(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 607 235**

(21) Número de solicitud: 201531382

(51) Int. Cl.:

A01N 65/10 (2009.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

29.09.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

29.03.2017

(71) Solicitantes:

BIOPHARMA RESEARCH, S.A. (100.0%)
ESPIRITU SANTO, Nº 34
14540 LA RAMBLA (Córdoba) ES

(72) Inventor/es:

NIETO DEL RIO, Juan

(74) Agente/Representante:

PEREZ REQUENA, Francisco

(54) Título: **UTILIZACIÓN DE UN EXTRACTO VEGETAL DERIVADO DEL ANÍS COMO INDUCTOR DE LA POLINIZACIÓN DE LAS FLORES Y SUS APLICACIONES EN AGRICULTURA**

(57) Resumen:

Utilización de un extracto vegetal derivado del anís como inductor de la polinización de las flores y sus aplicaciones en agricultura que comprende el uso de un extracto de semilla de Pimpinella anisum L. en composiciones o formulaciones agrícolas como inductor de la polinización.

ES 2 607 235 A1

DESCRIPCIÓN

UTILIZACIÓN DE UN EXTRACTO VEGETAL DERIVADO DEL ANÍS COMO INDUCTOR DE LA POLINIZACIÓN DE LAS FLORES Y SUS APLICACIONES EN AGRICULTURA

Objeto de la invención

La presente invención se refiere al uso de un extracto vegetal derivado del anís en formulaciones agrícolas como inductor de la polinización de las flores, a través de la mejora de la calidad del polen y de la fecundación de las plantas con flores. La activación bioquímica que se estaría produciendo por aplicación de este extracto permite un mayor tiempo para la polinización y por tanto, mayor tasa de cuajado y mejor llenado del fruto. Todo ello conlleva una mayor producción, calibres más homogéneos y mayor peso específico de los frutos.

Estado de la técnica

Se llama polinización al proceso de transporte de granos de polen desde los sacos polínicos de la antera de una flor hasta el estigma de esa misma flor o de otra. Este transporte de polen puede producirse por el arrastre de los granos por el viento o mediante insectos, principalmente. Posteriormente a que el grano de polen haya llegado al estigma de la flor, el llamado líquido estigmático lo hidrata y se desarrolla el tubo polínico. Este tubo polínico penetra a través del estilo hasta llegar al óvulo que va a ser fecundado.

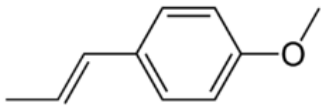
Uno de los factores más influyentes en el proceso de polinización es la llamada receptividad estigmática, que se define como la capacidad de un estigma para proveer al polen de un ambiente adecuado para la germinación de los granos de polen y su penetración en el tejido transmisor (Losada and Herrero, 2009). Es un parámetro decisivo para el cuajado final del fruto y condiciona el “Período Efectivo de Polinización” definido por Williams en 1966 (Sanzol et al., 2003; Sanzol and Herrero, 2001). El período durante el cual el estigma está en las condiciones apropiadas para la polinización es muy corto, entre uno o varios días dependiendo de la especie. Algunos estudios han concluido que la pérdida de receptividad estigmática conlleva una degeneración de las células papilares, con consecuente secreción de materiales intracelulares hasta el exterior (González et al., 1995). Sin embargo, se desconocen

los factores que la determinan.

Con todo esto, sería muy conveniente encontrar un formulado que mejorara la polinización, bien acelerando el transporte de polen desde las anteras hasta el estigma, o bien manteniendo durante un tiempo mayor la disponibilidad de éste para recibir adecuadamente los granos de polen. La mejora de cualquiera de los puntos críticos de la polinización tendría una influencia directa en el cuajado posterior del fruto y, consecuentemente, en la producción del cultivo.

