

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 137**

21 Número de solicitud: 201631404

51 Int. Cl.:

**A01N 31/16** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.11.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.06.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070724**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**C/ Serrano, nº 117**

**28006 Madrid ES y**

**TECNOFOOD ID SOLUCIONES, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Guillermo;**

**FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, Juan;**

**GARCÍA BORREGO, Aránzazu;**

**ESPEJO CALVO, Juan Antonio;**

**ROJANO DELGADO, Antonia M. y**

**FERNÁNDEZ PRIOR, María África**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DEL 3,4-DIHIIDROXIFENILGLICOL (DHFG) COMO FITORREGULADOR**

57 Resumen:

Uso del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador.

La presente invención se refiere al uso del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), composiciones que lo comprendan y métodos de uso de los mismos como fitorreguladores efectivos para el tratamiento de cultivos y malas hierbas.

ES 2 671 137 A1

**USO DEL 3,4-DIHIIDROXIFENILGLICOL (DHFG) COMO FITORREGULADOR**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención puede englobarse en el campo de la bioquímica o fisiología vegetal y agricultura. Se refiere al uso del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), composiciones que lo comprendan y métodos de uso de los mismos, como fitorreguladores efectivos para potenciar el crecimiento de cultivos, así como para controlar el crecimiento de las malas hierbas.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 Las plantas sintetizan reguladores de crecimiento endógenos que participan de forma esencial en su fisiología por lo que gran parte de las prácticas agronómicas actuales incluyen el uso de compuestos, en su mayoría sintéticos, con propiedades análogas a estos reguladores, para modificar el metabolismo y así incrementar el rendimiento de los cultivos, y/o la calidad de los frutos, así como eliminar las malas hierbas. Por esta razón, los fabricantes de agroquímicos se encuentran en una constante búsqueda de vías para obtener nuevos o mejores compuestos y métodos para regular el metabolismo de las plantas y en consecuencia incrementar los rendimientos de los cultivos.

20

Muchos de los reguladores de crecimiento, incluyen compuestos como los ácidos carboxílicos, análogos de azúcares y aminos que tienen capacidad de inducir diversos efectos en las plantas (Alexieva, 1994, Compt. Rend . Acad . Bulg . Sci. 47, 779-82). En el cultivo del maíz se ha demostrado que los tratamientos con ácidos polihidroxicarboxílicos incrementan el crecimiento de la raíz (Gur *et al*, 1987, Physiologia Plantarum. 69, 633-638) y la formación de pelos radicales, lo que favorece una mejor absorción de nutrientes.

25

30

En relación al potencial fitorregulador de las aminos se sabe que afectan a procesos esenciales de las plantas como la floración, germinación, el crecimiento y la senescencia de las hojas, entre otros. (Shih *et al*, 1982, I. Plant. Physiol. 70, 1592-1596). De manera interesante, estudios han establecido que ciertas aminos con efecto regulador del crecimiento de plantas, pueden afectar también el desarrollo y fisiología de hongos fitopatógenos (Havis *et al*, 1997, J. Agric. Food . Chem. 45, 2341-2344). De

35

la misma manera, se ha reportado que los análogos de azúcares pueden interferir en el crecimiento de hongos, reduciendo los daños que estos puedan causar (El Gaouth *et al*, 1995, Plant. Dis. 79, 254-278).

5 Otro tipo de moléculas con capacidad fitorreguladora son los derivados nitrados de ácidos fenólicos, particularmente el o-nitrofenolato, el p-nitrofenolato y el 5-nitroguayacolato (Górnik y Grzesik, 2005, Folia Horticulturae. 17, 119-127). Aunque estos compuestos también tienen capacidad de afectar el desarrollo de hongos fitopatógenos, su uso ha sido restringido solo al de fitorreguladores para limitar su  
10 dosis debido a riesgos potenciales. (Diario Oficial de la Unión Europea, 19.2.2009, 48/5-48/12).

Sin embargo, la proliferación y el uso indiscriminado de fitorreguladores sintéticos han ocasionado que la normativa agrícola se vea obligada a restringir el empleo de  
15 compuestos químicos que provoquen alteraciones y disfunciones hormonales en los cultivos o que resulten tóxicos. Asimismo, el uso intensivo de pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades, ha ocasionado que los organismos causales desarrollen resistencia, obligando al uso de dosis cada vez mayores o el desarrollo de productos más tóxicos. Estos aspectos incrementan el nivel de riesgo sobre la salud  
20 de los ecosistemas, la salud de los agricultores y el consumidor final.

Así, en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fitorreguladora, se ha dirigido la investigación a la obtención de biomoléculas/extractos de interés a partir de subproductos de la agroindustria, con el objeto de revalorizar dichos subproductos y  
25 minimizar el impacto medioambiental, y permitir el desarrollo de una nueva industria biotecnológica cercana y/o dependiente de la agroindustria proveedora de la fuente de los subproductos. Por otro lado, se ha aplicado técnicas biotecnológicas, a través de *screening* de bioactividades *in vitro* en laboratorio e *in vivo* a través de ensayos de campo, de dichas biomoléculas extraídas, para el diseño posterior de fitorreguladores  
30 naturales (antimicrobianos, antifúngicos, insecticidas, acaricidas y anti-germinativos para el control de malas hierbas), destinados para su uso fundamentalmente en los sectores de agricultura ecológica y producción integrada, que presentan actualmente más demanda, pero también en agricultura convencional con el objeto de reducir la aplicación de fitosanitarios procedentes de síntesis química.

35

Por tanto, es importante el desarrollo de biomoléculas y/o extractos que las comprendan como nuevos fitorreguladores, no tóxicos o de baja toxicidad, encaminadas a incrementar la producción de los cultivos.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para solucionar las limitaciones mencionadas anteriormente, es objeto general de la invención proveer el uso de un compuesto, preferentemente obtenido como subproducto de la industria, más preferentemente de la industria del aceite de oliva y/o de la industria de la aceituna de mesa, una composición que lo comprenda, y un método para su uso como un fitorregulador efectivo.

Los inventores han demostrado por un lado que el 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) es un efectivo fitorregulador, tanto para el control de la germinación y crecimiento de cultivos agrícolas, así como un potente herbicida frente a las malas hierbas. Además, por otro lado, los inventores han demostrado que este fenol es un componente importante en la fracción fenólica de los subproductos de la aceituna, tanto en la industria del aceite de oliva como de la industria de la aceituna de mesa pudiendo así favorecer el aprovechamiento y reciclado de dichos subproductos. En este sentido, la presente invención demuestra que el DHFG es un compuesto denominado aleloquímico dado que proporciona beneficios, sobre todo competitivos, en plantas, principalmente dirigidos a un incremento sobre la germinación, crecimiento o desarrollo, y por otro lado, también es capaz de inducir efectos negativos sobre otras plantas, preferentemente malas hierbas, inhibiendo su germinación e impidiendo el crecimiento de las mismas. A estas sustancias que presentan dicha dualidad se les denomina, como hemos mencionado anteriormente, aleloquímicos. Dicha definición abarca tanto los efectos perjudiciales como los beneficiosos. Es necesario puntualizar que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos beneficiosos a muy bajas concentraciones y, superado un determinado umbral, actúan negativamente.

Por tanto, el uso del DHFG, o de un extracto rico en dicho compuesto, es decir que comprenda una concentración mínima de al menos 1 ppm de DHFG, o alternativamente de entre 0.001-50 g/L de DHFG, obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva (alpechines, aguas de decantación, aguas de centrifuga vertical, aguas de lavado, alperujo, orujo, agua de alperujo, etc..) y/o de la industria de aderezo de la aceituna, también conocida como la industria de la

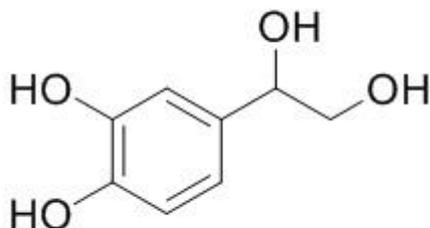
aceituna de mesa (agua de cocido, aguas de lavado, salmueras, líquidos de conservación, etc.) como fitorregulador presenta las siguientes ventajas:

- 5           ➤ Al ser un producto natural y que puede ser obtenido de forma física no es tóxico, no contamina, y no genera resistencias en los cultivos, y menos a las concentraciones activas.
- Presenta una alta efectividad como herbicida cuando se usa en un rango de concentraciones de entre 100 ppm a 50000 ppm de DHFG (mg DHFG en 1 kg de producto).
- 10       ➤ Presenta una alta efectividad como bioestimulante de la germinación y crecimiento de los cultivos cuando se usa en un rango de concentraciones de entre 1 a 1500 ppm de DHFG.
- Aprovechamiento de subproductos de la industria almazarera y/o de la aceituna de mesa para conseguir un mayor valor añadido a los mismos.

