son conocidos en el estado de la técnica como compuestos denominados “segundos mensajeros” en las vías de señalización localizadas metabólicamente y cronológicamente en dirección ascendente del procedimiento en cascada que conducen a la inducción de respuestas adaptativas de la planta que ha sido sometida a tensión biótica o abiótica. Es conocido que el aumento de la concentración de iones de calcio implica la activación de proteínas que tienen una afinidad por estos iónicos como las calcioproteínas. Seguidamente, las calcioproteínas activadas activan a su vez otras proteínas con actividad enzimática como las quinasas o activan otras proteínas no enzimáticas, como proteínas de tipo “bombas” (Sanders, D., Brownlee, C., and Harper, J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706. Shapiro, A.D. (2005). Nitric oxide signaling in plants. *Plant Hormones* VOL 72, 339-398; Brownlee, C. (2003). Plant signalling: Calcium first and second. *Current Biology* 13, R923-R924., Hetherington, A.M., and Brownlee, C. (2004). The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 55, 401-427.; Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A. (2004). Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 55, 263-288.; Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y.Z., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriac, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure - art. no. e327. *Plos Biology* 4, 1749-1762.; George, L., Romanowsky, S.M., Harper, J.F., and Sharrock, R.A. (2007). The ACA10 Ca²⁺ ATPase Regulates Adult Vegetative Development and Inflorescence Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.*). Estos procedimientos en cascada contribuyen al ajuste de respuestas adaptativas específicas de la planta, en reacción a la tensión inicial. Como respuesta adaptativa de las plantas se pueden citar, por ejemplo, el cierre estomatal que permite una limitación de la pérdida de agua durante los periodos de tensión hídrica, la producción de osmolitos de efecto protector en reacción a una tensión térmica u osmótica y la producción de compuestos tóxicos endógenos que tiene por efecto limitar el progreso de organismos patógenos.

El hecho de que la composición de fórmula (I) según la invención posea la propiedad de aumentar la respuesta oxidativa, en particular la producción de especies reactivas de oxígeno, en reacción a un acontecimiento de tensión biótica o abiótica, es muy importante. Más precisamente, es particularmente ventajoso que una composición de fórmula (I) según la invención provoque particularmente un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, que es la especie reactiva de oxígeno más estable y, por tanto, en cuanto compuesto “segundo mensajero” puede ejercer una acción de inducción a distancia de reacciones celulares necesarias para la realización de la respuesta adaptativa de la planta. Se recuerda que la producción de especies reactivas de hidrógeno está en el origen del surgimiento de la mayor parte de las respuestas adaptativas de las plantas en reacción a una tensión abiótica. Se precisa también que las respuestas adaptativas de las plantas en reacción a un acontecimiento de tensión biótica o abiótica inducen la producción de especies reactivas de oxígeno que abarcan: la disipación térmica de la energía en exceso, la disipación fotoquímica de energía utilizando oxígeno como aceptador de la cadena de transporte electrónica, la utilización de toda una serie de enzimas y moléculas antioxidantes para detoxificar los productos ROS, la implicación de enzimas antioxidantes (superóxidodismutasa, catalasa, glutatiónperoxidasas, arcobatoperoxidasa, tiorredoxina/ tiorredoxinareductasa, proteínas de choque calórico), implicación de proteínas transportadoras de hierro y cobre (transferrina, ferritina), implicación de moléculas antioxidantes de tamaño pequeño: glutatión, carotenoides, vitaminas A, C (ácido ascórbico), E (tocoferol), ubiquinona, flavonoides, bilirrubina e implicación de oligoelementos (cobre, cinc o selenio) indispensables como cofactores para la actividad de enzimas antioxidantes.

Por tanto, en uno de sus aspectos, la utilización de la composición de fórmula (I) se caracteriza porque mejora la respuesta adaptativa de las plantas a una tensión biótica o abiótica.

En ciertos modos de realización, la utilización de la composición de fórmula (I) se caracteriza porque la tensión abiótica se escoge entre una tensión hídrica, una tensión osmótica, una tensión térmica y una carencia nutricional. Las carencias nutricionales abarcan carencias minerales, comprendidas las carencias de oligoelementos.

Según otros ciertos modos de realización, la utilización de la composición de fórmula (I) se caracteriza porque la tensión biótica incluye particularmente un contacto, o una infección, por organismos biológicos, comprendidos los microorganismos patógenos que contienen quitina, así como sustancias producidas o derivadas de estos organismos biológicos, comprendida la quitina.

Además, se ha mostrado también según la invención que la composición de fórmula (I) posee particularmente mediante aplicación foliar, la propiedad de estimular el crecimiento de la raíz de las plantas, tanto de las plantas colocadas en condiciones normales de cultivo como las plantas a las que se aplica al menos una condición de tensión abiótica o biótica.

Por tanto, incluso en otros aspectos, la utilización según la invención se caracteriza porque la composición de fórmula (I) induce también un crecimiento del desarrollo de las raíces de las plantas. El crecimiento del desarrollo de las plantas puede ser visualizado por un aumento de la velocidad de crecimiento de las raíces, medición de su longitud media.

Por tanto, la composición de fórmula (I) combina (i) un efecto de aumento de la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno y (ii) un efecto fisioestimulante visualizado por el efecto de crecimiento del desarrollo de las raíces.

5 Por tanto, se muestra según la invención que la composición de fórmula (I) provoca, cuando es aplicada sobre las plantas, preferentemente por dispersión sobre las hojas, los efectos técnicos siguientes:

- un aumento de la respuesta cálcica de las plantas a tensiones hídrica, osmótica y térmica,

10 - un aumento de la reacción de estimulación de mecanismos de defensa de la planta por el inductor de quitina,

- una mejora del estado oxidativo de las células vegetales, mediante la estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno, comprendido el peróxido de hidrógeno (H_2O_2),

15 - un aumento de la velocidad de crecimiento de las raíces de plantas jóvenes, y

- un aumento de la resistencia a la sequedad de las plantas jóvenes.

En particular, se muestra en los ejemplos los siguientes efectos de la composición de fórmula (I):

20 A. A nivel de los segundos mensajeros de la respuesta de las plantas a agresiones bióticas/abióticas (Ca^{2+} y H_2O_2) implicadas en las vías de señalización:

25 a) La composición de fórmula (I) es percibida por la planta como un estímulo exógeno e induce vías de señalización que implican variaciones cálcicas citosólicas en las células de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El tratamiento mediante la composición de fórmula (I) induce modificaciones en la capacidad de la planta para responder a las tensiones.

30 b) La producción de especies reactivas de oxígeno como (H_2O_2) en respuesta al inductor de quitina en plántulas previamente tratadas con la composición de fórmula (I) es superior a la medida en plántulas pulverizadas con agua. Este resultado indica una exacerbación de las reacciones de defensa de las plantas previamente tratadas con la composición de fórmula (I) en respuesta a los inductores producidos por agentes patógenos.

B. A nivel del crecimiento y del desarrollo de plántulas:

35 a) La composición de fórmula (I) aumenta de forma significativa el crecimiento de las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones normales o de tensiones (osmótica o salina)

40 b) La recuperación del desarrollo de plántulas sometidas a una tensión hídrica fuerte es mejorada mediante un tratamiento previo con la composición de fórmula (I).