El aceite de anís es un aceite esencial que se obtiene de la semilla de *Pimpinella anisum* L., hierba aromática de la familia Apiaceae originaria del Asia sudoccidental y la cuenca mediterránea oriental. Se obtiene mediante una destilación por arrastre de vapor de las semillas frescas o algo desecadas. El principio activo más importante de este extracto es el anetol, que supone porcentajes entre el 85 y el 97% aproximadamente de su composición. Además, el aceite de anís contiene pequeñas cantidades de almidón, azúcares y proteínas.

El anetol es un éter insaturado aromático, también llamado 1-metoxi-4-(1-propenil) benceno, que presenta una fórmula química $C_{10}H_{12}O$ y la estructura que aparece en la siguiente figura. Es el responsable del sabor característico a regaliz que presenta el extracto de anís.



Se ha demostrado que el extracto de la semilla de *Pimpinella anisum* L. presenta un efecto antibiótico frente a bacterias y hongos patógenos que afectan al hombre y los animales. Este aceite esencial se ha utilizado en medicina desde la antigüedad por sus efectos carminativo, antiséptico, estimulante y expectorante, entre otros.

Su actividad frente a microorganismos fitopatógenos es un campo menos estudiado, aunque en los últimos años se han realizado algunos estudios que demuestran sus propiedades antibacterianas (Pino et al., 2012).

Por otro lado, este extracto suele utilizarse en la formulación de insumos agrícolas con acción insecticida y en trampas debido a su poder atrayente de insectos, aumentando de esta forma la atracción de los insectos en cuestión y, por tanto, la eficacia del insecticida o la trampa.

Sin embargo, hasta el momento no existen referencias de la utilización de extractos de semilla de *Pimpinella anisum* L. en formulaciones agrícolas como inductor de la polinización, en lo cual se basa la presente invención.

Referencias

González, M.V.; Coque, M.; Herrero, M. 1995. Papillar integrity as an indicator of stigmatic receptivity in kiwifruit (Actinidia deliciosa). Journal of Experimental Botany. 46: 263-269.

Losada, J.M.; Herrero, M. Acta Nº 54. Receptividad estigmática en el corimbo de manzano. VI Congreso Ibérico De Ciencias Hortícolas. XII Congreso Nacional De Ciencias Hortícolas 2009.

Pino, O.; Sánchez, Y.; Rojas, M.M.; AbreuI, Y.; Correa, T.M. 2012. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Pimpinella anisum L. Revista de Protección Vegetal. 27(3): 181-187.

Sanzol, J.; Herrero, M. 2001. The “effective pollination period” in fruit tres. Scientia Horticulturae. 90: 1-17.

Sanzol, J.; Rallo, P.; Herrero, M. 2003. Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (Pyrus comunis; Rosaceae) flower. American Journal of Botany. 90(1): 78-84.

Descripción de la invención

La utilización del aceite o extracto de anís como inductor de la fecundación de flores en las plantas podría justificarse, en un primer momento, gracias al efecto atrayente que tendría sobre los insectos polinizadores, induciendo así un transporte de polen

desde las anteras hasta el estigma mucho más rápido. Este adelanto en la llegada del polen hasta el estigma evitaría que el polen alcanzara el estigma cuando ya está ocurriendo pérdida de receptividad estigmática. Con todo ello, se estaría induciendo una mejora en la polinización de las flores.

Paralelamente, se ha observado que la aplicación de formulaciones agrícolas conteniendo extracto de anís mejora la polinización en ausencia de insectos polinizadores. Aunque el mecanismo de acción no está claramente establecido, la justificación a este hecho habría que buscarla en una posible influencia de dicho extracto y concretamente del anetol, sobre los órganos implicados en la polinización, como podría ser una mejora en la disposición del estigma a ser alcanzado por el polen, o una influencia sobre las anteras, entre otros posibles factores.

Preferiblemente, la aplicación de caldos agrícolas conteniendo el extracto objeto de la presente invención se lleva a cabo vía foliar tras la aparición del botón floral.

Preferiblemente, la aplicación se lleva a cabo durante las épocas en las que se prevea poca polinización, como épocas con condiciones ambientales extremas (temperaturas, humedad, luz…).