15       Así, un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador.

A efectos de la presente invención el término fitorregulador se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir el crecimiento de plantas, preferentemente cultivos  
20 agrícolas. A efectos de la presente invención, dicho término también hace referencia a aquéllos compuesto que son capaces de inhibir el crecimiento de malas hierbas, teniendo por tanto actividad herbicida.

El 3,4 DHFG es un compuesto perteneciente al grupo de los fenoles y forma parte de  
25 la familia de los glucósidos fenilpropanoides. El número de CAS del DHFG es: 28822-73-3; y su fórmula:



En una realización particular, el compuesto DHFG descrito en la presente invención  
30 como fitorregulador, puede obtenerse a partir de subproductos derivados de la

extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna. En otra realización más particular, el extracto rico en DHFG obtenido de los subproductos comprende al menos una composición/concentración de DHFG de al menos 1 ppm (mg/kg).

5

A efectos de la presente invención el término “extracto rico en DHFG” se refiere a subproductos obtenidos de la industria de la extracción de aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, mezcla de dichos subproductos o fracciones obtenidas a partir de los subproductos o de sus mezclas, que comprende al menos 10 ppm de DHFG, preferentemente de 1 a 50000 ppm, o alternativamente de entre 0.001-50 g/L de DHFG.

10

En otra realización más preferida, la actividad fitorreguladora del uso del DHFG se selecciona entre actividad herbicida frente a malas hierbas o actividad bioestimulante/potenciadora del crecimiento de cultivos agrícolas.

15

A efectos de la presente invención el término herbicida se refiere a cualquier compuesto químico capaz de controlar o eliminar especies vegetales indeseadas.

20

En otra realización más preferida, el compuesto DHFG muestra actividad herbicida cuando se utiliza a una concentración de entre 100 a 50000 ppm, más preferentemente de entre 500 a 9000 ppm.

25

A efectos de la presente invención el término potenciador del crecimiento de cultivos o bioestimulante se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir el crecimiento de plantas e incrementar el rendimiento de los cultivos en general.

30

En otra realización más preferida, el compuesto DHFG muestra actividad potenciadora del crecimiento de los cultivos agrícolas cuando se utiliza a una concentración de entre 1 a 1500 ppm, más preferentemente de entre 1 a 500 ppm.

En otra realización preferida, el DHFG se usa en combinación con al menos un adyuvante.

35

A efectos de la presente invención el término adyuvante se refiere a sustancias químicas que ayudan a mejorar las características y propiedades de un compuesto o

sustancia química, de modo que la composición final no sea tóxica ni contaminante. Éstos pueden ser cualquier adyuvante que esté autorizado para su uso en formulaciones fitorreguladoras, pero preferiblemente se seleccionan de adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos. El adyuvante será cualquiera de los conocidos por el experto medio en la materia y utilizados en el campo técnico de la invención.

5

10

En una realización más preferida los adyuvantes se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: araoil, biopower y/o cualquier combinación de los mismos. En otra realización más preferida aún, los adyuvantes se utilizan a las concentraciones determinadas por los fabricantes de los mismos.

15

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un extracto obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que dicho extracto comprende una concentración de DHFG de al menos 1 ppm, preferentemente de entre 1 a 50000ppm o alternativamente de entre 0.001 a 50 g/L.

20

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una composición fitorreguladora que comprende DHFG, preferentemente a las concentraciones indicadas anteriormente, y/o un extracto según se ha descrito anteriormente.

25

En otra realización preferida, la composición fitorreguladora comprende además al menos un adyuvante. En otra realización más preferida, el adyuvante, tal y como se ha indicado anteriormente se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en: adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos. En otra realización más preferida, el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de los siguientes: araoil y/o biopower.

30

35

En otra realización preferida, la composición fitorreguladora de la invención presenta actividad herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 100 a 50000 ppm, preferentemente de entre 500 a 9000 ppm. En otra realización preferida, la

composición fitorreguladora de la invención presenta actividad bioestimulante del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 1500 ppm, preferentemente de entre 1 a 500 ppm.

5 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método para el control de las malas hierbas que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG, o del extracto, o de la composición fitorreguladora, según se ha descrito previamente.

10 A efectos de la presente invención, el término "dosis efectiva", se refiere a una cantidad no tóxica del compuesto DHFG, tal y como se describe en el presente documento, que es suficiente para proporcionar el efecto deseado en los cultivos, por ejemplo, inhibir el crecimiento de malas hierbas o potenciar el crecimiento de los cultivos. La cantidad precisa y eficaz para cada tipo de actividad dependerá del tipo de  
15 cultivo, de la extensión a tratar, así como del tipo de administración utilizada. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad exacta efectiva por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada puede determinarse por la experimentación de rutina y está dentro del criterio del experto medio en la materia.

20 A efectos de la presente invención, una dosis efectiva, cuando se quiera obtener una actividad herbicida será de alrededor de 100 a 50000 ppm, preferentemente entre 500 a 9000 ppm de DHFG, y una dosis efectiva cuando se quiere obtener una actividad potenciadora del crecimiento, será de alrededor de 1 a 1500 ppm, preferentemente entre 1 a 500 ppm de DHFG.

25 En una realización preferida, las malas hierbas se seleccionan entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. En otra realización más preferida aún, las malas hierbas monocotiledóneas son preferentemente: *Lolium rigidum*; *Lolium multiflorum*, y las malas hierbas dicotiledóneas son preferentemente: *Sinapis arvensis*,  
30 *Chenopodium álbum* y *Stellaria media*.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método para inducir el crecimiento de los cultivos que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva del DHFG, o del extracto, o de la composición fitorreguladora, según se ha descrito  
35 previamente.

En una realización preferida, los cultivos se seleccionan de entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. En otra realización más preferida aún, las monocotiledóneas son preferentemente Gramíneas, más preferentemente *Triticum aestivum* (Trigo blando), Liliáceas, más preferentemente *Allium cepa* (Cebolla var. Galaxia). En otra realización más preferida, las dicotiledóneas son preferentemente Cruciferaes, más preferentemente *Lepidium sativum* L. (Berro de agua); compositaes, más preferentemente *Lactuca sativa* L. (Lechuga var. Cervantes); solanaceaes, más preferentemente *Lycopersicum esculentum* L. (Tomate var. Tres cantos), *Solanum tuberosum* L. (Patata var. Red Reponiac), *Solanum melongena* L. (Berenjena var. Redonda Lisa) y *Capsicum* L. (Pimiento var. Italiano); Cucurbitaceaes, más preferentemente *Cucumis sativus* L. (Pepino var. Bellpuig), *Cucurbita pepo* L. (Calabacín var. Diamante) y *Citrullus lanatus* L. (Sandía var. Meridian); y Asparagaceaes, más preferentemente, *Asparagus officinalis* L. (Espárrago var. Atlas).

En una realización preferida de cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, la administración del compuesto DHFG, del extracto y/o de la composición fitosanitaria se administra vía aspersion, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido, dependiendo de los resultados esperados. En otra realización más preferida aún, una vez administrado el compuesto, éste podrá llevar a cabo una liberación rápida o lenta, preferiblemente lenta.

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 se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EJEMPLOS

30

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### **Ejemplo 1. Obtención del compuesto DHFG y/o de un extracto rico en el mismo.**

35

A partir de un subproducto recogido en la industria del aceite de oliva como es el alperujo se genera, tras su almacenamiento, lo que se denominan aguas de alperujo, que fueron usadas en la preparación de extractos y/o concentrados para su caracterización química y fitorreguladora. Estas muestras de agua de alperujo se obtuvieron de cooperativas sitas en Palenciana (Córdoba) y Marchena (Sevilla). Se analizó su contenido fenólico y se determinó que tenía una buena proporción de HT y DHFG, por lo que se puede considerar una fuente a tener en cuenta para la extracción de polifenoles.

El procedimiento de extracción de los polifenoles a nivel industrial se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la patente EP1369407B1. Dicha extracción se ha llevado a cabo exclusivamente mediante métodos físicos, sin utilización de disolventes orgánicos, por lo que, tanto el extracto como el polifenol descrito en la presente invención, DHFG, son aptos para su uso en cultivos ecológicos. Una descripción breve de la tecnología utilizada para obtener los extractos fenólicos de la presente invención se describe a continuación.