Los resultados de los ejemplos por tanto muestran que la composición de fórmula (I) ejerce un efecto beneficioso sobre el crecimiento y el desarrollo de las plántulas, tanto en condiciones normales de cultivo como en condiciones de tensión.

45 En ciertos modos de realización ventajosos, la composición de la invención posee la fórmula (II) siguiente que está abarcada por la fórmula (I):

- nitrógeno amoniacal total (N%)	0,08% a 1%
- potasio expresado como K_2O (%)	3,5% a 4,5%
- magnesio expresado como MgO (%)	0,4% a 0,5%
- sodio expresado como Na_2O (%)	1,2 % a 1,6%
- calcio expresado como CaO (%)	0% a 0,1%
- sulfatos totales expresados como SO_3 (%)	3% a 5%
- fósforo total expresado como en P_2O_5 (%)	0%
- cloruros Cl (%)	1% a 2%
- bicarbonatos (% de HCO_3)	1,5% a 1,9%
- boro (%)	0,1 % a 0,15%
- cobre (%)	0,020% a 0,026%

- manganeso (%)	0,00005% a 0,0002%
- yodo (%)	0,025% a 0,031%
- cinc (%)	0,00005% a 0,0002%
- hierro (%)	0,0002% a 0,001%
- agua	Cantidad suficiente para 100%

los porcentajes consisten en porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición.

- 5 Incluso en otros modos de realización ventajosos, la composición de la invención posee la fórmula (III) siguiente, que está abarcada por cada una de las fórmulas (I) y (II):

- nitrógeno amoniacal total (N%)	0,09%
- potasio expresado como K ₂ O (%)	4%
- magnesio expresado como MgO (%)	0,45%
- sodio expresado como Na ₂ O (%)	1,40%
- calcio expresado como CaO (%)	0,05%
- sulfatos totales expresados como SO ₃ (%)	3,85%
- fósforo total expresado como en P ₂ O ₅ (%)	0%
- cloruros Cl (%)	1,40%
- bicarbonatos (% de HCO ₃)	1,7%
- boro (%)	0,12%
- cobre (%)	0,023%
- manganeso (%)	0,00005%
- yodo (%)	0,028%
- cinc (%)	0,00005%
- hierro (%)	0,0003%
- agua	Cantidad suficiente para 100%

los porcentajes consisten en porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición.

- 10 La presente invención tiene adicionalmente por objeto una cualquiera de las composiciones divulgadas en la presente descripción, comprendidos los ejemplos y, particularmente, las composiciones de fórmula (I), (II) y (III).

En ciertos modos de realización, una composición de fórmula (I) puede ser obtenida según el protocolo detallado en la tabla siguiente.

15

- agua corriente	Cantidad necesaria para 100%
- yoduro de potasio	0,030 a 0,50%
- cloruro de sodio	0,8 a 1,2%
- ácido bórico	0,6 a 1,0%
- carbonato de sodio	2,0 a 4,0%
- cloruro de magnesio	2,0 a 4,0%
- sulfato de potasio	7,0 a 1,10%
- sulfato de cobre pentahidratado	0,05 a 0,15%
- sulfato de amonio	1,5 a 3,5%

Los porcentajes anteriores consisten en porcentajes en peso de cada ingrediente, con respecto al peso total de la composición líquida.

Los diferentes ingredientes que anteceden se añaden a agua corriente, a temperatura ambiente, y seguidamente la solución obtenida se mezcla vigorosamente hasta obtener una composición líquida estable.

La composición líquida seguidamente se filtra con el fin de eliminar los sólidos no disueltos, con el fin de obtener una composición de fórmula (I) transparente lista para ser empleada.

De forma ventajosa, la composición de fórmula (I), comprendido su ejemplo específico de fórmula (II), consiste en una formulación líquida en forma concentrada, que es diluida en un cierto volumen de agua con el fin de obtener una composición diluida lista para ser empleada.

Por tanto, la invención se refiere también a la utilización de una composición mineral líquida para pulverización foliar, que consiste en una composición concentrada de fórmula (I), comprendida una composición de fórmula (II), que ha sido diluida en 50 a 10.000 veces su volumen de agua, preferentemente de 100 a 5.000 veces su volumen de agua, por ejemplo, de 100 a 1.000 veces o de 400 a 600 veces su volumen en agua, para mejorar la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno.

La presente invención se refiere también a la utilización de una composición mineral concentrada de fórmula (I) caracterizada porque, antes de la pulverización foliar, la composición de fórmula (I) es diluida en agua o en un líquido acuoso en una proporción de composición (I) con relación a agua o líquido acuoso de 0,1:500 (v/v) a 10:500 (v/v), preferentemente de 0,5:500 (v/v) a 2:500 (v/v).

En la práctica, la composición diluida anterior es ventajosamente aplicada sobre las plantas mediante dispersión sobre las partes aéreas, preferentemente por pulverización foliar.

En ciertos modos de realización, la composición diluida anterior es aplicada mediante dispersión sobre las partes aéreas de las plantas en cantidades de 0,5 l a 20 l por hectárea de superficie vegetal que va a ser tratada, preferentemente de 1 l a 10 l por hectárea de superficie vegetal que va a ser tratada, durante un periodo de un año, en una o varias fracciones.

La presente invención se ilustra además, sin por ello quedar limitada, mediante los ejemplo siguientes.

Ejemplos

A. Materiales y métodos de los ejemplos

A.1. Material vegetal

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0 (salvajes) o ecotipo NoO (transgénicos que expresan la sonda cálcica aecurina) envejecidos 10 días.

Las plántulas se cultivan ya sea in vitro en platos de Petri sobre medio nutritivo gelosado (medio MS de Murashige et Skoog) sobre el terreno o en un tarro o en GiFi.

Para los cultivos in vitro sobre plántulas, se siembran granos previamente esterilizados de *Arabidopsis thaliana* en líneas de aproximadamente 100 granos.

A.2. Medición de la respuesta cálcica de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La víspera de las mediciones, 50 plántulas de aproximadamente 10 días son recogidos a partir de un cultivo in vitro y repartidas en platos de Petri por lotes de tres en 500 µl de agua que contiene coelentarazina 2 µM, y seguidamente se incuban en la oscuridad y a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, las medidas se realizan con luminómetro transfiriendo un conjunto de 3 plántulas a un plato de Petri que contenía 1 ml de solución de composición de fórmula (III) a la concentración escogida y mediante registro de la señal emitida por aecurina después de entrar en contacto (por inmersión) las plántulas con el producto. Después de registrar la señal durante 15 minutos, la aecurina se extrae por inyección de una solución de lisis que contenía CaCl₂ 100 mM con el fin de calibrar la señal.

A.3. Medición de la producción de H₂O₂ en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La producción de H₂O₂ por plántulas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas 10 días fue dosificada mediante la medición de la luminiscencia producida por la oxidación de luminol. Se depositaron conjuntos de 3 plántulas en platos de Petri en el luminómetro, seguidamente se midió la luminiscencia durante 10 minutos después de la inyección del medio de reacción (Luminol 20 µM peroxidasa 4 unidades, tris-HCl 5 mM, pH 7,8) complementado con manitol 350 mM, o bien con 10 µg/ ml de quitina utilizada en este caso como testigo positivo capaz de inducir la producción de H₂O₂.