Asimismo, se propone la aplicación del extracto objeto de la presente invención junto con insumos agrícolas que estimulen la floración en el momento previo a la floración.

Todo ello de acuerdo con las reivindicaciones que acompañan a la presente memoria descriptiva y que se incorporan aquí por referencia. Realizaciones particulares o preferidas de la invención se indican en las reivindicaciones dependientes, que igualmente se incorporan en esta memoria descriptiva por referencia a las mismas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que restrinjan la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí

indicadas.

Breve descripción de las figuras

A continuación se pasa a describir de manera muy breve una serie de dibujos que ayudan a comprender mejor la invención y que se relacionan expresamente con una realización de dicha invención que se presenta como un ejemplo no limitativo de ésta.

Figura 1. Porcentaje de abortos florales en dos zonas de 100 plantas de tomate pera, sin tratamiento y con aplicación de una formulación conteniendo extracto de anís.

Figura 2. Porcentaje de abortos florales en dos zonas de 9 naranjos variedad navelina, sin tratamiento y con aplicación de una formulación conteniendo extracto de anís.

Figura 3. Número medio de habas por planta en dos zonas de haba, sin tratamiento y con aplicación de una formulación conteniendo extracto de anís.

Figura 4. Producción (Kg/ha) en dos zonas de haba, sin tratamiento y con aplicación de una formulación conteniendo extracto de anís.

Exposición de un modo detallado de realización de la invención y ejemplos

<u>Ensayo 1. Aumento del cuaje de flor.</u>

Se realizaron ensayos para medir cuantitativamente el aumento de cuaje de flor gracias a la aplicación de formulaciones conteniendo el extracto objeto de la presente invención. Las medidas se realizaron sobre cultivos de tomates y naranjos.

- Cultivo: Tomate pera

Se preparó un caldo con una concentración del extracto a una dosis de 0.5 mL/L y fue aplicado vía foliar sobre un cultivo de tomate pera en invernadero. Se delimitaron dos zonas separadas con 50 plantas cada una, aplicándose la formulación en una de ellas y dejando la otra zona como testigo sin tratamiento.

El cuaje de flor se calculó a partir del porcentaje de abortos florales en las dos zonas

de estudio por conteo manual de dichos abortos. La figura 1 muestra que el porcentaje de abortos florales de la zona testigo fue muy superior a los correspondientes a la zona tratada con la formulación conteniendo extracto de anís. Los resultados indican un aumento en la tasa de cuaje de flores de un 19% en la zona de aplicación con respecto a la zona testigo sin tratamiento.

- Cultivo: Naranja navelina

Se repitió la experiencia anterior en una finca de naranjos variedad navelina en la cual se delimitaron dos zonas separadas de 9 frutales cada una de ellas. A una de las zonas se le aplicó una formulación con extracto de anís a una dosis de 0.5 mL/L vía foliar, dejando la otra zona como testigo sin tratamiento.

Se contaron los abortos florales en una rama de cada frutal, eligiendo aquellas ramas más similares por longitud, tamaño y posición dentro del árbol. Los resultados del porcentaje de abortos florales en cada zona se muestran en la figura 2, y a partir de ellos se calculó un aumento en la tasa de cuaje de flores en la zona tratada de un 5%.

<u>Ensayo 2. Aumento del peso específico de los frutos.</u>

- Cultivo: Tomate pera

Se midió el peso específico en frutos de tomate procedentes de las dos zonas delimitadas dentro del invernadero, zona testigo y zona de aplicación de la formulación. El peso específico se calculó en cada fruto en base a su masa (gramos) y al volumen del mismo, calculado considerando la fórmula correspondiente al volumen de un esferoide prolato.

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (diámetro\ ecualtorial^2) \cdot (diámetro\ polar)$$

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 1. Gracias a la utilización de la aplicación propuesta, los resultados muestran un aumento del peso específico de un 14% para el caso de los tomates pera.