Se partió de un volumen de 100 L de alpechín fresco recogido en la campaña 2013/2014, cuyo contenido en los polifenoles de interés es relativamente alto, con una concentración de HT de 2.45 g/L y de DHFG de 0.27 g/L entre otros, cuantificadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV). El equipo de extracción está constituido por tres columnas cromatográficas y un equipo de tratamiento de agua con los que se consigue extraer y purificar tres tipos distintos de extractos: un extracto rico en DHFG, otro rico en HT y un tercer extracto que es mezcla de los dos anteriores (HT+DHFG). Se estableció un ciclo de trabajo que comprende varios pasos que se detallan de la siguiente forma:

1. Se carga la primera columna (C.C1) con un volumen fijo de la fuente de fenoles dejándolo caer por gravedad sobre la resina.
2. Tras la carga se procede al lavado con agua de dicha columna previo a la elución.
3. La descarga de la columna se puede realizar en dos pasos, y en cada uno se obtiene un extracto distinto.
  - 3.1. En una primera fase se obtiene una mezcla de HT y DHFG con una relación 10: 1 de ambos respectivamente.
  - 3.2. En una segunda fase se recoge un extracto rico en HT.

4. Para la purificación y la separación del extracto rico en DHFG se hicieron pasar ciertas fracciones obtenidas anteriormente por una segunda columna cromatográfica (C.C2). Y, tras una serie de eluciones con agua se obtuvieron fracciones que se pudieron concentrar incluso hasta sequedad empleando equipos de concentración o evaporación con o sin vacío. Con ello se obtienen extractos finales con una alta actividad biológica.

Las fracciones obtenidas de la columna cromatografía C.C2 se purificaron con la ayuda de una tercera columna cromatográfica (C.C3). De este paso se obtuvieron distintas fracciones de las cuales se eligió la más rica en DHFG en función a su perfil cromatográfico, escogiendo aquellas fracciones en donde la señal de DHFG era la mayoritaria (concentraciones de entre 0.001 y 50 g/L), para conseguir los extractos finales de este compuesto utilizados en los ejemplos que se describen a continuación. Dichos extractos se prepararán a diferentes pHs y diferentes concentraciones para analizar su efectividad como fitorreguladores.

Una vez obtenidos los tres extractos antes mencionados:

(1) extracto rico en HT (10-50000 ppm) con varios grados de pureza, 50 y 99,8 % referido a peso seco;

(2) extracto rico en DHFG (1-50000 ppm) con varios grados de pureza, 50 y 99,6 % referido a peso seco; y

(3) extracto mezcla que comprende HT + DHFG (en las concentraciones anteriores),

se procedió a analizar la actividad de los mismos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos en cámara de crecimiento controlada y en campo utilizando especies de mono y dicotiledóneas para controlar el efecto de dichos compuestos sobre distintas etapas del desarrollo, específicamente en las etapas de pre-emergencia o germinación; post-emergencia temprana o desarrollo del estadio de plántula; y post-emergencia tardía o desarrollo de la planta hasta la etapa de producción; de las plantas analizadas.

**Ejemplo 2. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de pre-emergencia, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**

Placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo discos de papel de filtro recibieron un volumen de 4 a 8 ml (según la especie de planta ensayada) de una solución

conteniendo distintas dosis del compuesto fenólico de interés aislado con un alto grado de pureza, superior al 99%, HT, DHFG y HT+DHFG, que oscilaron entre 0 y 400 ppm (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm), y sobre las que finalmente se incorporaron 15 semillas de cada uno de los cultivos y plantas ensayadas. Se hicieron tres repeticiones de cada ensayo y para cada concentración que contenían las 15 semillas cada una para evitar el aglutinamiento en placa y así poder estudiar también la radícula. Como control negativo se utilizaron placas de Petri en las que únicamente se añadió agua destilada; y como control positivo se utilizó un herbicida de referencia el Flazasulfuron (FZS) que actúa tanto frente a cultivos de plantas mono y dicotiledóneas, a las mismas dosis utilizadas para cada uno de los compuestos fenólicos (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm).

Las placas sembradas se incubaron en una cámara de crecimiento controlada (Fitotron; Weiss Technik; Reino Unido) con las siguientes condiciones: temperatura día/noche de 27/18°C; fotoperiodo de 14h; y 580  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz; durante un período de 5 a 10 días, según especies. Transcurrido dicho tiempo, se cuentan las semillas que han germinado con éxito y se miden las raíces, para así calcular el índice de germinación, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IG} = [(\% \text{GMxLM})/(\% \text{GCxLC})] \times 100;$$

dónde: IG = índice de germinación; % GM = porcentaje de semillas germinadas de la muestra (extracto); % GC = porcentaje de semillas germinadas del control negativo (agua destilada); LM = longitud media de las raíces de las semillas de la muestra y LC = longitud media de las raíces de las semillas del control negativo.

Adicionalmente, también se analizaron las variables: número de semillas germinadas, longitud de plúmula (donde sea necesario), raíces (longitud y número), peso seco y peso húmedo.

Las especies de malas hierbas utilizadas en estos ensayos se indican en la Tabla 1, y las especies de cultivos agrícolas ensayadas se indican en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Especies de malas hierbas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<i>Lolium rigidum</i> (resistencia a inh-EPSPS –R a glifosato–)	<i>Sinapis arvensis</i>
<i>Lolium rigidum</i> (resistencia múltiple a inh- ACCasa y ALS–R a ACCasa y a ALS–)	<i>Chenopodium álbum</i>
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Stellaria media</i>

**Tabla 2.** Especies de cultivos agrícolas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
Graminaea: ▪ <i>Triticum aestivum</i> (Trigo blando)	Cruciferae: ▪ <i>Lepidium sativum</i> L. (Berro de agua)
Liliaceae: ▪ <i>Allium cepa</i> (Cebolla var. <i>Galaxia</i> )	Compositae: ▪ <i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga var. <i>Cervantes</i> )
	Solanaceae: ▪ <i>Lycopersicon esculentum</i> L. (Tomate var. <i>Tres cantos</i> ), ▪ <i>Solanum tuberosum</i> L. (Patata var. <i>Red Repontiac</i> ), ▪ <i>Solanum melongena</i> L. (Berenjena var. <i>Redonda Lisa</i> ) ▪ <i>Capsicum</i> L. (Pimiento var. <i>Italiano</i> )
	Cucurbitaceae: ▪ <i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino var. <i>Bellpuig</i> ) ▪ <i>Cucurbita pepo</i> L. (Calabacín var. <i>Diamante</i> ) ▪ <i>Citrullus lanatus</i> L. (Sandía var. <i>Meridian</i> )
	Asparagaceae: ▪ <i>Asparagus officinalis</i> L. (Espárrago var. <i>Atlas</i> )

Con los valores obtenidos para cada una de las variables analizadas se han construido curvas de porcentaje de germinación en función de las concentraciones utilizadas de los compuestos HT, DHFG y de la mezcla de ambos. Los resultados obtenidos dan idea de la diferencia de concentraciones que soportan cada una de las especies ensayadas y de la dosis que en suelo inhiben su germinación.

Los datos que se muestran a continuación recogen los valores necesarios para alcanzar la dosis máxima 90 (LD90) que hace referencia al grado de toxicidad de una sustancia indicando que el 90% de la población tratada con dicha sustancia muere, así como las dosis de cada extracto que indujo el crecimiento de las plantas.

**Tabla 3.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las malas hierbas cultivadas en presencia de los diferentes extractos expresados en ppm de ingrediente activo. Valores > implica que no se ha alcanzado el LD90. Cuando aparecen dos dosis significa que se han obtenido resultados para ambas dosis.

Especies de malas hierbas	LD90			Dosis activadora del crecimiento		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. rigidum</i> (inh-EPSPS)	350	100, >1000	250		50	
<i>L. rigidum</i> (inh-ACCasa y ALS)	1720	50-100 3420	710			
<i>S. arvensis</i>	350	100	300			
<i>C. álbum</i>	1800	125 >4000	710			

En el caso particular de la mala hierba de la especie *Lolium rigidum* (resistente a glifosato), se observa una mayor efectividad como antigerminativo o herbicida del DHFG frente al HT y a la mezcla de ambos. La dosis de 100 ppm de DHFG produce una reducción de la germinación de hasta el 90% frente a las dosis necesarias de los otros compuestos ensayados, 350 ppm para el caso del HT y 250 ppm para el caso de la mezcla de HT+DHFG. El hecho de que exista un pico de máxima efectividad a la dosis de 100 ppm de DHFG, y que a dosis mayores desaparezca esa efectividad,

apareciendo de nuevo a dosis muy elevadas (>1000 ppm), sugiere un mecanismo de degradación en radicales activos que son los causantes de esos picos. Por otra parte, el incremento de germinación y de masa foliar de dicho cultivo a dosis ligeramente superiores de 100 ppm de DHFG sugiere que dicho compuesto tiene una naturaleza hormonal tal y como ocurre con herbicidas de tipo auxínicos. La acción herbicida del HT solo aparece a dosis relativamente altas del compuesto. La mezcla HT+DHFG presenta un incremento de masa foliar a 50 ppm lo que implica que hay carácter hormonal de crecimiento.