A.4. Medición del crecimiento de raíces de plántulas cultivadas in vitro previamente tratados mediante una composición de fórmula (I)

- 5 Para cada ensayo, una línea de plántulas envejecidas 10 días fue tratada mediante pulverización de la composición de fórmula (III) al 2%, seguidamente fue transferida sobre medio normal o bien sobre medio estresante (NaCl 100 mM o manitol 350 mM). El crecimiento de las raíces fue seguido a continuación de forma cotidiana.

A.5. Observación del desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones estresantes después de un pretratamiento mediante una composición de fórmula (I)

- 10 Se sembraron granos de *Arabidopsis thaliana* en un tarro sobre terreno y seguidamente se cultivaron en fitroton ($T^0 = 22/20$ °C, fotoperiodo 9/15, humedad del 70%) durante 10 días (*A. thaliana*).

- 15 Las plántulas jóvenes fueron tratadas seguidamente mediante pulverización de las hojas con agua (testigos) o con la composición de fórmula (III) al 2% en agua, y seguidamente se colocaron en condiciones estresantes: tensión osmótica (riego diario con manitol 350 mM), tensión salina (riego NaCl 100 mM) o tensión hídrica (sin riego).

El desarrollo de las plántulas se siguió a continuación de forma cotidiana mediante fotografía.

20 Ejemplo 1: Preparación de una composición fórmula (I)

Se prepara una composición de fórmula (I) que tiene la fórmula (III) siguiente:

- nitrógeno amoniacal total (N%)	0,09%
- potasio expresado como K ₂ O (%)	4%
- magnesio expresado como MgO (%)	0,45%
- sodio expresado como Na ₂ O (%)	1,40%
- calcio expresado como CaO (%)	0,05%
- sulfatos totales expresados como SO ₃ (%)	3,85%
- fósforo total expresado como en P ₂ O ₅ (%)	0%
- cloruros Cl (%)	1,40%
- bicarbonatos (% de HCO ₃)	1,7%
- boro (%)	0,12%
- cobre (%)	0,023%
- manganeso (%)	0,00005%
- yodo (%)	0,028%
- cinc (%)	0,00005%
- hierro (%)	0,0003%
- agua	En cantidad suficiente para 100%

- 25 los porcentajes consisten en porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición de fórmula (III) se preparó según el protocolo resumido en la tabla siguiente.

Ingredientes	Cantidad de sal (g)	Concentración final de sal añadida (g/l)
Agua corriente	2.500,00	
KL	1,00	0,40
NaCl	24,00	9,60
H ₃ BO ₃	20,00	8,00
NaHCO ₃	72,50	29,00
MgCl ₂	65,00	26,00
K ₂ SO ₄	247,50	99,00

CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,50	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	62,50	25,00
TOTAL	495,00	198,00

Los diferentes ingredientes se añadieron al agua corriente, y seguidamente la solución se mezcló vigorosamente hasta obtener un líquido de composición soluble estable.

- 5 El líquido seguidamente se filtra con el fin de obtener una composición soluble transparente y estable de fórmula (III) lista para ser empleada. Para la filtración, se puede utilizar de filtro celulósico PRAT DUMAS® sin cenizas que tiene un tamaño de poros de 7 a 10 micrómetros.

- 10 En los ejemplos que siguen, se utiliza la composición de fórmula (III) en diversas diluciones que van 0,01% a 8,00% (volumen/volumen) en agua corriente, y la composición diluida resultante se utiliza para las pulverizaciones foliares.

Ejemplo 2: Medición de la respuesta cálcica de plántulas de *Arabidopsis thaliana* a la aplicación foliar de una composición de fórmula (I)

- 15 Se ha mostrado que la aplicación de la composición de fórmula (III) induce variaciones cálcicas en las células, lo que demuestra que la composición de fórmula (III) es percibida por la planta como un estímulo que induce respuestas de adaptación en la planta.

- 20 Los resultados se presentan en las figuras 1A y 1B, que ilustran las variaciones cálcicas inducidas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* envejecidas 10 días por diferentes concentraciones de composición de fórmula (III) (flecha= instante de la puesta en contacto de las plántulas con el producto).

- 25 Con estos fines, se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen de la aecurina en citosol. Se ensayaron diluciones de 0,01 a 8% (v/v) de la composición de fórmula (III) en agua y se efectuó un testigo con agua. En el momento de la puesta en contacto de las plántulas con la solución se observa una variación rápida de la señal achacable a la propia manipulación (choque mecánicos) e independiente de la concentración de producto (se observa también en los testigos de agua). Los resultados muestran que la composición de fórmula (III) induce una respuesta cálcica dependiente de la dosis bimodal que presenta un máximo entre 30 segundos y 1 minuto después de la puesta en contacto de las plántulas con el producto, seguida de una fase de retorno progresivo hacia el nivel de base para diluciones inferiores a 2% (v/v) o de plataforma prolongada para diluciones superiores a 2% 8v/v9. Debe apreciarse que más allá de una concentración de 2% 8v/v) de composición de fórmula (III), la respuesta cálcica es rápida, intensa y fuertemente perturbada.

- 35 Por tanto, se puede concluir de estos ensayos que:

- 1) La composición de fórmula (III), incluso a considerable dilución de 0,01% (v/v) ejerce un efecto de estimulación de la respuesta cálcica de las plantas. El producto induce en el citosol de las células variaciones cálcicas que varían con la concentración y, por tanto, la cantidad de composición de fórmula (III) que es aplicada sobre las hojas.
- 40 2) Para concentraciones superiores a 2% (v/v) esta respuesta cálcica presenta características diferentes a la obtenida para concentraciones inferiores a 2%. Para concentraciones superiores a 2% (v/v), la respuesta cálcica presenta particularmente una fase de plataforma sostenida ($\Delta[Ca^{2+}] > 0,5\%$), lo que permite implicar respuestas biológicas finales diferentes en respuesta a estas señales cálcicas de "segundos mensajeros".

- 45 Ejemplo 3: Estudio del efecto a largo plazo de la aplicación foliar de una composición de fórmula (I) sobre la respuesta cálcica de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con un choque térmico mediante frío

- 50 Para determinar el efecto de un pretratamiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediante la composición de fórmula (III) sobre la respuesta cálcica inducida por un choque térmico mediante frío, las plántulas envejecidas 10 días fueron pulverizadas la víspera de las mediciones con una solución de 2% de composición de fórmula (III) o de agua (testigo). Aproximadamente tres horas del tratamiento, estas plántulas fueron retiradas y puestas a incubar en coelentarazina durante la noche, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Al día siguiente se registraron las respuestas cálcicas inducidas en estas plántulas mediante el tratamiento térmico (choque frío).

- 55 El choque frío, obtenido mediante inmersión de las plántulas en agua a 4 °C, es conocido para inducir una respuesta cálcica rápida, intensa y de corta duración.

Las figuras 2A y 2B presentan los resultados medios obtenidos dos series de experimentos independientes por triplicado, 24 y 48 horas después del pretratamiento con una composición de fórmula (III).

Después de 24 horas, se observa una diferencia significativa de la intensidad de la respuesta inducida por tensión según el pretratamiento (composición de fórmula (III) o agua).