	Peso medio del fruto (g)	Diám. ecuatorial (mm)	Diám. polar (mm)	Peso específico (g/cc)
Testigo	116	42.8	59.9	0.252
Aplicación	137	43.2	60.8	0.288

Tabla 1. Peso medio, diámetros ecuatorial y polar, y peso específico de tomates provenientes de plantas sin tratamiento (testigo) y de plantas tratadas con la formulación conteniendo aceite de anís (aplicación).

- Cultivo: Naranja navelina

Se midió el peso específico en frutos de naranjas procedentes de las dos zonas delimitadas de forma similar al ejemplo anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

	Peso medio del fruto (g)	Diám. ecuatorial (mm)	Diám. polar (mm)	Peso específico (g/cc)
Testigo	248	80.2	88.8	0.104
Aplicación	289	82.1	90.1	0.114

Tabla 2. Peso medio, diámetros ecuatorial y polar, y peso específico de naranjas provenientes de árboles sin tratamiento (testigo) y de árboles tratados con la formulación conteniendo aceite de anís (aplicación).

Según los valores de diámetro ecuatorial, las naranjas provenientes de árboles testigo y árboles tratados con la formulación estarían clasificadas como calibre 4 (diámetro ecuatorial, 77- 88 mm) según la Norma Codex para la naranja (CODEX STAN 245-2004). Sin embargo, aunque el calibre es el mismo, el peso específico fue un 10% superior en el caso de aquellas naranjas obtenidas de árboles tratados con la formulación.

<u>Ensayo 3. Aumento de la producción.</u>

- Cultivo: Tomate pera.

La producción del cultivo se midió en base a los Kg de fruto producidos por cada planta, y se compararon con la producción obtenida en plantas testigo sin tratamiento. El aumento de producción en la zona tratada se calculó mediante tres fórmulas:

- Aumento de producción neto:

$$Aumento\ producción\ 1\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - Kg/planta_{test}}{Kg/planta_{test}} * 100$$

- Aumento de producción teniendo en cuenta el aumento de peso específico de los frutos:

$$Aumento\ producción\ 2\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - (Kg/planta_{test} + 0.14 * Kg/planta_{test})}{(Kg/planta_{test} + 0.14 * Kg/planta_{test})} * 100$$

- Aumento de producción teniendo en cuenta el aumento de cuaje de flor y el aumento de peso específico de los frutos:

$$Aumento\ producción\ 3\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - (Kg/planta_{test} + 0.19 * Kg/planta_{test} + 0.14 * Kg/planta_{test})}{(Kg/planta_{test} + 0.19 * Kg/planta_{test} + 0.14 * Kg/planta_{test})} * 100$$

siendo:

Kg/planta$_{aplic}$, producción media obtenida por planta de tomate en la zona tratada con la aplicación.

Kg/planta$_{test}$, producción media obtenida por planta de tomate en la zona testigo.

Teniendo en cuenta los resultados de producción media en las plantas testigo (4.1 Kg) y en las plantas tratadas (5.5 Kg), se ha encontrado un aumento de producción según las tres fórmulas descritas anteriormente. Aumento de un 34% según la fórmula 1, de un 18% según la fórmula 2 y de un 1% teniendo en cuenta el aumento de cuaje y aumento de peso específico, lo que es debido a que se obtuvieron más frutos y de calibres más altos.

- Cultivo: Naranja navelina

En la naranja se encontró igualmente un aumento de producción según las tres fórmulas empleadas, corregidas en este caso para los resultados previos en este cultivo.