10 En los ensayos llevados a cabo para la especie *Lolium rigidum* (R a ACCasa y a ALS) se demostró que una dosis de DHFG de 3420 ppm fue capaz de reducir la germinación de dicha especie en un 90%, mientras que las LD90 para HT y para la mezcla de HT+DHFG fueron de 1720 ppm y 710 ppm, respectivamente. Todas las dosis de los compuestos a las que se obtuvo la LD90 son muy altas y no son útiles para el control del crecimiento de dicha mala hierba. Sin embargo, se observó que a la 15 dosis de 1320 ppm de DHFG se produjo una reducción del peso del 90%. Otro aspecto curioso es que se vuelve a repetir el efecto inhibitorio del crecimiento a dosis bajas de 50-100 ppm de DHFG. Estos resultados ponen de manifiesto que aunque el DHFG controla el crecimiento de la planta *Lolium rigidum* (resistente a ACCasa y a ALS), dicho control no es tan efectivo como el llevado a cabo en el caso de la planta *Lolium rigidum* (resistente a glifosato).

En el caso de la especie *Sinapis arvensis*, ésta tuvo problemas de germinación por lo que se procedió a utilizar el ensayo topográfico de tetrazolio (Moore R.P. *Int Seed Testing Ass Proc.* 1969; 34:233). En dicho método se tiñen de rojo las células vivas mediante la reducción de una sal de tetrazolio, que es incolora, para formar un formazán rojo. Se hace hincapié en la necesidad de conocer la viabilidad de las distintas partes del embrión para predecir el desarrollo de embriones y su conversión en gérmenes que se puedan contar (Moore R.P. *Viability of sedes.* 1973:94-113). En el caso de *S. arvensis*, tal y como se observa en la Tabla 3, aparentemente parece resistir dosis mayores de los compuestos. Sin embargo, el DHFG presenta el mismo patrón de actuación que en la monocotiledónea anteriormente estudiada (*L. rigidum*). Cuando se cultivó esta planta en presencia de cada uno de los compuestos estudiados, se observó que los hongos proliferaban en mayor medida en presencia de HT y en menor medida con la mezcla HT+DHFG, poniendo de manifiesto que el HT induce el crecimiento de hongos.

En el caso de la especie *C. álbum*, tal y como se observa en la Tabla 3, la mezcla de HT+DHFG es más efectiva como herbicida frente a dicha especie que cualquier otro compuesto, ya que la mezcla es capaz de reducir en un 90% la germinación de *C. álbum* a una menor dosis (710 ppm), que la utilizada en el caso de DHFG (>4000 ppm) o HT (1800 ppm). Aunque sí es cierto que a la dosis de 125 ppm de DHFG se produce una considerable reducción de la germinación seguida de una disminución en las variables a estudiar. Sin embargo, a dicha dosis de 125 ppm de DHFG no se alcanza la dosis letal LD90, la cual asegura un control seguro de la especie.

10

Cuando dichos cultivos de malas hierbas fueron tratados con las diferentes dosis del herbicida flazasulfuron (las mismas que los compuestos fenólicos estudiados, tal y como se ha indicado anteriormente) se demostró que dicho compuesto es muy efectivo en el tratamiento de las malas hierbas, tanto para mono como dicotiledóneas, obteniéndose un LD90 de 90 ppm con dicho herbicida.

15

Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que el uso de DHFG muestra actividad herbicida siendo capaz de controlar el crecimiento de las malas hierbas *L. rigidum* (inh- EPSPS), *L. rigidum* (inh- ACCasa y ALS), *S. arvensis* y *C. álbum*, cuando se usaron a dosis similares a las empleadas con el herbicida flazasulfuron.

20

Posteriormente se llevó a cabo el mismo ensayo pero en cultivos de interés agrícola. En la Tabla 4 se muestran los valores de concentración expresados en ppm de cada uno de los compuestos analizados para alcanzar la LD90, así como las dosis de cada extracto que indujeron el crecimiento de los cultivos de interés agrícola.

25

**Tabla 4.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las diferentes especies de interés agronómico ensayadas con los diferentes compuestos expresados en ppm de ingrediente activo. Valores > implica que no se ha alcanzado el LD90.

30

Especies	LD90			Dosis activadora del crecimiento (ppm)		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. sativa L.</i>	7500	>4000	3000		100	
<i>L. esculentum L.</i>	460	3560	460			
<i>S. tuberosum L.</i>	1790	>4000	>12000		200	

Especies	LD90			Dosis activadora del crecimiento (ppm)		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>S. melongena</i> L.	1290	3890	780			
<i>Capsicum</i> L.	1420	978	970			
<i>C. sativus</i> L.	3700	>4000	1760			
<i>C. pepo</i> L.	6790	>4000	1720			
<i>C. lanatus</i> L.	480	1970	490			
<i>A. officinalis</i> L.	7860	>4000	375			
<i>A. cepa</i>	1375	>4000	495			
<i>T. aestivum</i>	750	>4000	3000	100	500	100

Los resultados mostrados para la especie *Triticum aestivum* frente a las diferentes dosis de los compuestos ensayados pusieron de manifiesto que el HT afecta a la germinación de dicha especie desde la dosis 500 ppm, pero se comporta como un compuesto “sucio” ya que aumenta el desarrollo de hongos en las semillas y por tanto induce contaminación del cultivo. La dosis de HT que reduce tanto la germinación, como el peso, el número de raíces, la longitud de raíces y la longitud de la plúmula en un 90% (LD90) equivale a 750 ppm. Por el contrario, cuando se trataron los cultivos de *T. aestivum* con la mezcla HT+DHFG, la LD90 fue de 3000 ppm. Dicha dosis afectó en todos los sentidos a las semillas ya germinadas. Esta mezcla actúa como un potenciador de la germinación, el peso, la generación de raíces, la longitud de estas y de la plúmula a una dosis de 100 ppm. Para el caso de los cultivos de *T. aestivum* tratados con las diferentes dosis de DHFG se observó que la acción antigerminal en esta especie apenas alcanza un 50%, lo que supone un dato importante para ser utilizado en el control de las malas hierbas *Lolium spp.* sobre cultivos de trigo. Sorprendentemente, se observa un incremento de la germinación a dosis de 500 ppm, al igual que en el peso fresco, funcionando dicho compuestos como un potenciador de crecimiento y germinación en estos cultivos. La producción de raíces se produce a dosis menores (125 ppm) y el incremento en la longitud de la misma a dosis incluso menores (100 ppm). Para el desarrollo de la plúmula basta con 75 ppm para aumentar considerablemente su longitud.

Los resultados resumidos en la Tabla 4 para la especie *Lactuca sativa* L. (lechuga var. Cervantes) tratada con las diferentes concentraciones ensayadas de HT, DHFG o HT+DHFG, han puesto de manifiesto que a partir de 4000 ppm de DHFG comienza a

afectarse el peso, la longitud de la raíz y de los cotiledones de dichos cultivos. Sin embargo, no se consigue alcanzar el LD90 de la germinación. A una dosis de 100 ppm de DHFG se observa un incremento en el peso fresco respecto al control. El tratamiento con HT en dicha especie indujo una contaminación fúngica debida al extracto y la dosis que afectó tanto a la germinación como al peso, desarrollo de raíces y cotiledones, fue de aproximadamente unos 7500 ppm, siendo una dosis muy elevada. Por otro lado, el tratamiento con la mezcla HT+DHFG puso de manifiesto que el LD90 se obtuvo a la dosis de 2980 ppm y la dosis a la que empezó a observarse una disminución acusada en el peso fresco, raíces y longitud de los cotiledones fue de 300 ppm.

Para los cultivos de la especie *Solanum tuberosum* L. (patata var. Red Reponiac) las diferentes dosis de DHFG no afectaron a la germinación (LD90 > 4000 ppm). Sin embargo, se observa un incremento en el aumento del peso de la raíz formada a una dosis de 200 ppm. El tratamiento con HT a diferentes concentraciones puso de manifiesto que la dosis LD90 se obtuvo a 1790 ppm. Dicha dosis afecta también al peso fresco de la raíz formada en la etapa de germinación y también se observa que a dosis altas de HT se produce la putrefacción de las mismas. El tratamiento de dichos cultivos con la mezcla HT+DHFG a diferentes dosis demostró que la LD90 > 12000 ppm, pero a partir de una dosis de 3000 ppm el efecto en la germinación es acusado. Sin embargo, se observa que existe un aumento del peso de la raíz en las que han germinado.

Como se observa en la Tabla 4, el comportamiento de la especie *A. cepa* (cebolla var. Galaxia) frente a diferentes dosis de DHFG puso de manifiesto una disminución brusca del porcentaje de germinación a dosis muy bajas, entre 25 y 50 ppm. Sin embargo, la LD90 para este cultivo se obtuvo a dosis mucho mayores 4000 ppm. Cuando dichos cultivos se trataron con diferentes dosis de HT o HT+DHFG, se obtuvo un LD90 a la dosis de 1375 ppm y 495 ppm, respectivamente.