- 5 Se muestra que el tratamiento con la composición de fórmula (III) exagera la respuesta al frío de forma significativa.

En la segunda serie de ensayos, el tratamiento mediante la composición de fórmula (III) induce una desensibilización al frío significativa con respecto a las plantas tratadas con agua.

- 10 Según el ensayo considerado, la composición de fórmula (III) tiene por tanto un efecto o bien amplificador, o bien inhibidor de la respuesta que no permite sacar conclusiones definitivas sobre su efecto. Después de 48 horas sobre dos series de experimentos, parece que el tratamiento PRP no se distingue ya del tratamiento con agua (testigo).

- 15 En conclusión, los resultados del Ejemplo 3 muestran que un pretratamiento con una composición de fórmula (III) al 2% (v/v) induce un cambio de comportamiento de las plantas en la respuesta cálcica a un choque frío si este último es aplicado con una demora máxima de 24 horas.

Ejemplo 4: Estudio del efecto a largo plazo de la composición de fórmula (I) sobre la producción de H₂O₂ en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a un choque osmótico o a un tratamiento inductor mediante una sustancia producida por un organismo patógeno.

- 20

En el Ejemplo 4, se pretende determinar el efecto de un tratamiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediante la composición de fórmula (III) sobre la respuesta de H₂O₂ inducida por un choque osmótico o por una sustancia inductora producida por un microorganismo fúngico, la quitina. La quitina es utilizada en este caso como testigo positivo conocido para inducir la producción de H₂O₂ y para emular agresiones provocadas por agentes patógenos capaces de inducir reacciones de defensa de las que uno de los marcadores es la producciones de H₂O₂.

- 25

Para esto, las plántulas envejecidas 10 días fueron pulverizadas la víspera de las mediciones con una solución de 2% de la composición de fórmula (III) o de agua (testigo). Al día siguiente se mide la producción de H₂O₂ inducida por choque osmótico (figura 3), o bien por quitina (figura 4) en estas plántulas, como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

- 30

Los resultados se presentan en las figuras 3 y 4. Las figuras 3 y 4 ilustran la producción de H₂O₂ en respuesta a un choque osmótico (figura 3) o a la quitina (figura 4) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* pretratados con 24 horas de antelación con agua o con la composición de fórmula (III) al 2% (v/v).

- 35

En la respuesta a manitol que emula aquí una tensión hídrica, la intensidad de las respuestas observadas es muy variable. El nivel de intensidad medida en las plántulas pretratadas con la composición de fórmula (III) es inferior al observado en las plántulas pretratadas con agua. Por el contrario, el manitol no induce una producción de H₂O₂ significativamente diferente a la obtenida aplicando agua en lugar de manitol sobre las plántulas previamente pulverizadas con agua (H₂O testigo) o pulverizadas con la composición de fórmula (III) (PRP).

- 40

En lo que se refiere a la producción de H₂O₂ inducida por quitina, se puede destacar que en las plántulas pretratadas mediante la composición de fórmula (III), la quitina induce una producción de H₂O₂ de 4 a 5 veces superior a la de las plántulas pretratadas mediante la composición de fórmula (III) pero incubados en presencia de agua (PRP).

- 45

En el caso de las plántulas pretratadas con agua y estimulados mediante quitina, la producción de H₂O₂ no es significativamente diferente de la estimulación de estas mismas plántulas mediante agua (H₂O testigo).

- 50 En conclusión, los resultados del Ejemplo 4 muestran un efecto estimulador de la producción de H₂O₂ por quitina se generan a partir del pretratamiento de las plántulas con la composición de fórmula (III). Esto indica que las plántulas pretratadas mediante la composición de fórmula (III) tienen la capacidad de exagerar sus reacciones de defensa en respuesta a una infección eventual mediante un agente patógeno que contiene o que produce quitina, como los hongos.

- 55

Ejemplo 5: Efecto a largo plazo de la composición de fórmula (I) sobre el crecimiento de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas in vitro

En el estudio del Ejemplo 5, las plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en cajas de medio agarosado fueron pulverizadas con una composición de fórmula (III) al 2% (v/v) o bien con agua.

- 60

Al día siguiente, estas plántulas fueron transferidas a nuevas cajas sobre medio normal, o bien sobre medio estresante que contenía NaCl 100 mM o manitol 350 mM.

- 65 Se midió cotidianamente la longitud de la raíz principal de las plántulas.

La figura 5 presenta el resultado de las mediciones efectuadas 24 horas después de la transferencia sobre 20 a 30 plántulas por grupo. A pesar de la variabilidad bastante considerable de las longitudes, se observa un efecto global del producto PRP-EPV sobre el crecimiento de las raíces muy significativo ($p < 0,01$): el crecimiento de la longitud de la raíz principal es mucho mayor en las plántulas pretratadas con la composición de fórmula (III) que en las plántulas tratadas con H_2O_2 , ya sea en condiciones testigos (no estresadas) o estresadas (NaCl o manitol). Al observar el gráfico se comprueba que las plántulas pretratadas resisten mejor a la tensión que las plántulas testigos.

En conclusión, los resultados del Ejemplo 5 muestran que la composición de fórmula (III) tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la raíz principal. Este mejor crecimiento, comprendidas las situaciones de tensión, favorece una mejor tolerancia a la tensión hídrica.

Ejemplo 6: Efecto a largo plazo de la composición de fórmula (I) sobre el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en tarros

Para ensayar el efecto de la composición de fórmula (III) sobre la resistencia de plántulas de *Arabidopsis thaliana* a diversas tensiones, se cultivaron plántulas en tarros envejecidos 10 días y se trataron mediante pulverización con una composición de fórmula (III) al 2% (v/v) o con agua (testigos), seguidamente se regaron los días siguientes con agua que contenía manitol 350 mM (tensión osmótica que simula la tensión hídrica) o NaCl 100 mM (tensión salina), o bien se dejaron sin riego (tensión hídrica).

Después de 2 semanas de tratamiento estresante, las plántulas fueron regaron normalmente con agua pura.

Se observa que los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el desarrollo de las plántulas que los que habían sido pretratadas o no con la composición de fórmula (III).

Por el contrario, parece que después de una tensión hídrica por detención del riego, la recuperación del desarrollo después de la rehidratación estaba mejorada en las plántulas que habían sido pretratadas con una composición de fórmula (III). Esta mejor recuperación es mucho más neta después de 10 días de hidratación.

Conclusión: los resultados del Ejemplo 6 muestran que el pretratamiento con la composición de fórmula (III) mejora la recuperación de las plantas después de una fuerte tensión hídrica (sequía de las partes aéreas).

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición mineral líquida concentrada para pulverización foliar, que comprende la fórmula (I) siguiente:

5

- nitrógeno amoniacal total (N%)	0,08% a 2%
- potasio expresado como K ₂ O (%)	3% a 6%
- magnesio expresado como MgO (%)	0,4% a 0,8%
- sodio expresado como Na ₂ O (%)	1% a 2%
- calcio expresado como CaO (%)	0% a 0,5%
- sulfatos totales expresados como SO ₃ (%)	3% a 6%
- fósforo total expresado como en P ₂ O ₅ (%)	0%
- cloruros Cl (%)	1% a 2%
- bicarbonatos (% de HCO ₃)	1,2% a 3,0%
- boro (%)	0,1 % a 0,2%
- cobre (%)	0,018% a 0,03%
- manganeso (%)	0,00005% a 0,006%
- yodo (%)	0,02% a 0,04%
- cinc (%)	0,00005% a 0,006%
- hierro (mg/kg)	0,0002% a 0,003%
- agua	cantidad suficiente para 100%

consistiendo los porcentajes en porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición, para mejorar la respuesta adaptativa de las plantas a un cambio de las condiciones del entorno.