- Aumento de producción neto:

$$Aumento\ producción\ 1\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - Kg/planta_{test}}{Kg/planta_{test}} * 100$$

- Aumento de producción teniendo en cuenta el aumento de peso específico de los frutos:

$$Aumento\ producción\ 2\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - (Kg/planta_{test} + 0.10 * Kg/planta_{test})}{(Kg/planta_{test} + 0.10 * Kg/planta_{test})} * 100$$

- Aumento de producción teniendo en cuenta el aumento de cuaje de flor y el aumento de peso específico de los frutos:

$$Aumento\ producción\ 3\ (\%) = \frac{Kg/planta_{aplic} - (Kg/planta_{test} + 0.05 * Kg/planta_{test} + 0.10 * Kg/planta_{test})}{(Kg/planta_{test} + 0.05 * Kg/planta_{test} + 0.10 * Kg/planta_{test})} * 100$$

siendo:

Kg/planta$_{aplic}$, producción media de naranjas obtenida por frutal en la zona tratada con la aplicación.

Kg/planta$_{test}$, producción media de naranjas obtenida por frutal en la zona testigo.

Se encontraron aumentos de producción del 12% según la primera fórmula, del 2% según la segunda y del 1% según la tercera. En este caso, el incremento de calibres es más complicado y ello se ha traducido en un menor aumento en la producción.

<u>Ensayo 4. Aumento de cuajes y producción en habas.</u>

El presente ensayo se llevó a cabo en una parcela de habas, en la cual se marcaron dos zonas de ensayo diferenciadas. Una de ellas se dejó como zona testigo y en la segunda se realizó una aplicación de una formulación con extracto de anís a una dosis de 0.5 mL/L vía foliar.

El estudio se orientó a determinar el número de flores y cuajes por planta, así como la

producción final de cada zona, para lo cual se procedió a un muestreo aleatorio en zig-zag, analizando 10 plantas en cada una de las dos zonas de ensayo marcadas.

La figura 3 muestra el número de habas recogidas en cada una de las plantas muestreadas en las dos zonas de ensayo. Puede observarse que mientras en la zona testigo el número de habas medio por planta es de 3.4, en la zona a la cual se ha aplicado el extracto objeto de la presente invención el número de habas medio por planta ha sido de 6.5.

Este resultado vuelve a confirmar que la aplicación del aceite de anís aumenta el cuaje de flor de las plantaciones, lo que se traduce en un mayor número de frutos por planta.

Se midió en último lugar la producción de ambas zonas marcadas, encontrándose los resultados que se muestran en la figura 4.

Los resultados muestran que la aplicación del extracto objeto de la presente invención ha aumentado el número de cuajes, lo que se traduce en mayor número de habas por plantas y finalmente un aumento en la producción de un 45%.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de semilla de *Pimpinella anisum* L. en composiciones o formulaciones agrícolas como inductor de la polinización.
2. El uso de un extracto de semilla de *Pimpinella anisum* L. de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la aplicación del extracto o de una formulación agrícola conteniendo éste por vía foliar tras la aparición del botón floral.
3. El uso de un extracto de semilla de *Pimpinella anisum* L. de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la aplicación del extracto o de una formulación agrícola conteniendo éste junto con compuestos agrícolas que estimulen la floración en el momento previo a la floración.