La especie *Lepidium sativum* L. (berro de agua) es una especie que se usa como indicador de productos que pueden presentar fitotoxicidad ya que es extremadamente sensible. Los compuestos analizados en la presente invención demostraron ser fitotóxicos incluso a pequeñas dosis. Específicamente, el tratamiento con DHFG indujo una disminución brusca de la germinación de dicha planta a dosis de entre 25 y 50 ppm. Sin embargo, la LD90 para este cultivo se encuentra a dosis mayores de 4000

ppm.

5 *Asparagus officinalis* L. (Espárrago var. Atlas) no germinó bien en los experimentos por lo que se procedió a utilizar el método topográfico de tetrazolio para determinar las semillas vivas. Los LD90 obtenidos en este ensayo son de 7860, >4000, 375 ppm para el HT, DHFG y HT+DHFG, respectivamente.

10 De manera general, los resultados mostrados en la Tabla 4 ponen de manifiesto que el tratamiento con DHFG a dosis bajas es efectivo contra la germinación de las malas hierbas, mientras que para generar efectos tóxicos en las diferentes especies de interés agrícola ensayadas es el compuesto que necesita una mayor concentración. Bien es cierto que el tratamiento con DHFG muestra un efecto favorecedor de la germinación cuando se usa a bajas concentraciones para los cultivos de *L. sativa* L. (lechuga), *S.tuberosum* L (patata) y *T. aestivum* (trigo). Así, el DHFG es útil como  
 15 fitorregulador, siendo capaz de presentar actividad herbicida frente a malas hierbas y actividad potenciadora del crecimiento en cultivos de interés agrícola. En este sentido y como se ha comentado anteriormente, para el caso particular de los cultivos de *T. aestivum*, la acción antigerminativa de este compuesto en esta especie apenas alcanza un 50%, lo que supone un dato importante para ser utilizado en el control de  
 20 *Lolium* spp. sobre cultivos de trigo. Curiosamente, en dichos cultivos de *T. aestivum* se observa que el tratamiento con DHFG a la dosis de 500 ppm induce un incremento de la germinación de dichos cultivos, al igual que un incremento en el peso fresco de dichos cultivos, funcionando así el DHFG como un potenciador del crecimiento y la germinación en estos cultivos. Respecto al resto de las variables analizadas, es  
 25 interesante mencionar que la producción de raíces se produce con dosis bajas de DHFG (125 ppm) y el incremento en la longitud de las mismas a dosis incluso menores, 100 ppm. Para el desarrollo de la plúmula bastó con 75 ppm de DHFG para aumentar considerablemente su longitud.

30 Como se puede observar en la Tabla 4, el tratamiento de las semillas con HT a las diferentes dosis ensayadas fue capaz de controlar el crecimiento de las malas hierbas, pero presenta el inconveniente de producir hongos y acabar contaminando las semillas. Para el caso de la mezcla HT+DHFG, se observa en los datos mostrados en la Tabla 4 que hay dosis que inducen la germinación de cultivos pero a su vez también  
 35 potencian el crecimiento de las malas hierbas, por lo tanto no es un tratamiento válido ni efectivo.

Los resultados obtenidos para los controles positivos (cultivos tratados con el herbicida FZS pusieron de manifiesto que las LD90 para diferentes especies estaban en dosis muy bajas del mismo, aproximadamente 90 ppm, dejando así constancia de la efectividad de dicho herbicida tanto para cultivos de mono como dicotiledóneas.

Por lo tanto, el HT es capaz de controlar el crecimiento de malas hierbas, pero presenta el inconveniente de producir hongos y acabar contaminando las semillas. La mezcla de HT+DHFG también presenta problemas ya que las dosis utilizadas para controlar el crecimiento de las malas hierbas están en el límite con las dosis que impiden el crecimiento de los cultivos, por lo que tampoco es un candidato útil como fitorregulador. En cambio, los resultados han demostrado que el DHFG es el candidato principal para actuar como fitorregulador, siendo eficaz como herbicida, ya que además de presentar grandes diferencias entre las malas hierbas y los cultivos, presenta ventajas a dosis bajas como activador de la germinación y del crecimiento.

**Ejemplo 3. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de post-emergencia temprana, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**

Plantas en el primer estadio de desarrollo de crecimiento se plantaron en alveolos de 25 cm<sup>3</sup> con un sustrato constituido por una mezcla limo:turba (relación 1:1) y se trataron con HT, DHFG o HT + DHFG a diferentes dosis. Las especies de malas hierbas y cultivos agrícolas ensayados son las descritas en las tablas Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente. Las dosis ensayadas para cada uno de los tratamientos han sido:

HT: 400, 800, 1600, 3200 y 6400 g ingrediente activo/ha

DHFG: 40, 80, 400, 800 y 1600 g ingrediente activo/ha

HT+DHFG: 400, 800, 1600, 3200 y 4800 g ingrediente activo/ha (referidos al componente HT-proporción HT:DHFG es 1:10).

Como control negativo se utilizaron todos los cultivos de estudio a los que no se les aplicó ningún tratamiento. Para el caso de analizar la actividad herbicida en malas hierbas (todas las especies serán usadas) se utilizará como control positivo el herbicida flazasulfuron a las mismas dosis que los compuestos testados.

Tras la aplicación de cada uno de los tratamientos a testar, los alveolos fueron introducidos en una cámara de crecimiento controlado (Fitotron; Weiss Technik; Reino Unido) con las siguientes condiciones: temperatura día/noche de 27/18°C; fotoperiodo de 14 h; y luz  $580 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante un período de entre 20 días, momento en el que se cortó la vegetación e inmediatamente después se pesó y se construyeron curvas de disminución de peso fresco en función de las concentraciones de cada uno de los extractos ensayados y de las especies testadas. Se utilizaron 10 plantas como repeticiones por tratamiento y especie).

Cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente se aplicaron vía aspersión foliar en el caso de los cultivos de malas hierbas, ya que es el modo habitual de aplicación para este tipo de vegetación, mientras que para el caso de las especies de interés agrícola, cada uno de los tratamientos testados se aplicaron también por lavado directamente en tallo para corroborar si existían diferencias entre ambos tipos de aplicación sobre el resultado final. Cualquiera de las aplicaciones conocidas por el experto en la materia puede ser utilizada para los compuestos de la presente invención. En el caso de la aspersión foliar se preparó un volumen de caldo de 400L/ha, mientras que para lavado fue de 10000 L/ha.

**Tabla 5.** Especies de malas hierbas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<i>Lolium spp.</i> (aspersión foliar)	<i>Conyza spp.</i> (aspersión foliar)

20

**Tabla 6.** Especies de cultivos agrícolas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<p><i>Graminaea:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Triticum aestivum</i> (Trigo blando) [Aspersión foliar]</li> </ul>	<p><i>Compositae:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Lactuca sativa</i> L. (<i>Lechuga var. Cervantes</i>) [Aspersión foliar]</li> </ul>
<p><i>Liliaceae:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Allium cepa</i> (<i>Cebolla var. Galaxia</i>) [Aspersión foliar y lavado directo]</li> </ul>	<p><i>Solanaceae:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Lycopersicum esculentum</i> L. (<i>Tomate var. Tres cantos</i>) [Aspersión foliar y lavado directo]</li> <li>▪ <i>Solanum tuberosum</i> L. (<i>Patata var. Red Repontiac</i>) [Aspersión foliar]</li> <li>▪ <i>Solanum melongena</i> L. (<i>Berenjena var.</i></li> </ul>

	<p><i>Redonda Lisa</i>) [Aspersión foliar y lavado directo]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Capsicum L. (Pimiento var. Italiano)</i> [Aspersión foliar y lavado directo]</li> </ul>
	<p><i>Cucurbitaceae:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Cucumis sativus L. (Pepino var. Bellpuig)</i> [Aspersión foliar y lavado directo]</li> <li>▪ <i>Cucurbita pepo L. (Calabacín var. Diamante)</i> [Aspersión foliar y lavado directo]</li> <li>▪ <i>Citrullus lanatus L. (Sandía var. Meridian)</i> [Aspersión foliar y lavado directo]</li> </ul>
	<p><i>Asparagaceae:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Asparagus officinalis L. (Espárrago var. Atlas)</i> [Aspersión foliar]</li> </ul>

Los resultados obtenidos para el control de las malas hierbas utilizando las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente de HT, DHFG o HT+DHFG sobre la especie *Lolium spp* mediante aplicación vía foliar puso de manifiesto que

5 exclusivamente el tratamiento con DHFG fue capaz de controlar el crecimiento de dicha mala hierba. La dosis eficaz ED90 para esta especie cuando se trató con dicho extracto fue de 575 g ingrediente activo/ha, y la dosis de 1600 ppm consiguió un control absoluto de su crecimiento, mientras que la dosis ED90 para HT y HT+DHFG fue de >3200 g ingrediente activo/ha y > 4800 g ingrediente activo/ha,

10 respectivamente, por lo que dichos tratamientos no fueron capaces de controlar el crecimiento de esta mala hierba (Tabla 7). En el caso de los cultivos de la especie *Conyza spp* tratada con las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente de HT, DHFG o HT+DHFG, se obtuvieron los mismos resultados que para la especie *Lolium spp*. Exclusivamente, el tratamiento con DHFG fue capaz de controlar el

15 crecimiento de dicha mala hierba. La ED90 para esta especie cuando se trató con DHFG está en 580 g ingrediente activo/hectárea (Tabla 7). El control absoluto del crecimiento se produjo a 800 g ingrediente activo/hectárea.