10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque es mejorada la respuesta adaptativa de las plantas a una tensión biótica o abiótica.

3. Utilización según la reivindicación 2, caracterizada porque la tensión abiótica es escogida entre una tensión hídrica, una tensión osmótica, una tensión térmica, una tensión de sobreexposición a una radiación ionizante o no ionizante, una carencia nutricional, una tensión provocada por compuestos tóxicos.

15

4. Utilización según la reivindicación 2, caracterizada porque la tensión biótica es escogida entre bacterias, virus, hongos, organismos fitopatógenos, insectos y agentes patógenos.

20 5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la composición de fórmula (I) induce también un crecimiento del desarrollo de las raíces de las plantas.

6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque, antes de la pulverización foliar, la composición concentrada de fórmula (I) es diluida en agua o en líquido acuoso en una proporción de composición (I):agua o líquido acuoso que va de 0,1:500 (v/v) a 10:500 (v/v).

25

7. Utilización según la reivindicación 6, caracterizada porque la composición concentrada de fórmula (I) es diluida en agua o en un líquido acuoso en una proporción de composición (I):agua o líquido acuoso que va de 0,5:500 (v/v) a 2:500 (v/v).

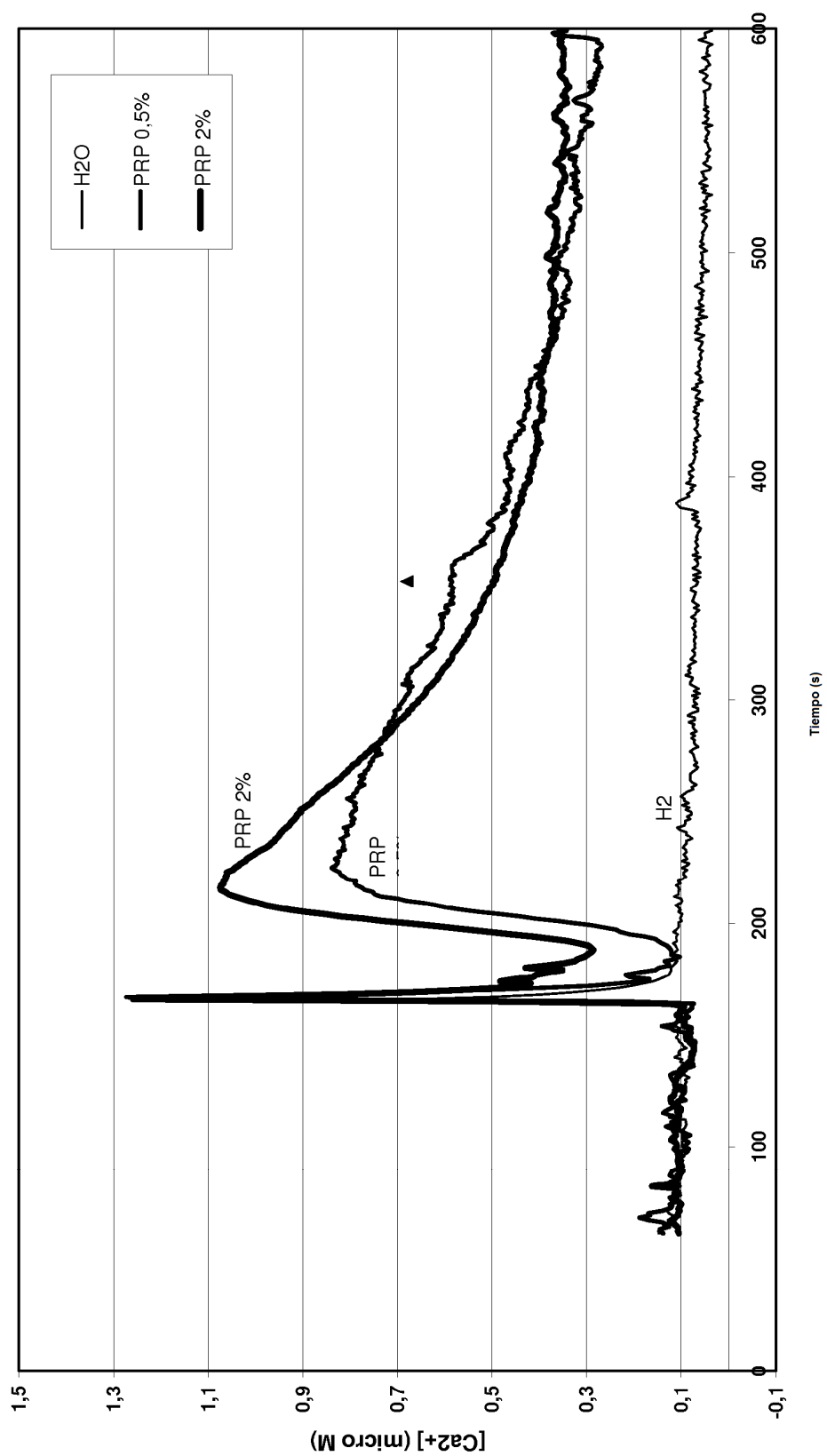


Figura 1A

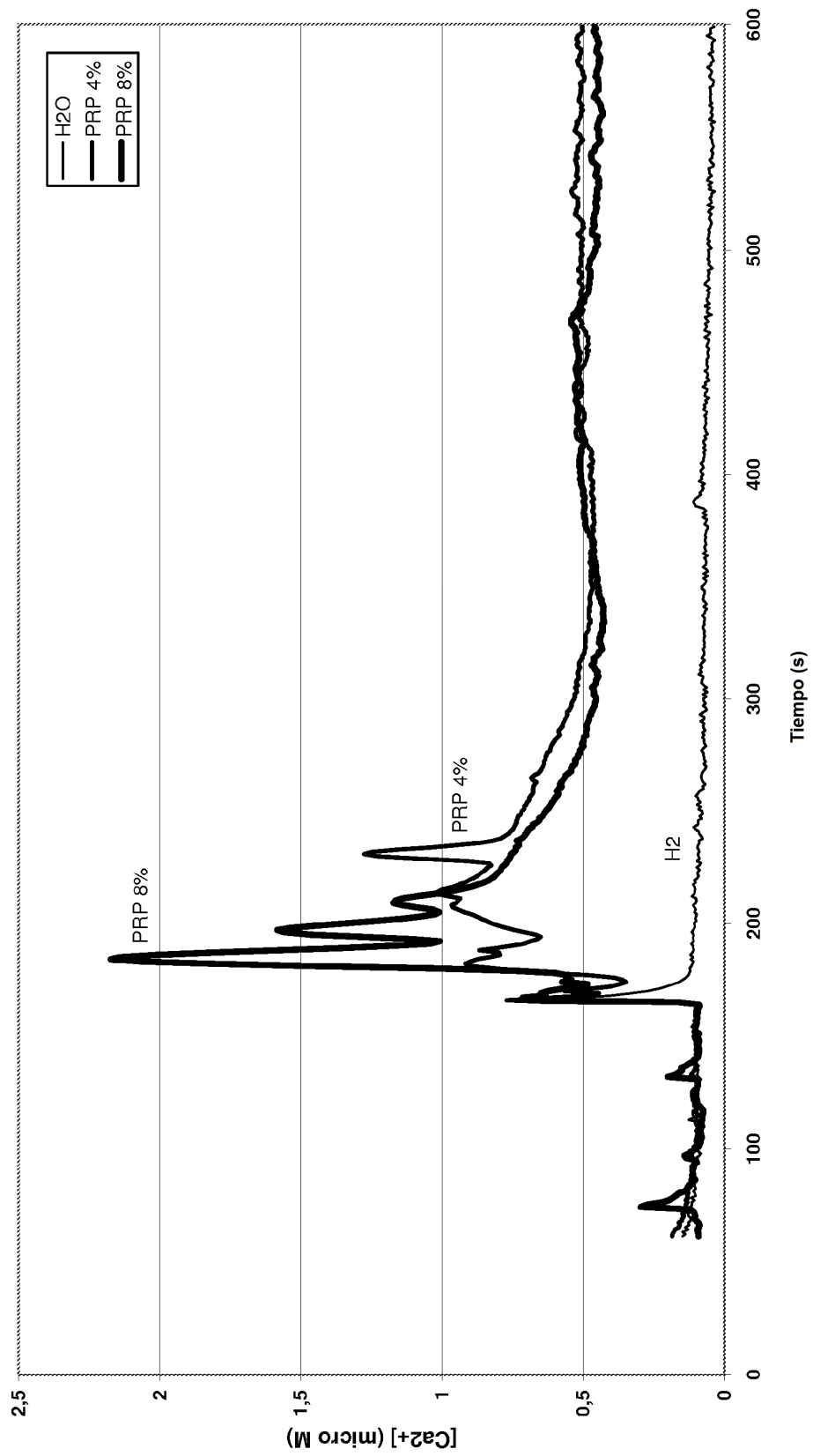


Figura 1B

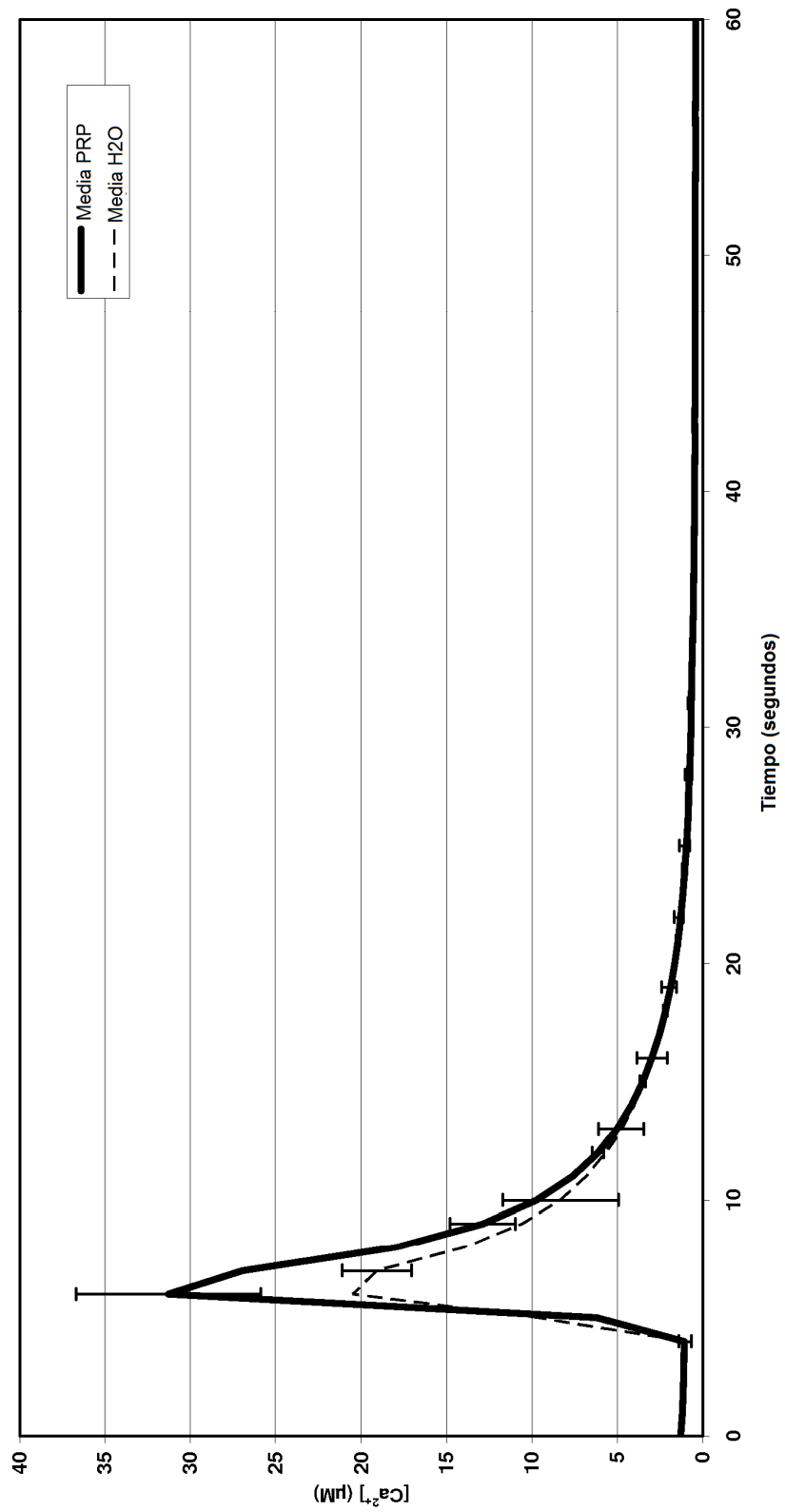


Figura 2A

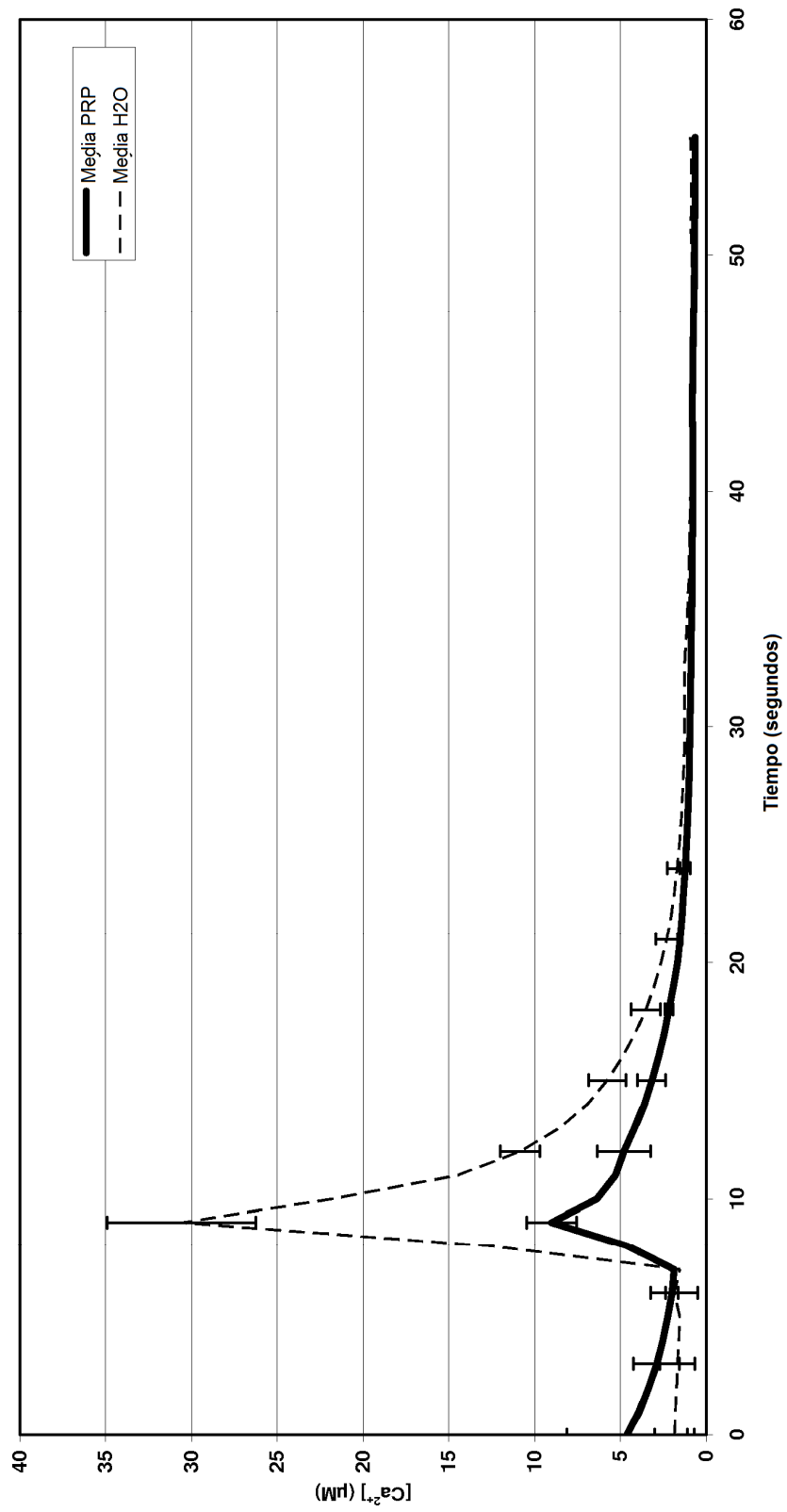


Figura 2B

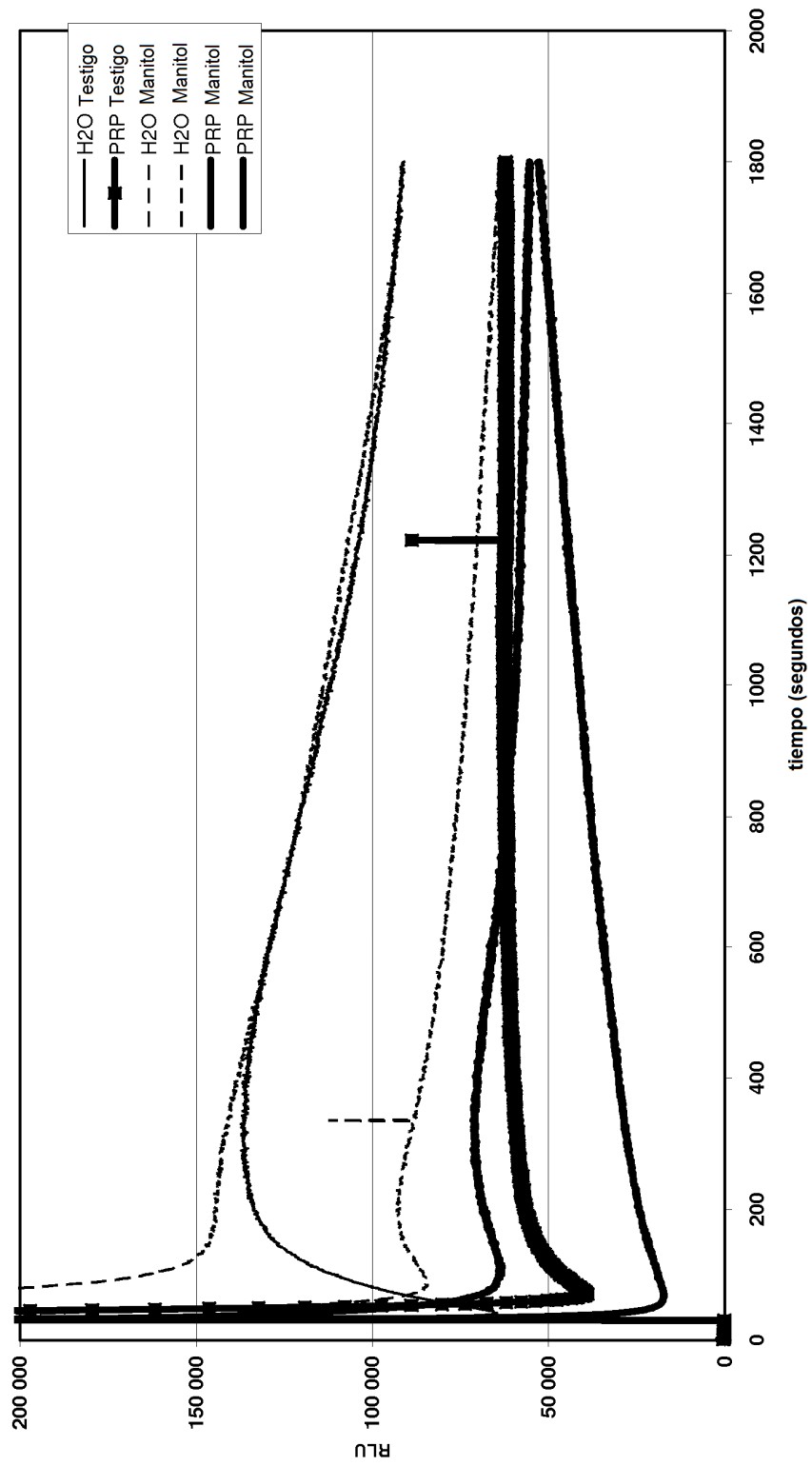


Figura 3

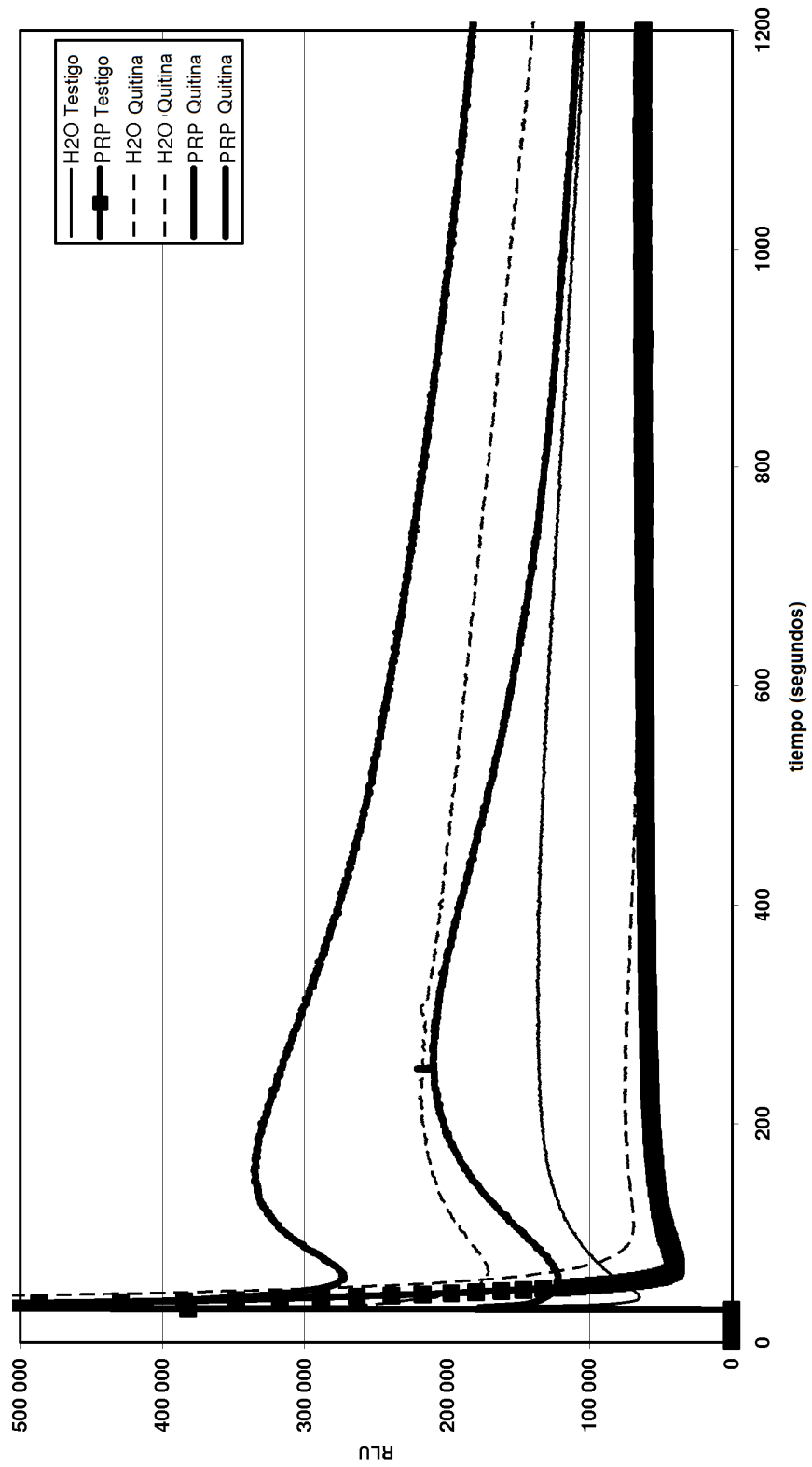


Figura 4

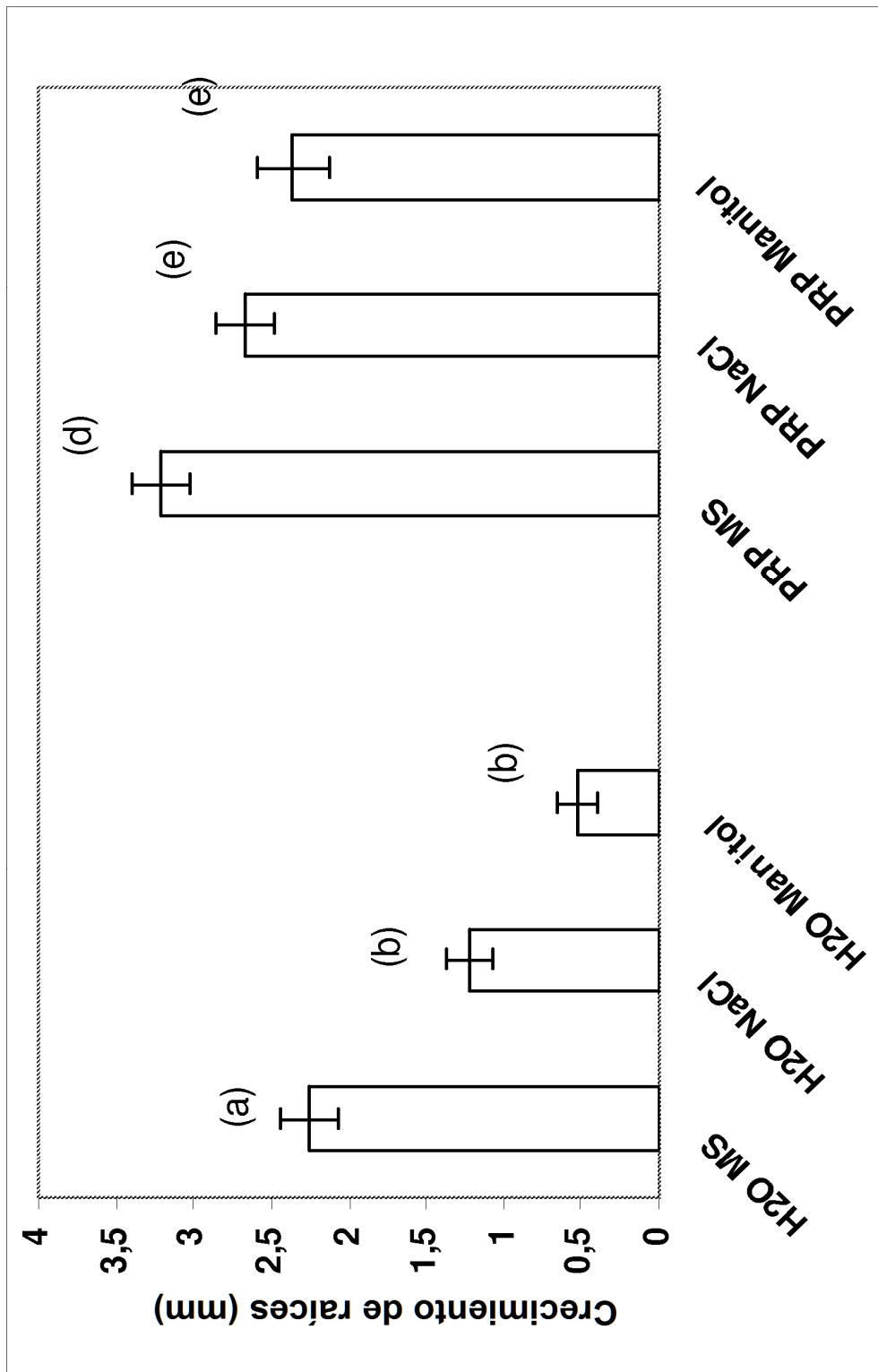


Figura 5