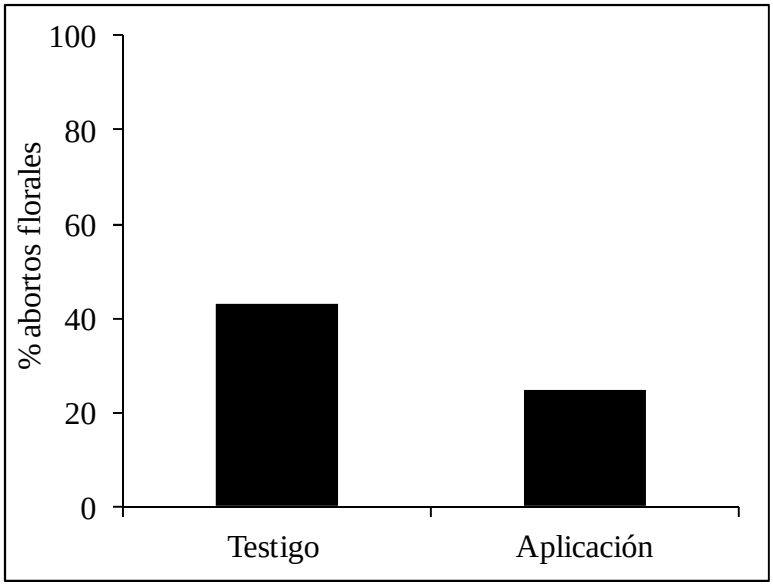


FIGURA 1

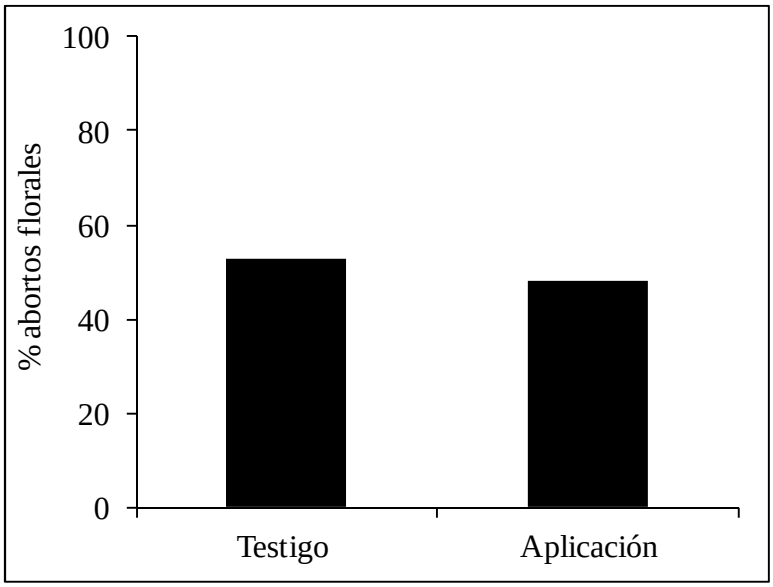


FIGURA 2

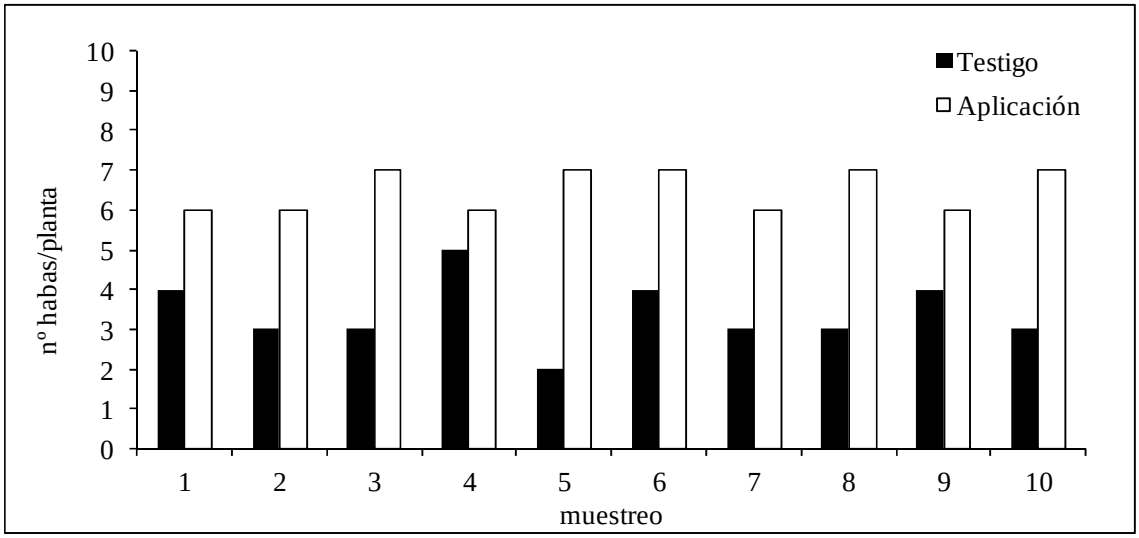


FIGURA 3

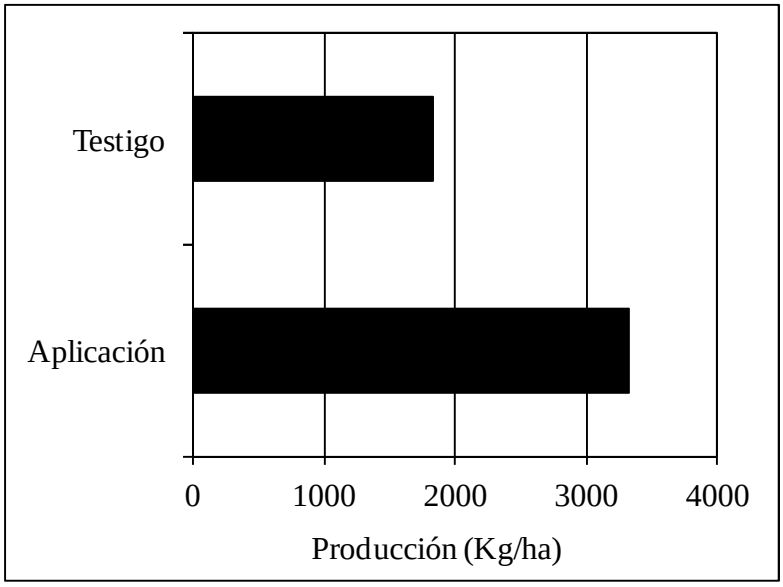


FIGURA 4

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201531382

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2015

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A01N65/10*** (2009.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WALLER G D. ATTRACTING HONEYBEES TO ALFALFA WITH CITRAL, GERANIOL AND ANISE. *Journal of Apicultural Research*.1970. VOL: 9 No: 1 Paginas: 9-12, table 1	1-3
A	YUE JIANJUN et al. Pollination activity *of Elaeidobius kamerunicus* (Coleoptera: Curculionoidea) on oil Palm on Hainan island. Florida Entomologist. JUN 2015 VOL: 98 No: 2 Paginas: 499-505, resumen	1-3
A	MAYER D F et al. FIELD EVALUATION OF CHEMICAL POLLINATOR ATTRACTANTS ON TREE FRUITS. *American Bee Journal*. 1982. VOL: 122 No: 4 Paginas: 287-289, resumen	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
20.09.2016	I. Rueda Molíns	1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.09.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1 y 2	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-3	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WALLER G D. ATTRACTING HONEYBEES TO ALFALFA WITH CITRAL, GERANIOL AND ANISE. *Journal of Apicultural Research*. VOL: 9 No: 1 Paginas: 9-12, table 1	1970

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 Ley 11/1986)

Se considera que el documento D01 es el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la solicitud. Este documento afecta a la patentabilidad de las reivindicaciones tal y como se expondrá a continuación:

Reivindicaciones 1-3

En el documento D01 se describe un estudio de diferentes sustancias que producen un efecto atrayente para las abejas en el cultivo de alfalfa (se incluyen entre paréntesis referencias al documento D01):

El documento D01 indica como diferentes composiciones que contienen anís rociadas en cultivos de alfalfa, en época de floración (página 10) producen un efecto atrayente para las abejas (tabla 1).

La información divulgada en el documento D01 coincide con el objeto de invención reivindicado en las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud de patente. Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad, según el artículo 6 de la Ley 11/1986.

La diferencia entre el contenido del documento D01 y el objeto de la reivindicación 3 es que en dicha reivindicación la composición agrícola contiene además compuestos agrícolas que estimulen la floración, para aplicarse en el momento previo a la floración. A partir de la información que muestra el documento D03 resultaría evidente, para un experto en la materia, el objeto de la reivindicación 3. Por tanto, se considera que la reivindicación 3 presenta falta de actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley 11/1986.