**Tabla 7.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las diferentes especies con los diferentes compuestos (expresados en gramos de ingrediente activo/ha).

Especies	LD90			Dosis activadora del crecimiento		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>Lolium spp.</i>	>3200	575	>4800			
<i>Conyza spp.</i>	>3200	580	>4800			
<i>L. sativa L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>L. esculentum</i> <i>L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>S. tuberosum L.</i>	1920	>1600	>4800		400	
<i>S. melongena L.</i>	>6800	>1600	4800			
<i>Capsicum L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>C. sativus L.</i>	>6800	1600	4800			
<i>C. pepo L.</i>	>6800	>1600	2800			
<i>C. lanatus L.</i>	>6800	>1600	4800			
<i>A. officinalis L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>A. cepa</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>T. aestivum</i>	1520	>1600	>4800		400	

5 Tal y como se observa en la Tabla 7, para el caso de los cultivos de interés agrícola, es interesante destacar que ninguna de las dosis de los compuestos utilizadas provocaron fitotoxicidad en los cultivos testados. Por otro lado, es interesante destacar que el tratamiento con DHFG indujo un aumento de peso y vigor en los cultivos de *T. aestivum* y *S. tuberosum* a dosis superiores a 400 g ingrediente activo/ha.

10

Así, los resultados mostrados en la Tabla 7 ponen de manifiesto que los cultivos mostraban vigor y buen desarrollo frente a las diferentes dosis de los distintos compuestos. Se observaron efectos negativos en alguno de los cultivos. El compuesto que más efecto negativo mostró fue la mezcla HT+DHFG, aunque viendo la dosis no es tan importante como el ocasionado por el DHFG en el pepino. Hay que tener en cuenta que el HT en aspersión foliar produce unas manchas en las hojas de las plantas que parecen ser hongos. El aspecto más importante a destacar de los resultados mostrados en la Tabla 7 es que el DHFG tiene actividad potenciadora del crecimiento, que se puede observar muy bien en los cultivos de *S. melongena L.*

15

(berenjena). Las dosis soportadas en plantas con dos a cuatro hojas verdaderas son muy elevadas debido a que la planta ya ha desarrollado mecanismos que le permiten resistir a dosis mayores.

**5 Ejemplo 4. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de post-emergencia tardía, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**

10 Aunque en el ejemplo anterior ha quedado demostrado que el efecto del tratamiento con el compuesto DHFG es menor sobre la inducción del crecimiento y germinación en las plantas ya desarrolladas, es conocido que dichas plantas en condiciones de estrés son más susceptibles a ciertos tratamientos. Por ello, se ha procedido a analizar la actividad del compuesto DHFG cuando se administra en los cultivos de:

15 *Lycopersicum esculentum* L. (tomate); *Allium cepa* (cebolla); *Capsicum* L. (pimiento); *Cucurbita pepo* L. (calabacín); *Lactuca sativa* L. (lechuga); *Solanum melongena* L. (berenjena) y *Asparagus officinalis* L. (espárrago), cuando dichos cultivos estaban en estadio de post-emergencia tardía y además en condiciones de estrés abiótico (ausencia de riego provocado por 2 días sin riego-1 riego-3 días sin riego-1 riego). La aplicación de HT, DHFG y HT+DHFG se ha realizado por aspersión en todos los

20 casos.

**Tabla 8.** LD90 de las diferentes especies con los diferentes compuestos (expresados en gramos de ingrediente activo/ha).

Especies	LD90		
	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. sativa</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>L. esculentum</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>S. melongena</i> L.	>6800	>1600	4800
<i>Capsicum</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>C. pepo</i> L.	>6800	>1600	2800
<i>A. officinalis</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>A. cepa</i>	>6800	>1600	>4800

25 Los cultivos presentan una respuesta positiva a las diferentes dosis de los diferentes compuestos sin importar si existen zonas foliares afectadas o no. Esto indica que el

daño es mínimo ya que se observa una rápida recuperación de las mismas seguida de una mejora en su desarrollo foliar.

5 Los resultados mostrados en la Tabla 8 ponen de manifiesto que las especies analizadas a estadíos muy altos de desarrollo, no son susceptibles a los compuestos ensayados, ni siquiera a dosis muy altas.

**Ejemplo 5. Análisis de la actividad herbicida del compuesto DHFG en estadios de pre-emergencia en campo.**

10

El análisis de la actividad herbicida del compuesto DHFG en estadios de pre-emergencia (germinación) en campo se realizó en parcelas de cultivo hortícola en la localidad de Huétor-Tajar (Granada, España). Se ensayaron el DHFG y la mezcla HT+DHFG que mostraron actividad herbicida en los ejemplos anteriores de pre-emergencia. La aplicación de dichos compuestos se realizó vía foliar por aspersión

15

utilizando un volumen de caldo de 400 L/ha, y las dosis utilizadas han sido:

- DHFG: 40, 400 y 800 g de ingrediente activo/ha
- HT+DHFG: 400, 800 y 1600 g de ingrediente activo/ha.

20

Como control positivo se ha utilizado el herbicida Flazasulfuron a las dosis de 100, 200 y 1000 g/ha.

25

Además del tratamiento exclusivo con cada uno de los compuestos ensayados, se analizó la actividad herbicida adicionando a cada uno de ellos un adyuvante. Los adyuvantes elegidos han sido Araoil (aceite de parafina, Fitalbi, España) que es un concentrado emulsionable con actividad insecticida por contacto para el control de plagas) y Biopower (alquiletersulfato, Bayer, Alemania) que es un coadyuvante tensoactivo (mojante no iónico) que se recomienda para aumentar la eficacia de los herbicidas que se aplican por contacto para mejorar el poder mojante.

30

Se han hecho 4 repeticiones de cada tratamiento en parcelas de 2x10 m<sup>2</sup>. Los resultados ponen de manifiesto que el herbicida comercial Flazasulfuron es el más efectivo. En cambio, el DHFG y la mezcla HT+DHFG sin la presencia de los aditivos, potencian el crecimiento. Cuando a dichos extractos independientemente se les añaden cada uno de los aditivos ensayados, la eficacia herbicida de dichas composiciones aumenta considerablemente, principalmente cuando la composición

35

comprende el adyuvante Biopower, con lo cual también se espera que la mezcla de los dos con el adyuvante también mejore.

5 Ensayos adicionales, que se muestran en los ejemplos 7 y 8, se llevaron a cabo para determinar la acción de los adyuvantes sobre la penetrabilidad foliar de los compuestos y sobre la estabilización en suelo de los mismos.

**Ejemplo 6. Análisis de la absorción foliar y estabilidad del compuesto DHFG y de la mezcla (DHFG+HT) en plantas de pimiento.**

10

Con el fin de analizar la cantidad de DHFG y HT+DHFG que las hojas de una planta son capaces de absorber, así como de la estabilidad de dichos extractos tras su absorción, se ensayaron dichas variables en hojas de plantas de pimiento. Brevemente, se trasplantan 18 plántulas de *Capsicum* L. (pimiento var. Italiano) a macetas con turba, se riegan y se dejan crecer durante 5 días. De cada maceta se eligieron y se marcaron dos hojas para realizar el ensayo por duplicado.

15

Partiendo de DHFG (3.5 g/L) se prepararon tres disoluciones de 1000, 500 y 100 ppm de DHFG. De la misma manera, se procedió con la mezcla DHFG + HT cuyas concentraciones fueron de 1.2 y 13.6 g/L, respectivamente. Las disoluciones de la mezcla fueron también de 1000, 500 y 100 ppm de DHFG con respecto al HT. Se eligieron estas concentraciones en función de la estabilidad que presentaron las plantas frente a estas concentraciones en los ejemplos anteriores. Además, también se aplicaron a cada uno de los compuestos ensayados los adyuvantes Araoil (aceite de parafina que se aplica sobre el extracto al 0.5 %) o Biopower (alquiletersulfato que se aplica sobre el extracto al 1 %).

20

25

Una vez transcurridos los 5 días y alcanzado el tamaño deseado de cada planta se comienza el ensayo aplicando 0.1 mL de cada compuesto con una jeringa para cada concentración y cada coadyuvante, sobre las hojas de cada planta por duplicado. Una vez aplicados los distintos compuestos con los respectivos coadyuvantes se deja secar por dos horas y se procede a lavar las hojas de cada maceta con 10 mL de metanol/agua al 50 % con el fin de arrastrar la cantidad de compuesto que la planta no ha absorbido. Se recoge el lavado en placas de Petri y se determina su concentración en HPLC.

35

En la Tabla 9 se muestran los resultados en forma de porcentaje de ingrediente activo (DHFG) absorbido por hoja tratada y obtenidos mediante HPLC y fluorescencia.

**Tabla 9.** Porcentaje de 3,4 DHFG absorbido por hoja tratada.

<b>Tratamiento</b>	<b>DHFG añadido (mg)</b>	<b>DHFG extraído (mg)</b>	<b>% ingrediente activo absorbido</b>
DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0984	1,60
DHFG 1000 ppm (2)	0,1	0,0785	21,44
DHFG 1000 ppm + Bio (1)	0,1	0,0513	48,68
DHFG 1000 ppm + Bio (2)	0,1	0,0917	8,24
DHFG 1000 ppm+Ara (1)	0,1	0,0510	48,97
DHFG 1000 ppm+Ara (2)	0,1	0,0381	61,90
HT+DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0110	8,89
HT+DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0115	8,85
HT+DHFG 1000 ppm +Bio (1)	0,1	0,0058	9,42
HT+DHFG 1000 ppm + Bio (2)	0,1	0,0059	9,41
HT+DHFG 1000 ppm +Ara (1)	0,1	0,0082	9,17
HT+DHFG 1000 ppm + Ara (2)	0,1	0,0081	9,18
DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0065	86,88
DHFG 500 ppm (2)	0,05	0,0108	78,33
DHFG 500 ppm + Bio (1)	0,05	0,0019	96,02
DHFG 500 ppm + Bio (2)	0,05	0,0034	93,14
DHFG 500 ppm+Ara (1)	0,05	0,0113	77,28
DHFG 500 ppm+Ara (2)	0,05	0,0148	70,32
HT+DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0030	9,39
HT+DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0026	9,47
HT+DHFG 500 ppm +Bio (1)	0,05	0,0019	9,60
HT+DHFG 500 ppm + Bio (2)	0,05	0,0019	9,62
HT+DHFG 500 ppm +Ara (1)	0,05	0,0032	9,34
HT+DHFG 500 ppm + Ara (2)	0,05	0,0037	9,26
DHFG 100 ppm (1)	0,01	0,0015	84,46
DHFG 100 ppm (2)	0,01	0,0004	95,57
DHFG 100 ppm + Bio (1)	0,01	0,0003	96,29
DHFG 100 ppm + Bio (2)	0,01	0,0004	95,83
DHFG 100 ppm+Ara (1)	0,01	0,0015	84,18

Tratamiento	DHFG añadido (mg)	DHFG extraído (mg)	% ingrediente activo absorbido
DHFG 100 ppm+Ara (2)	0,01	0,0014	85,15
HT+DHFG 100 ppm (1)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm (1)	0,01	0,00003	9,97
HT+DHFG 100 ppm +Bio (1)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm + Bio (2)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm +Ara (1)	0,01	0,00041	9,58
HT+DHFG 100 ppm + Ara (2)	0,01	0,00046	9,53

En la Tabla 9 se observa claramente cómo a la concentración de 1000 ppm de DHFG la absorción es mucho menor en todos los casos comparado con las concentraciones de 500 y 100 ppm. En el caso de la mezcla HT+DHFG, el porcentaje de absorción se mantiene en todos los casos sobre el 10%, independientemente de la concentración inicial de cada ingrediente activo, poniendo de manifiesto que se absorbe más cantidad por parte de las hojas cuando se utiliza la mezcla HT+DHFG, que cuando se utiliza el DHFG sólo. También es llamativa la variabilidad entre las muestras, y la elevada absorción del DHFG cuando se utilizan a concentraciones de 500 ppm y 100 ppm, tanto de forma directa, como en combinación con los adyuvantes Biopower o Araoil. A pesar de ello se ve que el uso de adyuvantes no mejora llamativamente la absorción del DHFG, el cual se absorbe por encima del 80 % en concentraciones de 100 y 500 ppm.

15

#### **Ejemplo 7. Análisis de la estabilidad del compuesto DHFG en cultivos de trigo durante su germinación.**

El objetivo de este ensayo es determinar la estabilidad de un extracto de DHFG de 5 g/L diluido a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ppm) durante el proceso de germinación de semillas de *Triticum durum* (Trigo duro). Dichas semillas fueron facilitadas por el Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba. Se sumergen en una disolución de hipoclorito sódico al 1 % durante 10 segundos para romper la cáscara y facilitar la germinación, a continuación se enjuagan con agua destilada y se dejan secar. Una vez secas, se preparan siete placas de Petri estériles con sendos discos de papel de filtro y se colocan 15 semillas

25

de trigo en cada una de ellas. Seguidamente, se añaden 5 mL de las distintas concentraciones de DHFG indicadas anteriormente y un blanco con agua destilada. Las placas de Petri se sellan con parafilm y se dejan 48 h a 4 °C en oscuridad. Trascurrido dicho tiempo se sacan de la cámara fría y se dejan germinar 3 días más, evitando la incidencia de rayos solares de forma directa. Pasados 5 días desde el inicio del ensayo se toman muestras del sobrenadante y se determina la concentración de DHFG en cada placa utilizando HPLC-UV a 280 nm. Los perfiles cromatográficos (HPLC) obtenidos ponen de manifiesto que no se forman otros compuestos por degradación u oxidación del DHFG y que éste se mantiene, verificando la estabilidad del compuesto DHFG en la semilla sin ningún tipo de adyuvante. A continuación en la Tabla 10 se muestra la concentración del compuesto DHFG extraído de cada una de las placas de germinación ensayadas.

**Tabla 10.** Concentración de DHFG extraído de cada placa de germinación de cultivos de *T. durum*.

[DHFG] inicial (mg/mL)	[DHFG] final (mg/mL)	% extraído
0	0	0
50	94,78	189,50
100	143,22	143,22
200	198,02	99,01
500	399,06	79,81
1000	977,82	97,80
2000	1913,33	95,70

En la Tabla 10 se puede observar que después de 5 días la mayor parte del DHFG permanece como tal en contacto con la semilla. Cabe destacar que en dos de las concentraciones se ha obtenido un dato por encima del valor inicial, como el de 50 y 100 ppm, lo cual pueda deberse a que la disolución que impregna la placa se haya podido concentrar o que parte de ese compuesto sea incluso endógeno de la planta.

**Ejemplo 8. Efecto de la radiación solar sobre muestras de tierra impregnadas con DHFG.**

Con el fin de determinar la influencia de la radiación solar sobre el DHFG una vez impregnados en la tierra de cultivo, se tomaron muestras de tierras sin tratar de las

parcelas donde se desarrollaron los estudios de campo en Huetor-Tájar (Granada) y se extendieron en bandejas de 0.53 x 0.38 m equivalentes a 0.2 m<sup>2</sup> de superficie. Partiendo del extracto con concentración 3.5 g/L de DHFG, se prepararon disoluciones de 1000, 500 y 100 ppm, y se pulverizaron 25 mL de cada disolución sobre las bandejas. Dicho volumen se determinó sabiendo que en campo, al menos, se ha empleado 400 L de caldo por hectárea. De esta manera se prepararon tres bandejas, una para cada concentración de extracto, divididas en dos partes bien diferenciadas, una de ellas expuesta a la radiación solar y la otra resguardada de dicha radiación al cubrirse con papel de aluminio, totalmente opaco a la radiación. Se hizo una toma de muestra a tiempo cero y dos más cada 24 h. Para cada muestra se pesaron 10g de tierra y se extractaron en frío con 10 mL de una mezcla metanol/agua (80:20 (v/v)) y con agitación durante una hora. A continuación, la tierra extractada se centrifugó y filtró. La concentración de DHFG extractada se determinó por HPLC-Fluorescencia. En la Tabla 11 se expresan las cantidades determinadas de 3,4 DHFG por gramo de tierra a tiempo 0, 24 y 48 h tras la aplicación.

**Tabla 11.** Cantidad de DHFG añadida y extractada en las muestras de tierra expuestas a radiación solar o en oscuridad.

[DHFG]	mg DHFG g/m <sup>2</sup> añadidos	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 0h	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 24h	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 48h
100 ppm luz	4,00	0,83	0,78	0,37
100 ppm oscuridad	4,00	0,81	0,73	0,29
500 ppm luz	20,00	7,65	7,65	3,91
500 ppm oscuridad	20,00	6,66	4,04	2,87
1000 ppm luz	40,00	31,20	9,82	1,56
1000 ppm oscuridad	40,00	22,46	8,73	0,87

20

Se observa en la Tabla 11 que al añadir el DHFG a la tierra de cultivo, gran parte del compuesto DHFG no llega a recuperarse en los primeros extractos y que su concentración en la tierra va disminuyendo con el tiempo, reduciéndose drásticamente a las 48h. Hay que destacar que a la más baja concentración no se aprecian diferencias entre el ensayo con y sin luz, sin embargo a las dos concentraciones más

25

altas sí se llegan apreciar diferencias, siendo los valores más altos los encontrados con incidencia solar. Los valores que permanecen más altos son los correspondientes a la concentración de 500 ppm, observándose una mayor bajada de concentración para 1000 ppm. Con este ensayo se verifica que el DHFG puede permanecer estable, con independencia a la luz solar, en tierra durante un periodo de 48 horas sin el uso de adyuvantes.

**Ejemplo 9. Ensayos de oxidación del compuesto DHFG a pH ácido y pH básico de la muestra.**

Para demostrar que el DHFG no se degrada en disolución acuosa tanto a pH ácido como básico se realizó una prueba de oxidación forzada a dos pHs.

En primer lugar se llevó a cabo una cinética de oxidación del extracto rico en DHFG en condiciones de baja concentración a temperatura ambiente y con un flujo continuo de aire, y al pH original de la muestra, pH ácido (6.3). Brevemente, se partió de un extracto de DHFG cuya concentración es de 0.4 g/L al 96% de pureza (es el mismo extracto que se ha empleado en los ejemplos anteriores para los ensayos antigerminativos) y se tomaron dos tubos de ensayo con 5 mL de dicho extracto en cada tubo. Se hizo pasar una corriente de oxígeno directa a través de sendos tubos midiendo la concentración de DHFG según el perfil cinético mostrado en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Cinética de oxidación del compuesto DHFG a pH ácido 6.3.

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final DHFG</sub> (mL)	g totales DHFG
0	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 1)	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 2)	0.40	5.00	2.00
1 (duplicado 1)	0.46	4.35	2.00
1 (duplicado 2)	0.47	4.25	2.00
2 (duplicado 1)	0.56	3.50	1.96
2 (duplicado 2)	0.57	3.50	1.96
3 (duplicado 1)	0.70	2.85	1.99
3 (duplicado 2)	0.60	3.30	1.98
4 (duplicado 1)	0.81	2.35	1.90
4 (duplicado 2)	0.92	2.15	1.98

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
5 (duplicado 1)	1.15	1.70	1.95
5 (duplicado 2)	1.51	1.30	1.96
8 (duplicado 1)	Sólido	0	2.01
8 (duplicado 2)	Sólido	0	1.98

Como se puede apreciar la concentración del compuesto DHFG aumenta por el efecto de la evaporación de la muestra, pero la cantidad de DHFG permanece constante en el tiempo, con lo cual se puede concluir que con una corriente de oxígeno y tras cinco horas de ensayo, no se aprecia pérdida del componente principal del extracto. Se continuó hasta llevar el extracto a sequedad (8 horas), momento en el que se redisolvió el sólido hasta el volumen inicial y se determinó la concentración observándose que no se había perdido nada del compuesto DHFG inicial.

Se llevó a cabo el mismo ensayo que se ha descrito anteriormente pero a pH 8. Para ello, se tomaron 20 mL del mismo extracto citado anteriormente y se llevó a pH 8 con una disolución de NaOH al 10%. Se tomó un mL de muestra por duplicado, por la que se le hizo pasar una corriente de oxígeno hasta sequedad (Tabla 13). Seguidamente se redisolvió con 1 mL de agua destilada y se midió su concentración, haciendo todo el ensayo por duplicado.

**Tabla 13.** Cinética de oxidación del compuesto DHFG a pH básico 8.

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
0	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 1)	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 2)	0.40	5.00	2.00
1 (duplicado 1)	0.48	4.20	2.00
1 (duplicado 2)	0.46	4.25	1.97
2 (duplicado 1)	0.64	3.05	1.95
2 (duplicado 2)	0.64	3.10	1.98
3 (duplicado 1)	0.74	2.60	1.92
3 (duplicado 2)	0.76	2.45	1.87
4 (duplicado 1)	0.90	2.00	1.80
4 (duplicado 2)	0.86	2.10	1.81

<b>Tiempo (h)</b>	<b>[DHFG] g/L</b>	<b>V<sub>final</sub> DHFG (mL)</b>	<b>g totales DHFG</b>
5 (duplicado 1)	2.09	0.85	1.78
5 (duplicado 2)	1.98	0.95	1.88
8 (duplicado 1)	Sólido	0	1.75
8 (duplicado 2)	Sólido	0	1.90

Al igual que se ha indicado anteriormente cuando el pH es ácido, tampoco a pH básico se produce pérdida significativa del compuesto DHFG por oxidación cuando se somete el extracto rico en dicho compuesto a pH básico. Por tanto, se concluye que en las condiciones ensayadas, pH ácido (pH 6.3) y pH básico (pH 8), no se produce oxidación alguna del compuesto DHFG.

Por lo tanto, la presente invención demuestra el carácter fitoregulador del DHFG como compuesto natural, y que el uso de adyuvantes mejora sustancialmente su actividad en campo. El uso de dichos adyuvantes, en combinación con el compuesto DHFG, según se ha demostrado en la presente invención ejerce un efecto diferente al que deberían ejercer y para el que están diseñados, ya que el DHFG penetra en la planta, permanece estable en la semilla y en el suelo independientemente del pH o de la incidencia solar sin la ayuda de dichos adyuvantes.

## REIVINDICACIONES

1. Uso del 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que el DHFG se obtiene a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una concentración de DHFG de entre 1 a 50000 ppm.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la actividad fitorreguladora se selecciona entre actividad herbicida frente a malas hierbas o actividad potenciadora del crecimiento de cultivos agrícolas.
4. Uso según la reivindicación 3 donde la actividad herbicida se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 100 a 50000 ppm de DHFG.
5. Uso según la reivindicación 4 donde la actividad herbicida se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 500 a 9000 ppm de DHFG.
- 15 6. Uso según la reivindicación 3 donde la actividad potenciadora del crecimiento se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 1 a 1500 ppm de DHFG.
7. Uso según la reivindicación 6 donde la actividad potenciadora del crecimiento se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 1 a 500 ppm de DHFG.
- 20 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con al menos un adyuvante.
9. Uso según la reivindicación 8 donde el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en: adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9 donde el adyuvante se selecciona de entre araoil y/o biopower.
11. Extracto obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una concentración de DHFG de entre 1 a 50000 ppm.
- 30 12. Composición fitorreguladora que comprende DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1a 7 y/o un extracto según la reivindicación 11.
13. Composición según la reivindicación 12 que además comprende al menos un adyuvante.
- 35 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 caracterizada por que el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en:

adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos.

- 5 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde el adyuvante se selecciona de entre araoil y/o biopower.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 caracterizada porque la concentración de DHFG es de entre 1 a 50000 ppm.
- 10 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 caracterizada porque tiene acción herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 100 a 50000 ppm y actividad potenciadora del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 1500 ppm.
- 15 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 caracterizada porque tiene acción herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 500 a 9000 ppm y actividad potenciadora del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 500 ppm.
- 20 19. Método para el control de las malas hierbas que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, del extracto según la reivindicación 11, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.
20. Método según la reivindicación 19 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 100 a 50000 ppm.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 500 a 9000 ppm.
- 25 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 dónde las malas hierbas son preferentemente monocotiledóneas y/o dicotiledóneas.
23. Método según la reivindicación 22 donde las plantas monocotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Lolium rigidum*; *Lolium multiflorum*, y las dicotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Sinapis arvensis*, *Chenopodium álbum* y *Stellaria media*.
- 30 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 caracterizado por que la dosis efectiva de DHFG, del extracto o de la composición, se administran vía aspersión, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido.
- 35 25. Método para inducir el crecimiento de cultivos que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,

de extracto según la reivindicación 11, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.

26. Método según la reivindicación 25 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 1 a 1500 ppm.
- 5 27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 1 a 500 ppm.
28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27 dónde los cultivos son preferentemente cultivos de monocotiledóneas y/o dicotiledóneas.
29. Método según la reivindicación 28 donde los cultivos de monocotiledóneas se  
10 seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Triticum aestivum*  
*Allium cepa*, y los cultivos de dicotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Lepidium sativum* L., *Lactuca sativa* L., *Lycopersicum esculentum* L., *Solanum tuberosum* L., *Solanum melongena* L., *Capsicum* L.;  
*Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., *Citrullus lanatus* L., *Asparagus officinalis* L.
- 15 30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 caracterizado por que la dosis efectiva de DHFG, del extracto o de la composición, se administran vía aspersión, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido.