

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 081**

51 Int. Cl.:

A01H 3/04 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

A01N 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2014 PCT/IL2014/050047**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2014 E 14740800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2945475**

54 Título: **Uso de melanoidinas para mejorar las propiedades de las plantas**

30 Prioridad:

16.01.2013 US 201361753000 P

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

23.11.2018

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL - MINISTRY OF
AGRICULTURE & RURAL DEVELOPMENT,
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION
(ARO) (VOLCANI CENTER) (100.0%)
The Volcani Center P.O. Box 6
50250 Bet-Dagan, IL**

72 Inventor/es:

**GRABER, ELLEN R.;
ELAD, YIGAL;
RAV DAVID, DALIA y
SEGAL, SERGEY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 691 081 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de melanoidinas para mejorar las propiedades de las plantas

- 5 La invención se refiere a métodos y usos relacionados con composiciones que comprenden melanoidinas para controlar enfermedades fúngicas de las plantas, inducir tolerancia de la planta a condiciones de sequía y promover el crecimiento de la planta.

10 **Antecedentes de la invención**

- 10 Las melanoidinas son productos finales poliméricos con color de la reacción de Maillard, o “reacción de pardeamiento no enzimático”, que consiste en una serie de reacciones complejas que tienen lugar durante el calentamiento de azúcares de reducción o hidratos de carbono junto con aminas, aminoácidos o proteínas. Las melanoidinas son los compuestos responsables del color pardo de los alimentos asados, horneados, tostados, asados a la parrilla, carbonizados o dorados, y también son comunes en muchos líquidos de la dieta, como salsa de soja, miel, vino, cerveza y café. Las melanoidinas se forman por las ciclaciones, deshidrataciones, retroaldolizaciones, reordenamientos, isomerizaciones y condensaciones que tienen lugar a lo largo del transcurso de la reacción de Maillard. [Wang, H-Y, Qian, H, Yao, W-R. Food Chemistry, 2011, 128:573-584].

- 20 La estructura de las melanoidinas está insuficientemente definida, ya que estos compuestos macromoleculares heterogéneos no pueden caracterizarse de manera individual. Se han lanzado tres propuestas principales en cuanto a su estructura: (i) polímeros que consisten en unidades de repetición de furanos y/o pirroles, unidos por reacciones de policondensación; (ii) sustancias con color de bajo peso molecular (LMW) reticuladas con proteínas a través de grupos ϵ -amino, que dan melanoidinas con color de alto peso molecular (HMW); y (iii) cadenas principales construidas de productos de degradación del azúcar formados en las primeras etapas de la reacción de Maillard, polimerizados a través de una condensación de tipo aldol y unidos por compuestos amino [Wang, H-Y, Qian, H, Yao, W-R. Food Chemistry, 2011, 128:573-584].

- 30 Dado que son prácticamente ubicuas en muchos alimentos, existe interés por explorar la función en la dieta de las melanoidinas. Se ha descubierto que tienen infinidad de propiedades funcionales *in vitro* e *in vivo*, entre las que se incluyen: (i) actividad de eliminación de radicales libres y antioxidante; (ii) actividad antimicrobiana; (iii) capacidad quelante de metales; (iv) adhesión antimicrobiana y acción de formación anti-biopelícula; (v) inhibición de peroxidación lipídica; y (vi) efectos inhibidores o promotores en las actividades de varias enzimas.

- 35 Además de su ubicuidad en los alimentos, desde hace tiempo se cree que las melanoidinas se encuentran entre los bloques de construcción de sustancias húmicas, los materiales macromoleculares de color marrón que componen la mayor parte de la materia orgánica natural en el suelo. Las sustancias húmicas hidrosolubles (ácidos húmico y fúlvico) también constituyen una importante parte de la materia orgánica en los entornos acuosos y en el aerosol atmosférico. Al igual que los ácidos húmico y fúlvico, las melanoidinas ejercen un carácter parcialmente aniónico en solución acuosa a lo largo de un amplio intervalo de pH. Pueden separarse en fracciones según tamaños por diálisis, ultrafiltración o técnicas de permeación de gel, con un límite del peso molecular operativo arbitrario de 10,000 o 12.400 Daltons para distinguir entre melanoidinas de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW). La solubilidad de las melanoidinas de HMW se potencia a pH altos. A un pH muy bajo, las melanoidinas de HMW marrones más oscuras precipitan, mientras que las melanoidinas de color paja claro de LMW permanecen en solución. Las melanoidinas de HMW también pueden flocularse mediante cationes inorgánicos multivalentes. En comparación con las sustancias húmicas, las melanoidinas son considerablemente más hidrosolubles y tienen un contenido en N mucho mayor como consecuencia de que derivan de aminoácidos.

- 50 Desde hace tiempo se ha notificado que las sustancias húmicas tienen efectos positivos en la nutrición de las plantas, la germinación de las semillas, el inicio de las raíces y la biomasa de la planta total. Por ejemplo, se ha observado que la capacidad de las sustancias húmicas de quelar importantes micronutrientes de las plantas (Fe y Zn) y potenciar su solubilidad en la solución nutriente potencia el crecimiento de melones, soja y centeno. Se ha observado asimismo que el ácido húmico tiene un efecto transitorio en la regulación transcripcional de agentes moleculares principales que participan en la asimilación del hierro en plantas de pepino deficientes en Fe – sin hierro. Se ha observado que los ácidos húmicos y, en particular, los ácidos húmicos de bajo peso molecular, aumentan la velocidad de absorción de nitrato en las plantas de trigo, aparentemente, a través de la promoción de la expresión molecular de proteínas que participan en sistemas de soporte de nitrato. En el pepino, se ha asociado la aplicación de ácido húmico con una potenciación de la actividad H⁺-ATPasa de la raíz, una mayor concentración de nitrato en los brotes y una menor concentración de nitrato en la raíz, efectos que van acompañados por aumentos y disminuciones inherentes de varias citoquininas y poliaminas. Se ha notificado que los ácidos húmicos inducen a un alivio parcial ante la privación de P en cultivos celulares en suspensión de tabaco BY-2, aumentando la cantidad total de fosfato en la célula, los niveles de ATP y glucosa-6-fosfato y la actividad de fosfatasa ácida segregada. Se ha observado asimismo que el ácido húmico tiene impacto en la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de la raíz y la expresión en maíz con el resultado de la promoción del crecimiento de la raíz y la actividad de la bomba de protones, posiblemente debido a la liberación de promotores del crecimiento de tipo auxina desde los ácidos húmicos. Otra prueba de la actividad de tipo auxina de las sustancias húmicas es la activación del

5 indicador sintético (DR5::GUS) y la subsiguiente transcripción mejorada del gen sensible a auxina temprano IAA19 en Arabidopsis, que induce la formación de raíz lateral. Khripovich et al. (Khripovich, A.A., et al.: Khimiya Tverdogo Topliva, vol. 5, 2003, pp.1-8) han demostrado estimuladores del crecimiento de la planta a través de fuentes de turba con aditivos entre los que se incluye urea, en las que se encuentran productos estimuladores que incluyen melanoidinas.

No se dispone de información sobre los efectos de las melanoidinas en el crecimiento o funcionamiento de las plantas.

10 El mildiu polvoriento y el moho gris son dos ejemplos de enfermedades promovidas por hongos en las plantas. Dichas enfermedades están extendidas y son fáciles de reconocer pues causan graves daños a una amplia variedad de plantas, árboles y cultivos agrícolas.

15 El mildiu polvoriento es causado por patógenos de la planta (p.ej., *Oidium neolycopersici*, un parásito obligado, es decir, el parásito ataca y puede vivir únicamente en tejidos hospedadores vivos). Unas condiciones de un grado bastante alto de humedad favorecen la germinación y la infección. Los hongos se extienden con mucha rapidez en cuestión de tan solo unos días. Los conidios se extienden cortas distancias con el viento y la lluvia. Los hongos del mildiu polvoriento crecen en la superficie de los tejidos de las plantas. Penetra en la superficie de la hoja con células especializadas denominadas haustorios que recogen los nutrientes y la energía desde la hoja hospedadora. Los conidios se producen en la superficie de la hoja en el transcurso de tan solo 60 horas tras la infección inicial y son transportados por las corrientes de aire hasta otra hoja a la que pueden infectar directamente por germinación.

20 *Botrytis cinerea* es otro tipo de patógeno fúngico que causa una enfermedad de la planta generalizada, que daña las plantas, incluyendo cultivos agrícolaemente importantes como tomates y pepinos. *B. cinerea* es el agente causante del moho gris. Unas condiciones de un grado de humedad bastante alto y de frío relativo favorecen la germinación y la infección de *B. cinerea*. En tales condiciones, la germinación y la infección pueden tener lugar en unas horas.

25 Generalmente, cuando esta enfermedad es grave, como pueda ser sobre cultivos de tomates, pepinos y otros cultivos, es posible utilizar pulverizadores fungicidas para proteger las plantas sanas próximas.

30 Normalmente, evitar las condiciones de un alto grado de humedad es la forma más eficaz disponible hoy en día para reducir la probabilidad de que se extiendan estas enfermedades. Sin embargo, no existe ninguna solución eficaz para controlar las enfermedades en plantas afectadas una vez establecida la enfermedad.

35 La sequía es una de las situaciones extremas a las que se tienen que enfrentar las plantas durante su crecimiento. La sequía puede estar causada por la limitada disponibilidad de agua o la incapacidad de las plantas para absorber o transferir el agua a la cubierta forestal por una alteración de la relación entre la planta y el agua y una menor eficiencia de la utilización del agua. Asimismo, puede venir dada por altas temperaturas o por un déficit de presión de vapor alta. Morfológicamente, las reacciones de las plantas ante las condiciones de sequía incluyen un menor crecimiento, tal como se observa en la altura de la planta, el tamaño de las hojas y el ancho del tallo. En unas condiciones de sequía intensa, las plantas se marchitarán. En caso de marchitarse gravemente, es posible que las hojas no se recuperen del estrés una vez que se rieguen de nuevo las plantas y el marchitamiento tendrá como resultado la pérdida de las hojas y otros órganos de la planta.

45 Se ha descubierto ahora de manera sorprendente que las melanoidinas obtenidas de la reacción de Maillard son agentes activos que pueden mejorar sustancialmente las propiedades de las plantas.

50 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar melanoidinas y composiciones que las comprenden que se pueden utilizar para promover el bienestar de la planta.

Otro objeto de la invención es proporcionar melanoidinas y composiciones que las comprenden para su uso en el control de enfermedades de las plantas.

55 Otro objeto más de la invención es proporcionar melanoidinas y composiciones que las comprenden para su uso en la protección de plantas en condiciones de sequía.

Otro objeto más de la invención es proporcionar melanoidinas y composiciones que las comprenden para su uso en el crecimiento de las plantas.

60 Sumario de la invención

65 La invención se define en las reivindicaciones. Una composición que comprende melanoidinas puede mejorar las propiedades de la planta, donde dichas melanoidinas son un producto de la reacción de Maillard. Las melanoidinas se preparan a partir de cualquier combinación de uno o más aminoácidos y/o proteínas y uno o más azúcares de reducción o hidratos de carbono que contienen azúcares de reducción.

La composición puede mejorar la resistencia de la planta a patógenos fúngicos de la planta o la tolerancia a las sequías de las plantas o el crecimiento de la planta.

5 En algunas realizaciones de la invención, las melanoidinas están presentes en un intervalo de concentración de 0,001-0,1 % p/v.

Las composiciones divulgadas se pueden adaptar para su aplicación por pulverización, empapamiento, riego o fertigación.

10 Las plantas para su tratamiento se acuerdo con la invención pertenecen a la familia de las solanáceas o la familia de las curcubitáceas. De acuerdo con una realización específica, el patógeno que se combate de acuerdo con la invención es un patógeno de mildiu polvoriento o un patógeno de moho gris. De acuerdo con otra realización específica, el patógeno fúngico se selecciona entre *Oidium neolycopersici*, *Podosphaera xanthii* y *Botrytis cinerea*.

15 Para mejorar las propiedades de la planta, es posible aplicar en la planta o una porción de la misma una cantidad eficaz de una composición que comprende melanoidinas, donde dichas melanoidinas son un producto de la reacción de Maillard.

20 La invención proporciona un método según la reivindicación 1 para mejorar la resistencia de la planta a los patógenos fúngicos, la tolerancia a la sequía de las plantas o el crecimiento de la planta.

25 En una realización del método de la invención, se aplican las melanoidinas en la planta una vez. En una realización diferente del método de la invención, se aplican las melanoidinas al menos dos veces en diferentes días. En otra realización del método de la invención, se aplican las melanoidinas con el agua de riego o fertigación.

Debe señalarse que las melanoidinas de acuerdo con la invención se aplican en cualquier órgano de la planta en cualquiera de las etapas de su ciclo de vida.

30 Todas las características expuestas, y otras, así como las ventajas de la invención se comprenderán mejor con la descripción ilustrativa y no exhaustiva que se ofrece a continuación de las realizaciones de la misma, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos, se utilizan los mismos numerales a veces para indicar los mismos elementos en los diferentes dibujos.

35 Breve descripción de los dibujos

Las Fig. 1A-1B presentan el efecto de 0,1 % de diferentes melanoidinas (M1-M9) aplicadas por empapamiento (Fig. 1A) o pulverización (Fig. 1B) sobre la gravedad de moho gris (*Botrytis cinerea*) en tomate, 11 días después de la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) a lo largo del transcurso de 11 días. Las barras representan el error típico.

40 Abreviaturas: C (control).

Fig. 2A-2B presenta el efecto de diferentes melanoidinas (3 lotes de M1 y 3 lotes de M3) sobre la gravedad de mildiu polvoriento (*Oidium neolycopersici*) en tomate. Las barras representan el error típico.

45 Fig. 2A demuestra el efecto de melanoidinas en diferentes días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada.

Fig. 2B demuestra el efecto de melanoidinas a lo largo del transcurso de 19 días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Las barras representan el error típico.

50 Fig. 3A-3D presenta el efecto de diferentes melanoidinas sobre la gravedad of mildiu polvoriento (*O. neolycopersici*) en plantas de tomate.

Fig. 3A demuestra el efecto de la aplicación por pulverización de melanoidinas en diferentes días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

55 Fig. 3B demuestra el efecto de la aplicación por pulverización de melanoidinas a lo largo del transcurso de 23 días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Las barras representan el error típico.

Fig. 3C demuestra el efecto de la aplicación por empapamiento de melanoidinas en diferentes días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

60 Fig. 3D demuestra el efecto de la aplicación por empapamiento de melanoidinas a lo largo del transcurso de 23 días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada y como el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC). Las barras representan el error típico.

65 Fig. 4A-4B presenta el efecto de la pulverización de soluciones de diferentes melanoidinas sobre la gravedad de mildiu polvoriento (*O. neolycopersici*) en tomate.

Fig. 4A demuestra el efecto de melanoidinas en diferentes días tras la infección. La gravedad de la enfermedad

se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

Fig 4B demuestra el efecto de melanoidinas a lo largo del transcurso de 23 días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada y como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Las barras representan el error típico.

Fig. 5 presenta el efecto de soluciones de diferentes melanoidinas sobre la gravedad de la enfermedad de mildiu polvoriento (*O. neolycopersici*) muy establecido 42 días tras el tratamiento. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

Fig. 6 presenta el efecto de la ultrafiltración de melanoidinas (M1.3) en una fracción de alto peso molecular (HMW) de melanoidinas y melanoidinas no fraccionadas sobre la gravedad de moho gris (*B. cinerea*) en tomate. La aplicación de la solución de fracción HMW o sin fraccionar se llevó a cabo por empapamiento y por pulverización. Se evaluó la gravedad de la enfermedad 7 días tras la infección como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

Fig. 7A-7C presentan el efecto del empapamiento y la pulverización de soluciones de diferentes melanoidinas sobre la gravedad de mildiu polvoriento (*Podosphaera xanthii*) en pepino. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada 12 días tras la infección (A) y 23 días tras la infección (B) y como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) a lo largo del transcurso de 23 días (C). Las barras representan el error típico.

Fig. 8A-8C presenta el efecto de 0,03 % de ultrafiltración de melanoidinas en la fracción de alto peso molecular (HMW) de melanoidinas (denominada "fraccionada") y melanoidinas sin fraccionar (denominadas "original") aplicadas por empapamiento sobre gravedad de mildiu polvoriento (*P. xanthii*) de pepino.

Fig. 8A demuestra el efecto de melanoidinas en diferentes días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

Fig. 8B demuestra el efecto de melanoidinas el día 23 tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada. Las barras representan el error típico.

Fig. 8C demuestra el efecto de melanoidinas en el día a lo largo del transcurso de 36 días tras la infección. La gravedad de la enfermedad se presenta como % de área infectada y como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Las barras representan el error típico.

Fig. 9 presenta el efecto del empapamiento de soluciones de melanoidina sobre el peso de la planta 3 semanas después del último riego. El peso de la planta se presenta como porcentaje del peso original (día 0). Las barras representan el error típico.

Fig. 10 presenta el efecto de la pulverización de soluciones de melanoidina sobre el peso de la planta 3 semanas después del último riego. El peso de la planta se presenta como porcentaje del peso original (día 0). Las barras representan el error típico.

Fig. 11 Presenta el efecto del empapamiento y la pulverización de soluciones de melanoidina sobre la longitud de la hoja 2 semanas después del último riego. La longitud de la hoja se presenta como porcentaje del peso original (día 0). Las barras representan el error típico.

Fig. 12 presenta el efecto del empapamiento y la pulverización de soluciones de melanoidina sobre la gravedad del marchitamiento a las 4 horas después del riego que siguió a 3 semanas sin riego. El marchitamiento se presenta como porcentaje. Las barras representan el error típico.

Fig. 13 presenta el efecto del empapamiento y la pulverización de soluciones de melanoidina sobre el número de hojas vivas por planta a las 4 horas después del riego que siguió a 3 semanas sin riego. El marchitamiento se presenta como porcentaje. Las barras representan el error típico.

Fig. 14A-14C presenta el efecto de melanoidinas aplicadas en solución de fertigación sobre el crecimiento de la planta de tomate durante 48 días tras ser trasplantadas. Las barras representan el error típico.

Fig. 14A: Altura de la planta normalizada.

Fig. 14B: Número de nudos con el tallo.

Fig. 14C: Longitud de la hoja.

Fig. 15 presenta el efecto de melanoidinas aplicadas en solución de fertigación sobre una serie de flores del tomate por planta a lo largo del tiempo. Las barras representan el error típico.

Fig. 16A-16B presenta el efecto de melanoidinas aplicadas en solución de fertigación sobre gravedad por *B. cinerea* por lo que respecta al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) en hojas desprendidas de tomateras 4 semanas después de ser trasplantadas (Fig. 16A) y ocho semanas después de ser trasplantadas (Fig. 16B). Las barras representan el error típico.

Fig. 17 presenta un barrido UV-Vis de diferentes formulaciones de melanoidinas. Se llevaron a cabo las mediciones en un espectrofotómetro (UV-Vis ThermoScientific (Genesys 10 UV) a entre 190 y 700 nm.

Fig. 18A-18D presenta el espectro de excitación-emisión de fluorescencia de diferentes formulaciones de melanoidinas.

Fig. 18A: espectro de excitación-emisión de fluorescencia de M1.

Fig. 18B: espectro de excitación-emisión de fluorescencia de M3.

Fig. 18C: espectro de excitación-emisión de fluorescencia de M7.

Fig. 18D: espectro de excitación-emisión de fluorescencia de M9.

Fig. 19 presenta la tensión superficial (mN/m) de soluciones acuosas de M1 en función de la concentración.

Fig. 20 presenta los espectros de transmisión FTIR para varias formulaciones de melanoidina (M1, M3, M7 y M9).

Descripción detallada

5 Para mejorar las propiedades de las plantas, un método y una composición específicamente útiles para prevenir y controlar las enfermedades de las plantas causadas por patógenos fúngicos (p.ej., patógenos fúngicos foliares) para proteger las plantas de las condiciones de sequía y para promover y mejorar el crecimiento de la planta. La composición comprende melanoidinas y puede aplicarse por pulverización, empapamiento, riego, fertigración o cualquier otra forma de aplicación.

10 La expresión “propiedades de una planta” o “propiedades de la planta” se refieren al crecimiento, el desarrollo y/ la robustez de una planta. El crecimiento se refiere a un aumento del tamaño, el desarrollo se refiere al proceso de pasar por las etapas de desarrollo (p.ej., germinación, brotado, floración, etc.) y robustez se refiere a la capacidad de la planta para soportar un estrés tanto abiótico como biótico. El estrés abiótico tiene relación con las condiciones del entorno como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, la temperatura y la sequía. El estrés biótico tiene relación con las plagas (p.ej., insectos, gusanos o plantas parásitas, etc.) y patógenos (p.ej., hongos, bacterias, virus, etc.).

15 La expresión “mejorar las propiedades de las plantas” se refiere a cualquier característica de una planta que avanza hacia un estado más deseable y/o valioso, como por ejemplo, un mejor crecimiento y desarrollo, una potenciación de la resistencia a los patógenos, una mejor tolerancia al estrés abiótico, como sequía y temperatura.

20 La expresión “enfermedad de una planta” se refiere a una enfermedad causada por estrés tanto abiótico como biótico.

25 La expresión “controlar una enfermedad de una planta” se refiere a una reducción de la gravedad de la enfermedad, su incidencia o los síntomas en la planta hospedadora. El término abarca también la supresión del agente causante de la enfermedad, p.ej., un patógeno fúngico.

30 La expresión “condiciones de sequía” se refiere a un estrés hídrico por sequía que reducen el crecimiento de la planta por lo que respecta al tamaño de la hoja, la extensión del tallo y la proliferación de las raíces, alteran las relaciones de agua de la planta y reducen la eficiencia del uso del agua. El estrés por sequía se produce cuando la pérdida de agua de la planta excede la capacidad de las raíces de la planta para absorber agua y cuando el contenido en agua de la planta se reduce hasta el punto de interferir con los procesos normales de la planta. En consecuencia, las expresiones “proteger las plantas de las condiciones de sequía” o “inducir en la planta tolerancia a la sequía” se refieren a una reducción de las reacciones de la planta a una deficiencia del suministro de agua y al estrés impuesto por una mayor pérdida de agua.

35 El crecimiento de la planta se define como el proceso a través del cual la planta aumenta el número y el tamaño de sus hojas y tallos. La expresión “promover el crecimiento de la planta” se refiere a la estimulación de un mayor desarrollo de la planta en general, o un órgano de la misma, incluyendo, la hoja, el tallo, la raíz, la flor y el fruto.

40 Debe señalarse que en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma en singular “melanoidina” también incluye cualquier combinación de dos o más melanoidinas.

45 Las melanoidinas son productos finales poliméricos y con color de la reacción de Maillard, o “reacción de pardeamiento no enzimática”, una serie de reacciones complejas que tienen lugar durante el calentamiento de azúcares de reducción o hidratos de carbono con aminas, aminoácidos o proteínas. Generalmente, se forman las melanoidinas por las ciclaciones, deshidrataciones, retroaldolisaciones, reordenamientos, isomerizaciones y condensaciones que tienen lugar a lo largo del transcurso de la reacción de Maillard.

50 Aunque las melanoidinas comprenden cien o más compuestos diferentes que pueden variar de una formulación a otra, las diversas formulaciones tienen propiedades químicas y físicas que son muy similares entre sí, tal como se detalla en los Ejemplos 15-19 más adelante.

55 Las melanoidinas se pueden preparar a través de una serie de métodos diferentes conocidos en la técnica. Un método de preparación de melanoidinas comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una mezcla de aminoácidos en forma sólida;
- (b) proporcionar un azúcar de reducción en forma sólida;
- (c) combinar dicha mezcla y el azúcar en una relación molar de 1:1;
- (d) moler dicha mezcla y el azúcar para formar un polvo homogéneo; y
- 60 (e) calentar el polvo obtenido en la etapa (d) a una temperatura comprendida entre 50 y 300°C durante un período de tiempo que varía entre semanas y segundos, dependiendo de la temperatura de reacción, requiriendo las temperaturas más bajas períodos de tiempo más prolongados y al contrario.

65 Otros métodos para preparar melanoidinas incluyen disolver las materias primas de las etapas (a) y (b) mencionadas en un disolvente adecuado, por ejemplo agua, alcoholes, acetona u otros disolventes polares, seguido de calentamiento.

Las melanoidinas también pueden aislarse de sustancias que contienen melanoidina por extracción en disolventes adecuados como agua (con ajuste o no del pH), alcoholes, acetona y otros disolventes polares, incluyendo mezclas de disolventes.

5 Las melanoidinas se pueden obtener a través del primer método descrito, como puedan ser las melanoidinas denominadas "M1 – M9" o cualquier combinación de las mismas.

10 De acuerdo con una realización específica, se proporcionan a las plantas las melanoidinas en una solución acuosa. La solución puede incluir cualquier sustancia aceptable adicional, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, fertilizantes y agentes anti-plagas, antifúngicos y antimicrobianos.

15 De acuerdo con la invención, se pueden aplicar varios tipos de melanoidina en solución por empapamiento y/o por pulverización y/o formularse con fertilizantes o cualquier otra forma para controlar una enfermedad fúngica en las plantas y/o para proteger una planta de las condiciones de sequía y/o para mejorar y acelerar el crecimiento de la planta.

Cabe señalar que las melanoidinas pueden utilizarse en cantidades muy bajas para inducir su efecto beneficioso sobre las plantas tratadas.

20 Se ha observado que la pulverización de soluciones M1-M3 y M6-M8 sobre las plantas fue eficaz para controlar la enfermedad de moho gris. La aplicación por empapamiento con las soluciones M1 y M3 fue superior en la eliminación de la enfermedad en comparación con otras soluciones.

25 Asimismo, se observó que las distintas soluciones de los tipos de melanoidina aplicados por empapamiento y/o por pulverización o cualquier otra forma pueden servir para proteger a las plantas frente a enfermedad de mildiu polvoriento.

30 Ventajosamente, se observó que las melanoidinas eran eficaces para controlar la enfermedad fúngica también una vez establecida la enfermedad.

35 Se aplican las melanoidinas a las plantas a un intervalo de concentración de 10-5 hasta 5 % p/v de la composición o solución final. En una realización de la invención, se observó que de 0,01 y hasta 0,1 % p/v de las soluciones de melanoidinas mitigaban la gravedad de una enfermedad fúngica. Se observó también que estas concentraciones también eran eficaces para inducir la tolerancia de la planta a la sequía.

En otra realización, se pueden añadir las melanoidinas a una solución fertilizante a una concentración de 0,001 % p/v.

40 Se pueden aplicar las melanoidinas a la planta que se va a tratar con cualquier frecuencia, por ejemplo, entre una a tres veces al día. Alternativamente, se puede tratar la planta solo una vez. Asimismo, es posible proporcionarlas a la planta de forma regular, por ejemplo, como parte de la rutina del riego o fertilización. De acuerdo con una realización específica, se aplican las melanoidinas dos veces en dos días diferentes. De acuerdo con otra realización, se suplementa el tratamiento por aplicaciones adicionales varios días.

45 De acuerdo con la invención, se pueden aplicar las melanoidinas a la planta en cualquier etapa de su ciclo de vida, incluyendo la semilla, la germinación, el crecimiento vegetativo, la floración y la fructificación.

50 Se sometieron a ensayo las fracciones de melanoidinas en el método según la invención y tanto las melanoidinas sin fraccionar como la fracción HMW son eficaces para controlar enfermedades fúngicas.

En un aspecto, un método para ayudar a controlar el inicio y la progresión de enfermedades de las plantas causadas por patógenos fúngicos comprende la aplicación en la planta o una porción de la misma de una cantidad eficaz de una composición que comprende melanoidinas.

55 Las plantas que pueden tratarse de acuerdo con la invención son miembros del grupo de las angiospermas, que es el grupo de plantas de floración. De acuerdo con una realización específica de la invención, las plantas incluyen, pero sin limitarse a ellas, miembros de los géneros que se encuentran en las familias de las curcubitáceas y las solanáceas. Entre los ejemplos de tipos de plantas que se pueden tratar de acuerdo con la invención se incluyen, pero sin limitarse a ellas, plantas que pertenecen al género *Solanum* y *Curcumis*.

60 Las melanoidinas son eficaces para ayudar a proteger las plantas contra enfermedades causadas por una amplia variedad de patógenos fúngicos de la planta. En consecuencia, la invención es adecuada para la eliminación de varios patógenos fúngicos de las plantas incluyendo patógenos del mildiu polvoriento y *Botrytis* spp. Entre los ejemplos de patógenos fúngicos que se pueden combatir se incluyen, sin limitarse a ellos: *Oidium neolycopersici*, *Botrytis cinerea* y *Podosphaera xanthii*.

65

En una realización de la invención, las soluciones de melanoidina eliminan significativamente el mildiu polvoriento y el moho gris en plantas de tomate y pepino, al ser aplicado por empapamiento, por pulverización o en el agua fertilizante. Debe señalarse que las melanoidinas y las composiciones que las comprenden pueden añadirse a los materiales de control de enfermedades o los fertilizantes existentes.

5 El uso de melanoidinas de acuerdo con la invención en agricultura orgánica y convencional representa un importante paso para ayudar a controlar el inicio y progresión de enfermedades de las plantas causadas por patógenos fúngicos.

10 Más específicamente, se ha demostrado que las melanoidinas pueden reducir la gravedad de la enfermedad en hasta un 90 %.

15 Las composiciones de melanoidina mejoran la tolerancia a las plantas y la reacción ante el estrés por sequía, presentando por tanto un mejor crecimiento e la plante, tal como lo evidencia un aumento de la altura, peso, tamaño de la hoja y ancho del tallo de la planta, así como un menor marchitamiento. Se demostró que las plantas tratadas con melanoidina antes de detener el riego continuaban creciendo a pesar de la falta de riego.

20 Por otra parte, las composiciones son útiles para mejorar la recuperación de la planta del estrés por la sequía. La aplicación de una solución de melanoidina a las plantas sometidas a estrés por sequía reduce la gravedad del marchitamiento y el número de hojas perdidas.

25 En otro aspecto más de la invención, se observó que las melanoidinas tenían un efecto continuo y positivo en el crecimiento de las plantas, tal como lo evidenció un significativo aumento de la altura de la planta, el número de nudos, el tamaño de la hoja y el número de flores. Otras características de la planta que se mejoran con el método y los usos de la composición de la invención incluyen las semillas, la germinación y el inicio y alargamiento de la raíz.

30 Las formas adecuadas para utilizar las melanoidinas son múltiples, incluyendo, pero sin limitarse a ellas: (i) polvo o granulado seco para su mezclado en cualquier disolvente adecuado para plantas con o sin la adición de un tensioactivo y aplicado como un líquido ya sea por empapado del suelo o por pulverización en las hojas; (ii) aplicación directamente en la superficie del suelo como un polvo o un granulado; (iii) incorporación de sólidos de liberación lenta para aplicación en el suelo; (iv) formación de un compuesto junto con otros principios activos supresores de enfermedades en las plantas; (v) formación de un compuesto con fertilizantes; (v) adición a reparadores del suelo, entre otros muchos.

35 Para aplicar las melanoidinas en la planta, se pueden formular en una composición que puede incluir un diluyente o un vehículo inerte adecuado.

40 Se pueden aplicar las melanoidinas a través de cualquiera de los medios de aplicación de agentes a la planta conocidos. Por ejemplo, se pueden aplicar, formulados o sin formular, a cualquier porción o parte de la planta, incluyendo el follaje, los tallos, las ramas o las raíces, a la semilla antes de plantarla o a otros medios en los que las plantas estén creciendo o en las que se planten (por ejemplo, el suelo), directamente, o se pueden pulverizar, aplicar por aspersión, aplicar por inmersión, aplicar por distribución o incorporación de la composición (por ejemplo, como una composición granulada) en el suelo o en un entorno acuoso.

45 Las melanoidinas pueden pulverizarse también sobre la vegetación o se pueden aplicar mediante de sistemas de riego aéreo o terrestre.

50 Las melanoidinas pueden utilizarse en mezclas con fertilizantes (por ejemplo, fertilizantes que contienen nitrógeno, potasio o fósforo) que pueden presentarse en forma de solución o sólido. Las mezclas contienen entre 0,0001 y 0,01 % en peso de las melanoidinas, más específicamente 0,001 % del fertilizante final.

Entre las ventajas de las melanoidinas se incluyen las siguientes:

- 55 • Facilidad y reproducibilidad de síntesis.
- Capacidad para sintetizar fácilmente grandes cantidades sin un equipo especializado.
- Siendo las melanoidinas un componente común en una gran variedad de alimentos preparados (por ejemplo miel, café, tartas, cebolla frita, carne dorada, entre otros muchos), no son materiales tóxicos (GCS, generalmente considerados seguros).
- 60 • Las melanoidinas no presentarán ningún riesgo para los granjeros en ninguna de las etapas de su uso (preparación, aplicación, cosecha) ni para los consumidores de los productos agrícolas. En el suelo, las melanoidinas se descomponen en compuestos naturales no tóxicos y por tanto no presentarán ningún riesgo ni daños para el medioambiente al acumularse en el suelo.
- Las melanoidinas son muy versátiles ya que pueden aplicarse de muchas maneras, por ejemplo, incluyendo pulverización foliar, empapamiento del suelo, aplicación de polvo seco en el suelo, aplicación de granulado en el
- 65 suelo.

A continuación, se describirá la invención haciendo referencia a ejemplos y materiales concretos.

Ejemplos

5 **Materiales y métodos**

Preparación de melanoidinas

10 Se molió un hidrolizado de proteína comercial sólido (mezcla de aminoácidos preparada por división de una proteína con un ácido, álcali o enzima) junto con uno o más azúcares de reducción sólidos en una relación de peso de 1:1 entre el hidrolizado y el azúcar, obteniendo así un polvo homogéneo fino. Se llevó a cabo la molienda a temperatura ambiente rápidamente para reducir al mínimo la absorción de agua con los hidrolizados, que son higroscópicos (absorben agua del aire). Se calentó la mezcla en un plato de porcelana durante 8 minutos y 30 segundos a 150 ± 1 °C en un horno precalentado y después se transfirió a un desecador con gel de sílice para enfriarlo a 15 temperatura ambiente. Durante el calentamiento, los aminoácidos del hidrolizado reaccionaron con los azúcares para formar melanoidinas de color pardo a través de la reacción de Maillard. Se molieron suavemente las melanoidinas enfriadas y se transfirieron a viales sellados herméticamente para su almacenamiento.

20 En general, cualquier combinación de un aminoácido individual o mezcla de aminoácidos, como en un hidrolizado (p.ej., preparado a partir de carne de res, caseína, soja, arroz, etc.) y un agente de reducción (p.ej., monosacáridos como glucosa, galactosa o xilosa, etc.), disacáridos (p.ej., lactosa o maltosa, etc.) o polisacáridos puede reaccionar para formar melanoidinas a través de la reacción de Maillard. Las condiciones de síntesis que incluyen temperatura, tiempo de calentamiento y disolvente (seco, agua, alcohol u otro disolvente) pueden variar. Se seleccionó la relación en peso 1:1 porque representa una relación molar aproximadamente 1:1 entre el aminoácido y el azúcar de 25 reducción (considerando el % en peso de la mezcla de aminoácidos en un hidrolizado de proteína y sus pesos moleculares individuales, en comparación con el peso molecular del (los) azúcar(es) de reducción seleccionados): Esta aproximación, si bien no es exacta, funciona perfectamente para los diferentes hidrolizados y azúcares de reducción analizados (Tabla 1).

30 En general, la composición elemental de las melanoidinas difiere considerablemente dependiendo de los azúcares y los aminoácidos que se utilicen. Las condiciones de reacción también influyen significativamente en la composición de las melanoidinas. Sin embargo, la composición fundamental de las melanoidinas modelo en condiciones de reacción constantes está influida sólo de forma insignificante por la relación molar de los reactivos [Cämmerer B. y 35 Kroh L.W., Food chemistry, 1995. 53(1):55-59].

En los siguientes ejemplos, se sometieron a ensayo varios hidrolizados comerciales (véase Tabla 1) en mezclas con dos azúcares de reducción (glucosa y xilosa, por separado o en combinación). A continuación, se enumeran los diferentes hidrolizados y las combinaciones de azúcar que se sometieron a ensayo.

40

Tabla 1: soluciones de melanoidinas

Nombre de solución de melanoidinas de ensayo	Tipo de hidrolizado	Tipo de azúcar
M1	Proteosa Peptona No. 3 CONDA Pronadisa Cat. No. 1607.00	D-(+)-Glucosa; Sigma-Aldrich Cat. No. G8270; pureza >99,5 %
M2	Bacto™ BD, Peptona Cat. No. 211677	D-(+)-Glucosa; Sigma-Aldrich Cat. No. G8270; pureza >99,5 %
M3	Bacto™ BD, Triptona digesto pancreático de caseína Cat. No. 211705	D-(+)-Glucosa; Sigma-Aldrich Cat. No. G8270; pureza >99,5 %
M4	Proteosa Peptona No. 3 CONDA Pronadisa Cat. No. 1607.00	D-(+)-Xilosa; Sigma-Aldrich Cat. No. X1500; pureza >99 %
M5	Bacto™ BD, Peptona Cat. No. 211677	D-(+)-Xilosa; Sigma-Aldrich Cat. No. X1500; pureza >99 %
M6	Bacto™ BD, Triptona digesto pancreático de caseína Cat. No. 211705	D-(+)-Xilosa; Sigma-Aldrich Cat. No. X1500; pureza >99 %
M7	Proteosa Peptona No. 3 CONDA Pronadisa Cat. No. 1607.00	Glucosa:xilosa 1:1 (los mismos azúcares que el anterior)
M8	Bacto™ BD, Peptona Cat. No. 211677	Glucosa:xilosa 1:1 (los mismos azúcares que el anterior)
M9	Bacto™ BD, Triptona digesto pancreático de caseína Cat. No. 211705	Glucosa:xilosa 1:1 (los mismos azúcares que el anterior)

Para los siguientes experimentos, se sometieron a ensayo las melanoidinas a concentraciones de 0,01, 0,03 y 0,1 % en agua. Se sintetizaron diferentes lotes de una preparación dada para confirmar la capacidad de repetición del proceso de síntesis y el efecto biológico. Cada lote consecutivo se enumera consecutivamente (p.ej., M1, M1.1, 45 M1.2 son los lotes 1º, 2º y 3º de M1).

En un ejemplo, se concentraron las melanoidinas de alto peso molecular (HMW) utilizando una membrana de ultrafiltración de 3000 Dalton. A continuación, se diluyó la fracción retenida de HMW con agua doblemente destilada y se reconcentró por ultrafiltración utilizando la misma membrana dos veces. Se secó la fracción retenida final (>3000 Dalton) que contenía solamente melanoidinas de HMW por liofilizado tras la congelación de choque en N₂ líquido. El procedimiento de ultrafiltración seguido de aclarado, conocido como diafiltración, elimina eficazmente el remanente de reactivos de bajo peso molecular bajo, si quedan. La fracción de alto peso molecular limpia se denomina materiales "limpiados" o melanoidinas de alto peso molecular (HMW) a continuación.

Experimentos de control de enfermedad

Plantas

Se cultivaron plantas de tomate y pepino de semillas en un vivero y se trasplantaron a tiestos de 1 litro a los 40 a 50 días de la siembra en un invernadero sin calefacción. Se fertilizaron las plantas proporcionalmente con goteros 2-3 veces al día con fertilizante NPK 5:3:8 (se planificó que el agua de riego tuviera concentraciones de N, P y K totales de 120, 30 y 150 mg/l, respectivamente; CE 2,2 dS/m), permitiendo un drenaje de 25-50 %. Se mantuvieron las plantas a entre 20 y 30 °C con luz natural y humedad relativa de 50-90 % en un invernadero sin plagas ni enfermedades durante el período de crecimiento y después se transfirieron a un área en la que se dejó que se desarrollaran las plantas para desarrollar las siguientes infecciones de patógenos en las hojas intactas o desprendidas que se describe a continuación:

Patógenos: crecimiento, recogida, infección y evaluación de la gravedad de la enfermedad transferida

Patógeno inductor de moho gris

Se cultivó *Botrytis cinerea* [Pers.:Fr. [Teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] (aislado Bcl16; [Swartzberg D. et al., Eur. J. Plant Pathol., 2008, 120:289-297])] en agar de dextrosa de patata (PDA, Difco, Detroit, MI) en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían 15 ml de PDA cada una y se incubó a 20 °C. Se mantuvo el inóculo en PDA y se transfirió cada dos semanas. Se recogieron los conidios de moho gris de cultivos de 10 a 14 días de vida por agitación de 1 cm² de agar portador de micelios y conidios en un tubo de vidrio con agua del grifo. A continuación, se filtró la suspensión a través de una estopilla. Se determinó la concentración de los conidios utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico, y se ajustó a 5x10⁵ conidios/ml. Dado que los conidios de *B. cinerea* necesitan carbono y fosfato para la germinación y penetración, se añadió glucosa al 0,1 % a la suspensión de conidios final junto con KH₂PO₄ 0,1 %. Se ha demostrado que estos suplementos facilitan la germinación de conidios de *B. cinerea* y la posterior infección de la hoja.

Se examinaron las hojas de la tomatera unidas a la planta. Se mantuvieron las plantas enteras en una cámara de humedad a 20 ± 1 °C, 97 ± 3 % HR, y 1020 lux de intensidad de luz. Se infectaron las plantas pulverizando toda la planta con 2 ml de 5 x 10⁵ conidios/ml de suspensión.

Se evaluó la gravedad de la enfermedad en cada planta utilizando una clave pictórica; 0 = sin infección (ninguna de las hojas presenta síntomas) y 100 = todas las hojas están completamente cubiertas de síntomas de moho gris.

En todo momento, se mantuvo la temperatura de la cámara de crecimiento a 20 ± 1 °C y 75-90 % HR.

Patógeno inductor de mildiu polvoriento

Se aisló el patógeno de mildiu polvoriento de tomate *Oidium neolycopersici* Kiss de hojas jóvenes de plantas del tomate cultivadas en un invernadero comercial. Se recogieron los conidios de este patógeno aclarando las hojas infectadas con agua estéril. Para la infección artificial de las hojas de tomate (experimentos de cámara de crecimiento), se determinaron las concentraciones de estas suspensiones de conidios con un microscopio óptico con un hemocitómetro. Se ajustaron las concentraciones de todas las suspensiones a 10⁴ conidio/ml y después se pulverizaron sobre las plantas utilizando un volumen de 5 ml por planta. Se aplicaron todas las suspensiones sobre las plantas en 10 a 15 minutos desde el momento de la recogida de los conidios. Se aplicaron las suspensiones con un bote pulverizador manual y se dejaron secar las plantas durante hasta 30 minutos. En todos los momentos, se mantuvo la temperatura de la cámara de crecimiento a 20 ± 1 °C y 75-90 % HR y 2030 lux de intensidad de luz.

Se evaluó la gravedad del mildiu polvoriento de tomate utilizando una clave pictórica 0 = sin infección (las hojas parecen sanas) y 100 = las hojas están cubiertas por síntomas de mildiu polvoriento. Se evaluó la gravedad a tres alturas de planta diferentes y se hizo el promedio de toda la planta. La mayor parte de los síntomas de la enfermedad se observaron en las hojas y no en otras partes de la planta, por lo tanto se llevó un seguimiento de la infección de la hoja.

Mildiu polvoriento de Pepino

Se recogió el patógeno de mildiu polvoriento del pepino *Podosphaera xanthii* [(Castagne) Braun & Shishkoff [= *Sphaerotheca fusca* (Fr.) Blumer = *S. fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollacci]] de plantas infectadas de forma natural en cultivos y de hojas jóvenes de plantas de pepino cultivadas en un invernadero. Se recogieron los conidios de este patógeno por aclarado de las hojas infectadas con agua estéril.

Para la infección experimental de las hojas de pepino (experimentos de cámara de crecimiento), se determinaron las concentraciones de estas suspensiones de conidios con un microscopio óptico con un hemocitómetro. Se ajustaron las concentraciones de todas las suspensiones a 10^4 conidios/ml y a continuación, se pulverizaron sobre las plantas utilizando un volumen de 5 ml por planta. Se aplicaron todas las suspensiones sobre las plantas en 10 a 15 minutos desde el momento de la recogida de los conidios. Se aplicaron las suspensiones con un bote pulverizador manual y se dejaron secar las plantas durante hasta 30 minutos. En todos los momentos, se mantuvo la temperatura de la cámara de crecimiento a 20 ± 1 °C y 75-90 % HR y 2030 lux de intensidad de luz.

Se evaluó la gravedad del mildiu polvoriento del pepino utilizando una clave pictórica; 0 = sin infección (todas las hojas parecían estar sanas) y 100 = todas las hojas estaban cubiertas con síntomas de mildiu polvoriento. Se evaluó la gravedad en tres de las seis diferentes alturas de la planta y se hizo el promedio de toda la planta. Se observó la mayor parte de los síntomas de la enfermedad en las hojas y no en ninguna otra parte de la planta, de manera que se llevó un seguimiento de la infección en la hoja.

Tratamiento con melanoidinas

El tratamiento con melanoidinas consistió en la pulverización o empapamiento a 3 ml/planta. Las plantas de control no se infectaron, se trataron con agua y se mantuvieron en las mismas condiciones que se ha mencionado.

Análisis estadístico

Se replicaron los tratamientos 5-10 veces. Se dispusieron los replicados de cada uno de los tratamientos aleatoriamente. Antes de cualquier otro análisis, se realizó la transformación de arcoseno de los datos en porcentaje de la gravedad de la enfermedad. Se analizaron los datos de la gravedad de la enfermedad por ANOVA y prueba LSD protegida de Fisher. Se calcularon los errores típicos (SE) de las medias y se separaron estadísticamente los niveles de la enfermedad ($P \leq 0,05$) siguiendo un análisis de una vía de varianza. Un experimento de control presenta la gravedad de la enfermedad con la aplicación de agua solamente sin la melanoidina.

Experimentos de tolerancia a la sequía**Plantas**

Se cultivaron tomates a partir de semillas y se trasplantaron a tiestos de 1 litro que contenían perlita a los 40 a 50 días de la siembra. Se fertigarón las plantas proporcionalmente con goteros 2-3 días por día con fertilizante NPK 5:3:8 (se planificó que el agua de riego tuviera concentraciones de N, P y K de 120, 30 y 150 mg/l, respectivamente; CE 2,2 dS/m), permitiendo un drenaje de 25-50 %. Se mantuvieron las plantas a entre 20 y 30 °C en un invernadero sin plagas ni enfermedades durante un período de crecimiento de dos meses y después se transfirieron a un área en el que no se utilizó riego, la temperatura era de 22 ± 1 °C, la duración de la iluminación fue de 12 h/día y se encerró el volumen total del tiesto en una bolsa de plástico para evitar la evaporación desde la zona de las raíces.

Tratamientos y evaluaciones

Durante un período de 21 días sin riego, se llevaron a cabo las mediciones de la longitud de la hoja (en cm), el área del foliolo terminal (cm^2), el peso de la planta (en gramos) y la gravedad del marchitamiento (en una escala de 0 a 100 % en la que 0 = sin marchitamiento y 100 = planta totalmente marchitada).

Al cabo de 3 semanas sin riego, se regaron las plantas para la capacidad del terreno, se dejaron recuperar y ganar turgencia durante 4 horas y después se midió la gravedad del marchitamiento de nuevo y se hizo el recuento del número de hojas vivas.

Se pulverizó la solución de melanoidinas sobre las plantas o se aplicó por empapamiento de la zona de la raíz en concentraciones de 0,01 y 0,1 % 3 días antes y el día en que se detuvo el riego (-3 y 0). Por otra parte, en algunos experimentos los tratamientos de pulverización incluyeron dos pulverizaciones más los días 7 y 14 una vez detenido el riego (+7, +14). El volumen de solución aplicada en el empapamiento fue 5 ml y 2 ml en pulverización por planta. Se trataron las plantas de control con empapamiento o pulverización de agua de la misma forma que los tratamientos con melanoidinas. Se utilizó M1 en este experimento. Se disolvieron las melanoidinas en agua a la concentración deseada.

Experimentos de crecimiento**Plantas**

5 Se obtuvieron semillas de tomate de aproximadamente 30-40 días de un vivero y se trasplantaron a tiestos de 10 litros especialmente diseñados, según lo cual se forró el tercio inferior con lana de fibra de vidrio dejando una tubería de drenaje también rellena de lana de fibra de vidrio. El fin de la lana de fibra de vidrio fue mejorar el drenaje del medio de crecimiento que fue arena de cuarzo limpia. Se fertilizaron las plantas (fertilizadas a través del agua de riego) proporcionalmente con goteros 2 veces al día de acuerdo con las necesidades de la planta. Se llevó un seguimiento de la conductividad eléctrica (CE) de las aguas residuales de forma rutinaria y se ajustó la cantidad de riego para que la CE de las aguas residuales fuera igual a la CE de entrada, permitiendo así suficiente aplicación de agua y evitando la acumulación de sales en la arena.

Tratamientos y evaluaciones

15 La solución de fertilizante consistió en 0,2 % de fertilizante, 4-2,5-6 (N-P₂O₅-K₂O; para dar 80:50:120 mg/l en solución). El fertilizante también contenía 2 % Ca, 0,5 % Mg y otros microelementos. Se fertilizó la mitad de las plantas con una solución fertilizante a la que se había añadido 0,001 % (10 mg/l) de M1 y la otra mitad recibió únicamente fertilizante. Hubo 7 plantas replicadas por tratamiento. Se cultivaron las plantas en una cámara neta durante un período de 48 días tras ser trasplantadas.

El contenido en N total de M1 es 7 % lo cual significa que se añadieron 0,7 mg/l más de N a la solución fertilizante. Se trata de una cantidad insignificante en comparación con el N del fertilizante (80 mg/l).

Ejemplo 1:**Efecto de varias soluciones de melanoidinas en la gravedad de moho gris en plantas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea***

30 Se infectaron plantas con una suspensión de *Botrytis cinerea* (tal como se describe en la sección "Materiales y Métodos") 25 días después de plantarlas. Se pulverizaron o se empaparon con soluciones de varios tipos de melanoidina (véase Tabla 1 para la clave) a 0,1 % (0,1 g de melanoidinas por cada 100 ml) dos veces, 3 días y 1 hora antes de la infección. Se evaluó la gravedad de la enfermedad 11 días tras la infección y la incubación en condiciones de un alto grado de humedad.

35 Se observó que las soluciones pulverizadas M1-M3 y M6-M8 sobre las plantas de tomate fueron eficaces para disminuir la gravedad de la enfermedad. La aplicación por empapamiento con las soluciones M1 y M3 fue superior en la eliminación de la enfermedad en comparación con otras soluciones (Fig. 1).

Ejemplo 2:**Efecto de la pulverización de soluciones de varios tipos de melanoidina sobre la gravedad de mildiu polvoriento en plantas de tomate infectadas con in *Oidium neolycopersici***

45 Se infectaron plantas de tomate con *Oidium neolycopersici* (tal como se indica en la sección de "Materiales y Métodos") 33 días después de plantarlas. Se trataron las plantas dos veces por pulverización de soluciones 0,1 % de melanoidinas (véase Tabla 1 para la clave) 3 días y 1 hora antes de la infección. Se llevó a cabo la evaluación de la gravedad de mildiu polvoriento del tomate a los 19 días tras la infección.

50 Se observó que la pulverización con 0,1 % de varias melanoidinas eliminó el mildiu polvoriento del tomate (Fig. 2).

Ejemplo 3:**Efecto de soluciones de varios tipos de melanoidina aplicados por pulverización y por empapamiento sobre la gravedad de mildiu polvoriento en plantas de tomate infectadas con *Oidium neolycopersici***

55 Se infectaron plantas de tomate con *Oidium neolycopersici* 35 días después de plantarlas. Se trataron las plantas por empapamiento o por pulverización de soluciones de melanoidina al 0,1 % (ver Tabla 1 para la clave) 3 días y 1 hora antes de la infección. Se llevó a cabo la evaluación de la gravedad de mildiu polvoriento del tomate a los 23 días tras la infección.

60 Se observó que la pulverización con soluciones 0,1 % de varios tipos de melanoidina eliminó el mildiu polvoriento del tomate, y además M1.1 y M2 fueron significativamente más eficaces.

65 Se observó asimismo que la aplicación por empapamiento con soluciones 0,1 % de M1.1 y M3.1 eliminó el mildiu polvoriento del tomate (Fig. 3).

Ejemplo 4:**Efecto de la pulverización de soluciones de varios tipos de melanoidina sobre la gravedad de mildiu polvoriento en plantas de tomate infectadas con *Oidium neolycopersici***

Se infectaron plantas de tomate con *Oidium neolycopersici* 30 días después de plantarlas. Se trataron las plantas por pulverización de soluciones 0,1 % de melanoidinas 3 días y 1 hora antes de la infección. Se llevó a cabo la evaluación de la gravedad de mildiu polvoriento del tomate a los 18 días tras la infección.

Se observó que la pulverización con soluciones 0,1 % de varios tipos de melanoidina eliminó el mildiu polvoriento del tomate (Fig. 4).

Ejemplo 5:**Efecto de la concentración de melanoidinas en la gravedad de mildiu polvoriento en plantas de tomate infectadas con *Oidium neolycopersici***

Se aplicaron soluciones de dos tipos de melanoidinas por pulverización a dos concentraciones. Se infectaron las plantas con una suspensión de conidios de *Oidium neolycopersici* 20 días después de plantarlas. Se aplicaron soluciones de melanoidina a un intervalo de concentración de 0,03-0,1 % dos veces, 3 días y 1 hora antes de la infección. Se evaluó la enfermedad 42 días tras la infección.

Se observó que ambas concentraciones de los dos tipos de melanoidinas (véase Tabla 1 para la clave) aplicadas por pulverización fueron eficaces para eliminar el mildiu polvoriento del tomate (Fig. 5).

Ejemplo 6:**Efecto de melanoidinas HMW en la gravedad de moho gris en plantas in plantas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea***

Se comparó la acción de melanoidinas limpiadas y fraccionadas (preparadas tal como se ha descrito) con la de melanoidinas regulares para determinar si los reactivos residuales de bajo peso molecular u otros productos de reacción de Maillard de bajo peso molecular podían ser responsables de la eliminación de la enfermedad, más que las melanoidinas poliméricas. Se aplicaron ambos tipos ("limpiados" y "no limpiados") por pulverización o empapamiento. Se infectaron las plantas utilizando una suspensión de conidios de *Botrytis cinerea* 40 días después de la plantación. Se aplicaron soluciones de melanoidina a una concentración de 0,03 % dos veces, 3 días y 1 hora antes de la infección. Se evaluó la enfermedad 7 días tras la infección y la incubación en condiciones de un alto grado de humedad relativa.

Se observó que ambas preparaciones de melanoidina, la "limpiada" y la "no limpiada", fueron igualmente eficaces para eliminar el moho gris del tomate. La solución de melanoidina HMW fue eficaz para controlar la enfermedad cuando se aplicó por pulverización o empapamiento (Fig. 6). Este experimento demuestra que las melanoidinas son de hecho el componente activo, a diferencia de cualquier reactivo residual (posible) o producto de Maillard de bajo peso molecular.

Ejemplo 7:**Efecto del empapamiento y la pulverización de soluciones de varios tipos de melanoidina en el desarrollo de mildiu polvoriento por *Podosphaera xanthii* en plantas de pepino**

Se trataron plantas de pepino con melanoidinas 3, 11 y 18 días después de plantarlas. Se evaluó el mildiu polvoriento por *Podosphaera xanthii* que se desarrolló de forma natural en las plantas durante 23 días después de plantarlas.

Se observó que se había eliminado el mildiu polvoriento por empapamiento con soluciones 0,1 % de varios tipos de melanoidina (véase Tabla 1 para la clave) y por pulverización de soluciones 0,03-0,1 % de varios tipos de melanoidina (Fig. 7).

Ejemplo 8:**Efecto de solución HMW y sin fraccionar de un tipo de melanoidina sobre la gravedad de mildiu polvoriento por *Podosphaera xanthii* en plantas de pepino infectadas**

Se infectaron plantas de pepino con *Podosphaera xanthii* 33 días después de plantarlas. Se aplicaron soluciones HMW y sin fraccionar de melanoidina por empapamiento a una concentración de 0,03 %. Se evaluó la gravedad de la enfermedad durante 36 días tras la infección.

Se observó que tanto la solución HMW como la no limpiada de un tipo de melanoidina (véase Tabla 1 para la clave) eliminó significativamente la gravedad del mildiu polvoriento del pepino cuando se aplicó por empapamiento de soluciones 0,03 % (Fig. 8).

5 **Ejemplo 9:**

Efecto de melanoidinas en el peso de la planta en condiciones de sequía

10 Se trataron plantas de tomate con una solución 0,01-0,1 % de M1 o agua (control) o bien pulverizando la cubierta foliar o bien por empapamiento de la zona de las raíces. Tres semanas después de detener el riego, el peso de las plantas aumentó en el caso del tratamiento por empapamiento (Fig. 9) y de los tratamientos por pulverización que se aplicaron los días -3, 0, 7 y 14 en relación con el cese del riego (Fig. 10).

15 Los resultados demuestran que continúa el crecimiento de las plantas en el tratamiento con melanoidina a pesar de la falta de riego.

Ejemplo 10:

Efecto de melanoidinas en el crecimiento de la hoja en condiciones de sequía

20 Se trataron plantas de tomate con una solución 0,01-0,1 % de M1 o agua (control), o bien pulverizando la cubierta foliar o bien por empapamiento de la zona de las raíces. Dos semanas después de detener el riego, había aumentado la longitud de la hoja con los tratamientos de empapamiento y pulverización aplicados los días -3, 0 en relación con el cese del riego. (Fig. 11).

25 Los resultados demuestran que continúa el crecimiento de las plantas tratadas con las soluciones de melanoidina a pesar de la falta de riego.

Ejemplo 11:

30 **Efecto de melanoidinas en el marchitamiento de la planta después de volver a regar tras la sequía**

35 Se trataron plantas de tomate con una solución 0,01-0,1 % de M1 o agua (control), bien pulverizando la cubierta foliar o bien por empapamiento de la zona de las raíces. Se dejaron sin regar las plantas 21 días y después se volvieron a regar. Cuatro horas después de volverlas a regar, se evaluaron la gravedad del marchitamiento (Fig. 12) y el número de hojas vivas (Fig. 13). Los tratamientos de pulverización y de empapamiento con soluciones de melanoidina redujeron la gravedad del marchitamiento de las plantas de tomate (Fig. 12) y la pérdida de las hojas (Fig. 13).

40 Los resultados demuestran el efecto positivo de las melanoidinas en la recuperación de las plantas afectadas por la sequía.

Ejemplo 12:

45 **Efecto de melanoidinas en la altura de la planta, el número de nudos y la longitud de la hoja**

50 Se fertilizaron plantas de tomate con una solución fertilizante que tenía 0,001 % (10 mg/L) M1 o una solución fertilizante en solitario como control. La adición de M1 a la solución fertilizante de forma regular tuvo un efecto continuado y positivo sobre el crecimiento de la planta, tal como se expresó por lo que respecta a la altura de la planta (Fig. 14A), el número de nudos (Fig. 14B), y longitud de la hoja (Fig. 14C). El aumento del número de nudos y el tamaño de la hoja que acompañaron al aumento de la altura de la hoja indican que aunque las plantas fueron más altas con el tratamiento con melanoidina, no fueron etioladas.

Ejemplo 13:

55 **Efecto de melanoidinas sobre el número de flores en plantas de tomate**

60 Se fertilizaron plantas de tomate con una solución fertilizante que tenía 0,001 % (10 mg/l) de M1 o la solución fertilizante en solitario como control. En la Fig. 15 se muestra el número de flores por planta a partir de los 33 días de trasplantarlas. Los resultados demuestran un número de flores significativamente mayor en las plantas tratadas con melanoidina.

Ejemplo 14:**Efecto de melanoidinas aplicadas en solución de fertigración sobre la gravedad de moho gris en plantas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea***

Se fertilizaron plantas de tomate con una solución fertilizante que tenía 0,001 % (10 mg/l) de M1 o una solución fertilizante en solitario como control. Se desprendieron las hojas de las plantas 4 semanas después de trasplantarlas y 8 semanas después de trasplantarlas. Se infectaron las hojas desprendidas con una suspensión de *Botrytis cinerea* (tal como se describe en la sección "Materiales y Métodos").

Se observó que M1 proporcionado en el agua fertilizante protegió las plantas de tomate frente a la infección de moho gris tanto a las 4 semanas como a las 8 semanas después del trasplante, lo que demuestra que es eficaz a lo largo de toda la vida de la planta (Fig. 16).

Ejemplo 15:**Caracterización de melanoidinas por UV-Vis**

Se midieron los espectros de absorbancia UV-Vis de 100 mg/l de soluciones de melanoidina en agua doblemente destilada en un espectrofotómetro UV-Vis ThermoScientific (Genesys 10 UV) a entre 190 y 700 nm.

Los resultados presentados en la Fig. 17 muestran que los espectros para todas las soluciones de melanoidina son muy similares, demostrando la máxima absorbancia a aproximadamente 200 nm seguido de un marcado descenso de la absorbancia de aproximadamente 240 nm, un aumento de la absorbancia a aproximadamente 280-290 nm y un descenso gradual a 700 nm.

Ejemplo 16:**Caracterización de melanoidinas mediante el espectro de excitación-emisión de fluorescencia**

Se recogieron los espectros de diferentes melanoidinas (M1, M3, M7 y M9) en un espectrofluorómetro de Shimadzu RF-5301PC a lo largo de intervalo de excitación de 210-590 nm y el intervalo de emisión de 220 a 600 nm. Ranura de excitación y emisión de 5 nm, a una alta sensibilidad, resolución de 2 nm y aumento de 5 nm. Las soluciones acuosas fueron 22 mg/l.

Los resultados presentados en las Fig. 18A (M1), Fig. 18B (M3), Fig. 18C (M7) y Fig. 18D (M9) demuestran que todos los espectros son muy similares, con un pico dominante en las longitudes de onda de excitación/emisión de 350/425 nm, un pico secundario a las longitudes de onda de excitación/emisión de 225/450 nm y un pequeño aumento terciario a las longitudes de onda de excitación/emisión de 275/360 nm.

Ejemplo 17:**Caracterización de melanoidinas: solubilidad acuosa a 25 °C**

Se observó que las diferentes melanoidinas (M1 y M3) tenían una solubilidad de >70 g/100 ml de agua a 25 °C.

La alta solubilidad en agua demuestra la naturaleza esencialmente hidrófila de las melanoidinas y refleja su origen como un producto de reacción entre azúcares hidrófilos y aminoácidos.

Ejemplo 18:**Caracterización de melanoidinas: tensión superficial acuosa de M1 en función de la concentración**

Se midió la tensión superficial a 20 °C con un microtensiómetro Delta-Pi (Kibron, Helsinki, Finlandia) basándose en el método Wilhelmy y utilizando un alambre de aleación especial de pequeño diámetro (0,51 mm).

De acuerdo con los resultados presentados en la Fig. 19, las melanoidinas tienen una actividad superficial muy reducida, tal como lo demuestra el hecho de que a concentraciones de hasta 1000 mg/l, la tensión superficial de la solución no se reduce significativamente por debajo de la del agua pura (72,8 mN/m a 20 °C). Incluso en su mayor concentración, aproximadamente 100 g/100 ml, se reduce solamente la tensión superficial de la solución de melanoidina a aproximadamente 45 mN/m. Este comportamiento puede contrastarse con tensioactivos que pueden reducir sustancial y significativamente la tensión superficial del agua cuando están presentes a concentraciones muy bajas. Los tensioactivos son compuestos orgánicos anfífilos, lo que significa que pueden tener tanto grupos hidrófobos como grupos hidrófilos en la molécula, permitiendo que se acumulen en la superficie del agua y reduzcan la tensión superficial. Las melanoidinas, en correspondencia con su alta solubilidad en agua no son anfífilas y no se acumulan fácilmente en las superficies agua-aire.

Ejemplo 19:

Caracterización de melanoidinas: FTIR

- 5 Se registraron los espectros de absorbancia de FTIR en aglomerados de KBr preparados con 0,3 % p/p de melanoidinas en KBr a entre 400 y 4000 cm^{-1} con cien barridos promediados con una resolución de 4 cm^{-1} (Espectrómetro de FTIR Bruker Tensor 27).
- 10 Los resultados presentados en la Fig. 20 indican que todas las diferentes preparaciones de melanoidinas (M1, M3, M7, y M9) son similares. Los espectros FTIR retienen las características generales de las del (los) azúcar(es) precursor(es) con ciertos cambios como consecuencia de la reacción con aminoácidos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mejorar la resistencia de la planta a un patógeno fúngico, la tolerancia a la sequía o el crecimiento de la planta que comprende las etapas de:
- 10 a. preparar una composición que comprende melanoidinas por calentamiento de una mezcla homogénea de uno o más aminoácidos o un hidrolizado de proteína con uno o más azúcares de reducción o hidratos de carbono a lo largo de un intervalo de temperaturas de 50 a 300 °C en un sistema seco o en un disolvente seleccionado entre agua, alcohol, acetona u otro disolvente polar, y
- 15 b. proporcionar las melanoidinas a una planta o a una porción de la misma o a cualquier órgano de la planta, en cualquiera de las etapas del ciclo vital de las plantas a un intervalo de concentración de 10⁻⁵ a 5 % p/v.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha composición que comprenden melanoidinas se proporciona por pulverización, empapamiento, riego o en combinación con fertilizantes.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicha composición que comprende melanoidinas se proporciona una vez o más de una vez.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicha composición que comprende melanoidinas se proporciona al menos dos veces en diferentes días.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha planta pertenece a la familia de las solanáceas o la familia de las curcubitáceas.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho patógeno fúngico es un patógeno del mildiu polvoriento o un patógeno del moho gris.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho patógeno fúngico se selecciona entre *Oidium neolycopersici*, *Podosphaera xanthii* y *Botrytis cinerea*.
- 35 8. Un uso de una composición que comprende melanoidinas a un intervalo de concentración de 10⁻⁵ a 5 % p/v para mejorar la resistencia de la planta a un patógeno fúngico, la tolerancia a la sequía o el crecimiento de la planta, donde dicha composición se prepara por calentamiento de una mezcla homogénea de uno o más aminoácidos o un hidrolizado de proteína con uno o más azúcares de reducción o hidratos de carbono a lo largo de un intervalo de temperaturas de 50 a 300 °C en un sistema seco o en un disolvente seleccionado entre agua, alcohol, acetona u otro disolvente polar.
- 40 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicha planta pertenece a la familia de las solanáceas o a la familia de las curcubitáceas.
- 45 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde dicho patógeno fúngico es un patógeno del mildiu polvoriento o un patógeno del moho gris.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde dicho patógeno fúngico se selecciona entre *Oidium neolycopersici*, *Podosphaera xanthii* y *Botrytis cinerea*.

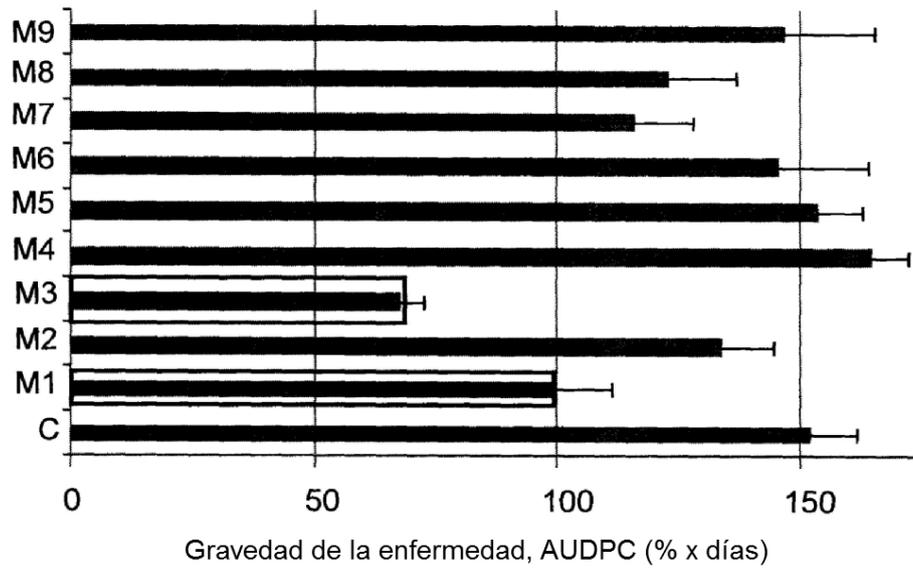


FIG. 1A

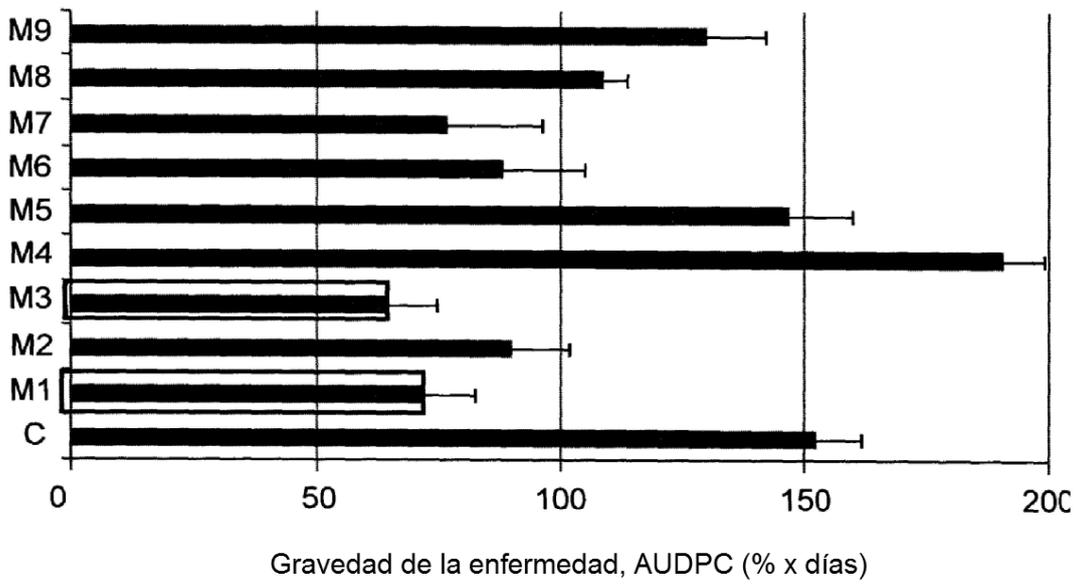


FIG. 1B

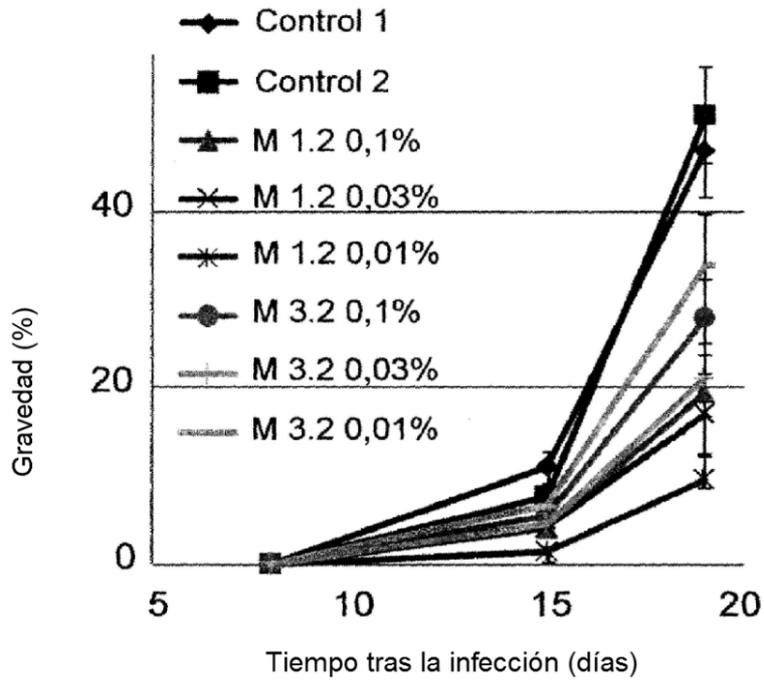


FIG. 2A

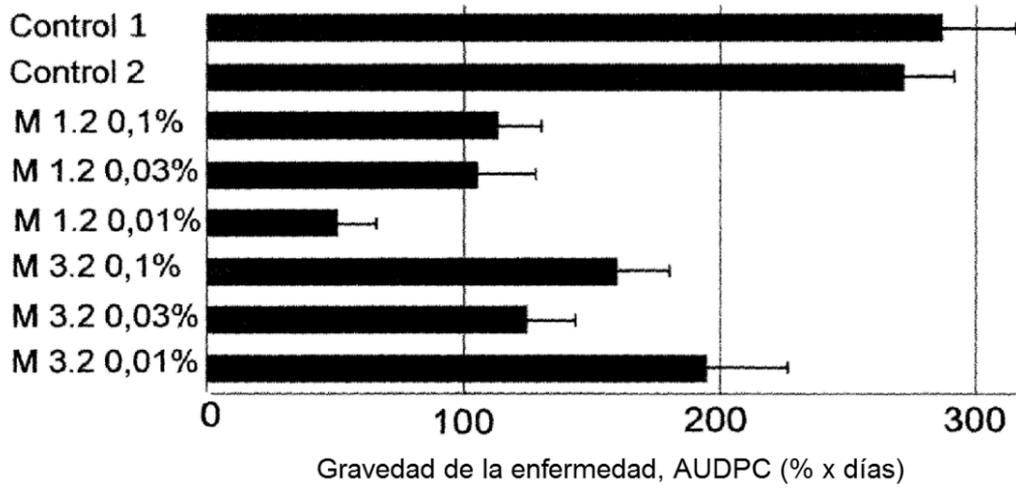


FIG. 2B

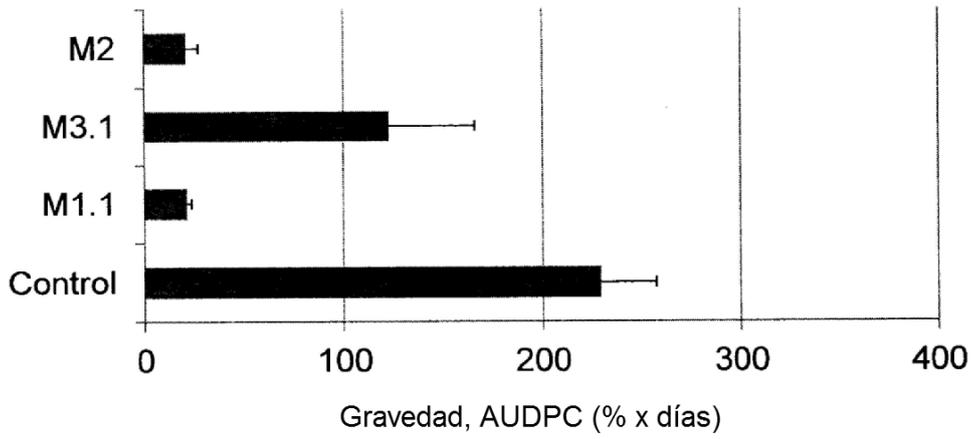


FIG. 3B

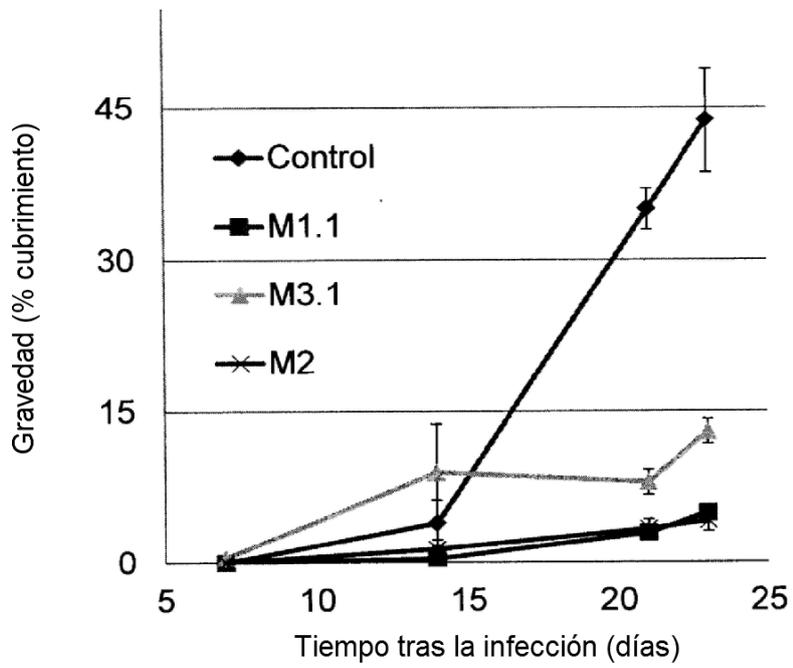


FIG. 3A

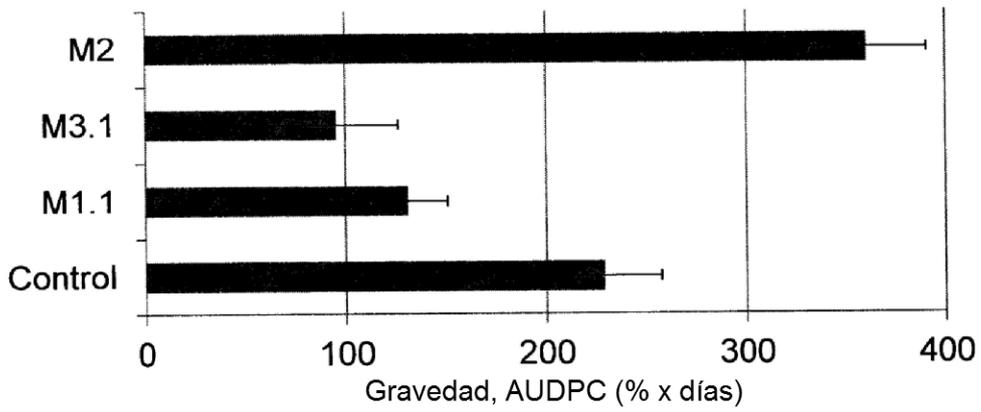


FIG. 3D

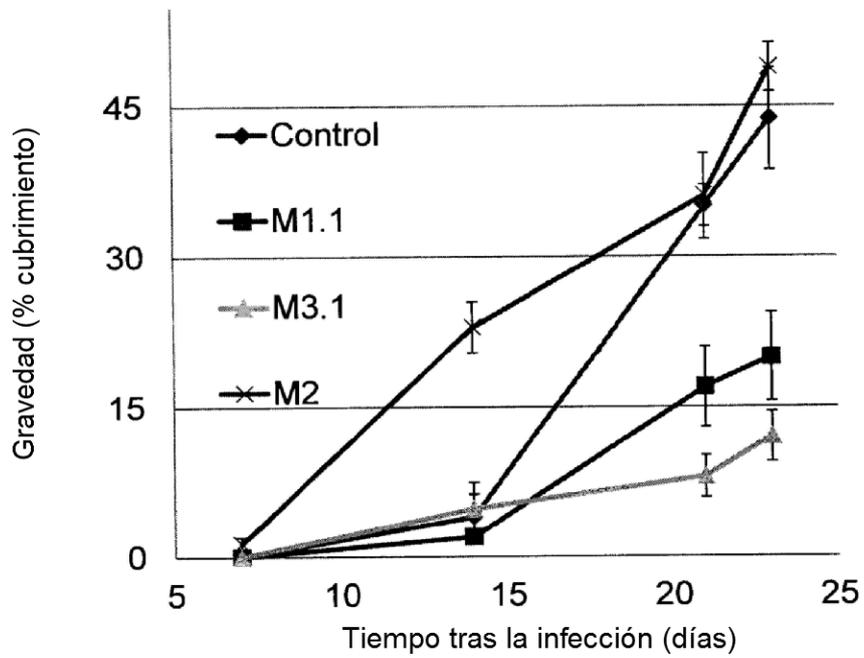


FIG. 3C

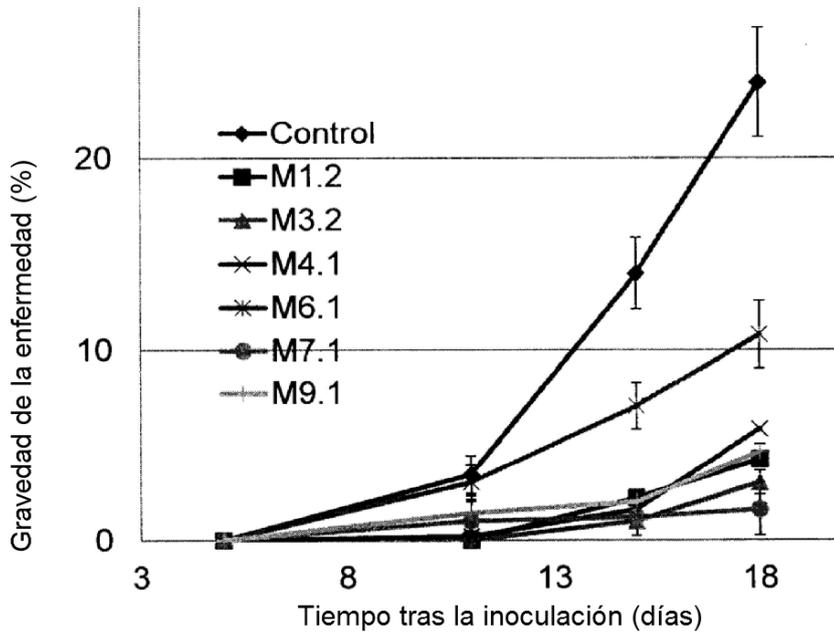


FIG. 4A

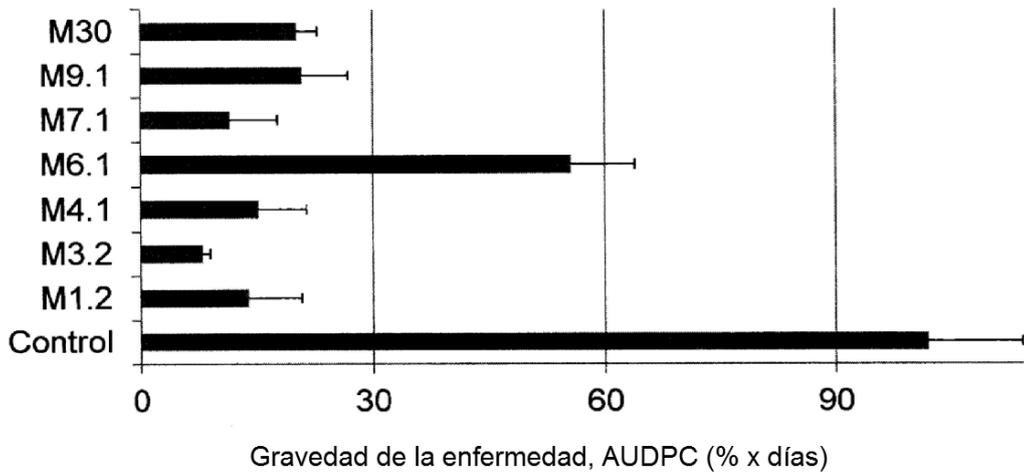


FIG. 4B

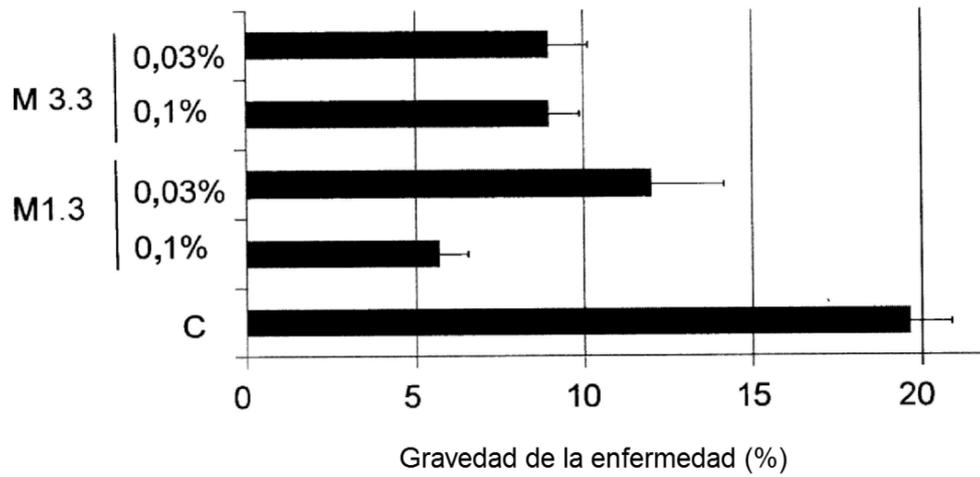


FIG. 5

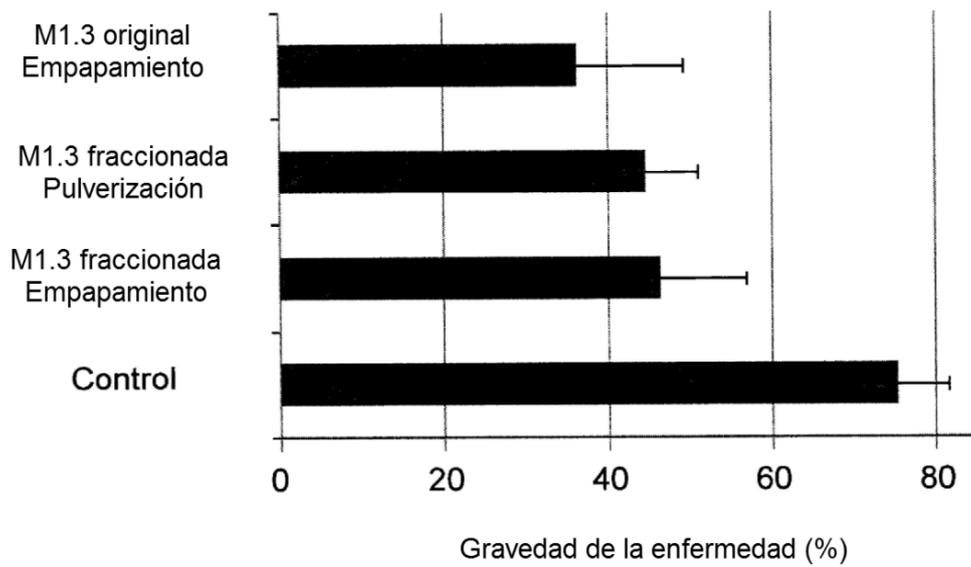


FIG. 6

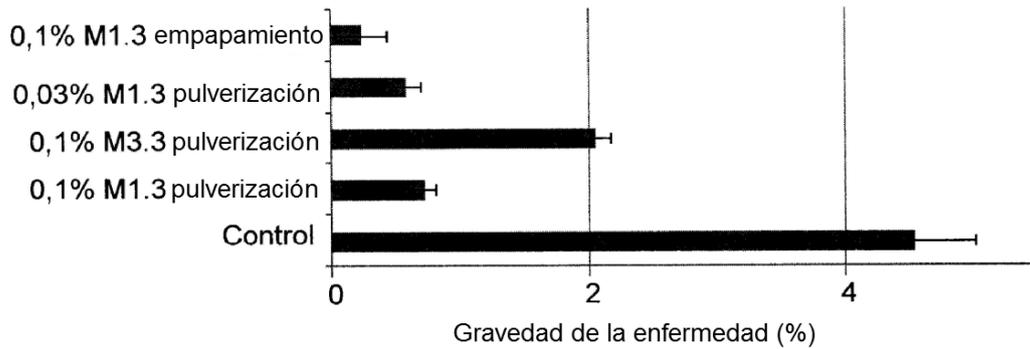


FIG. 7A

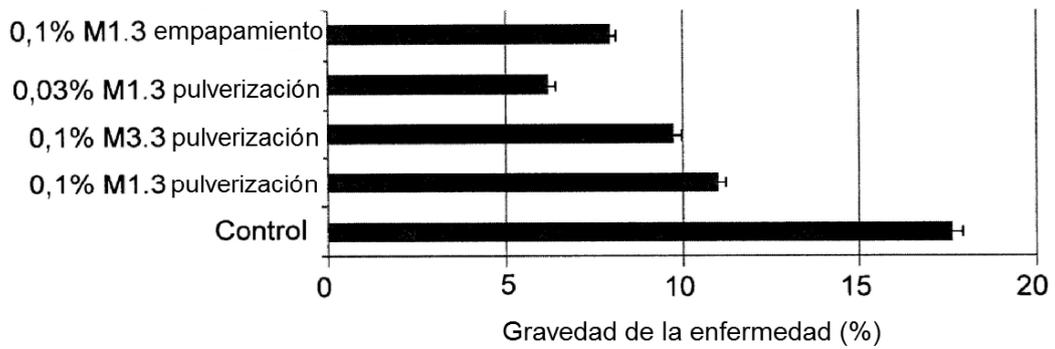


FIG. 7B

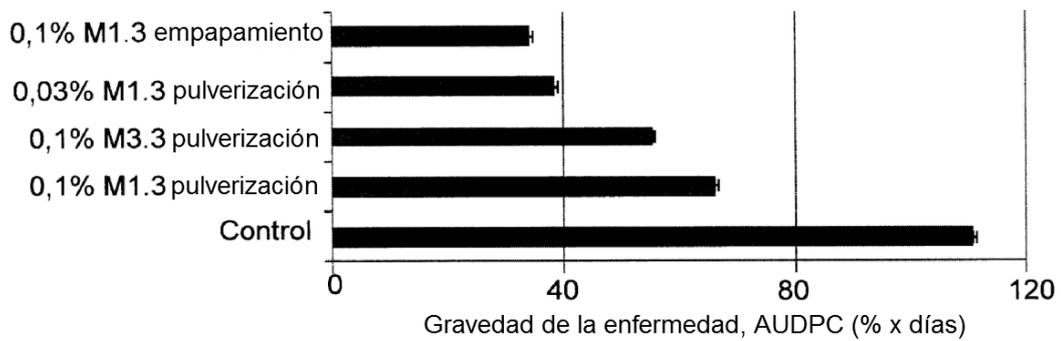


FIG. 7C

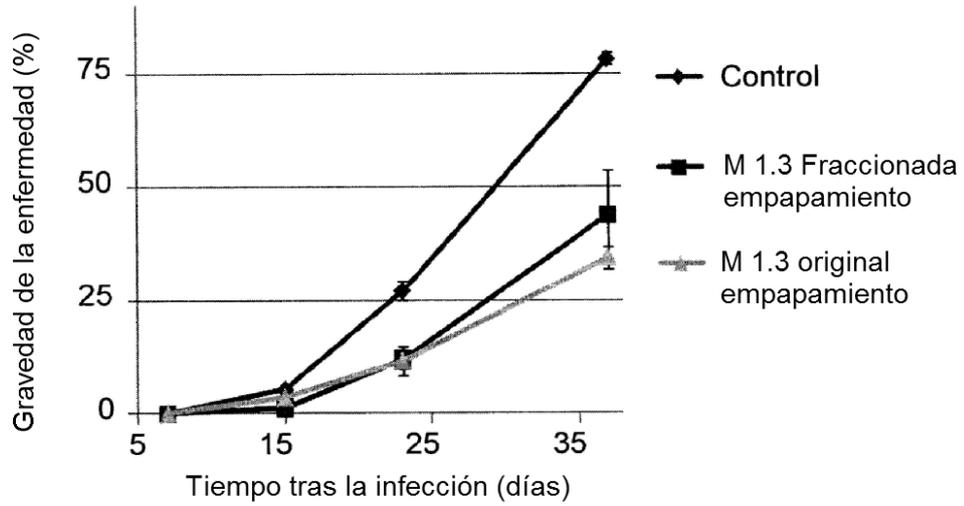


FIG. 8A

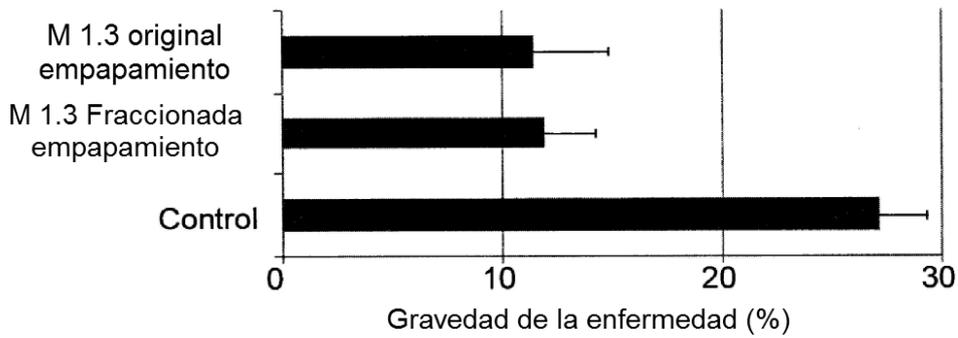


FIG. 8B

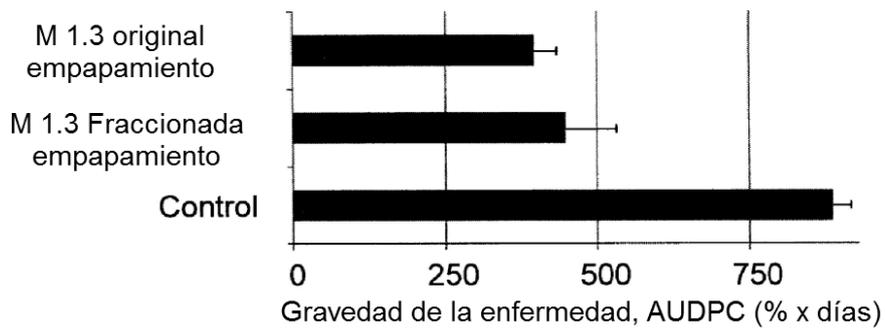


FIG. 8C

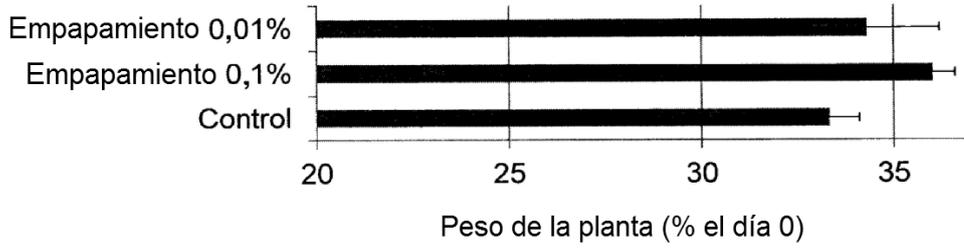


FIG. 9

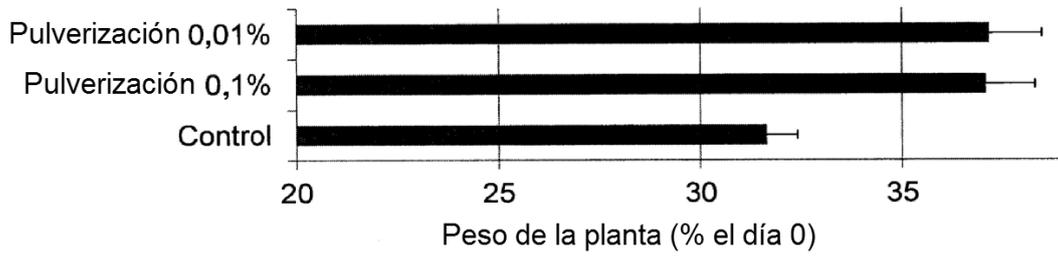


FIG. 10

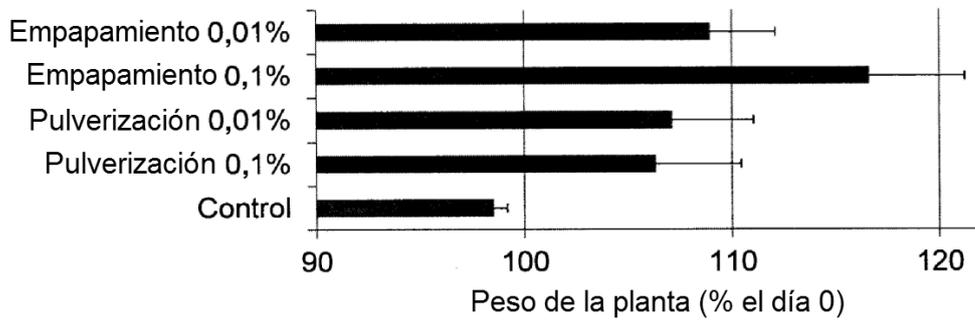


FIG. 11

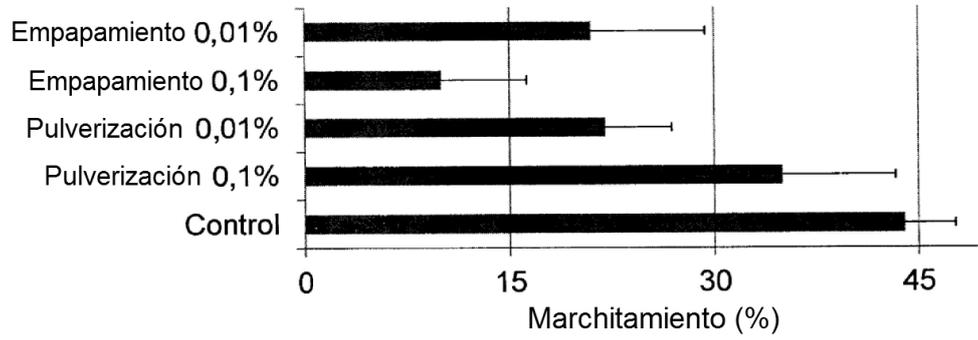


FIG. 12

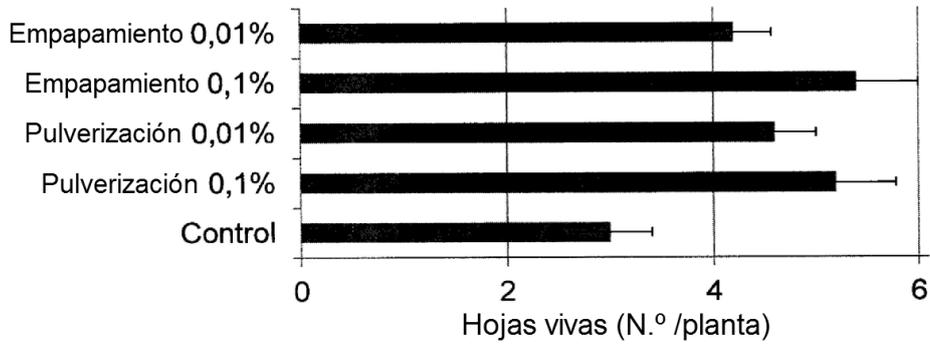


FIG. 13

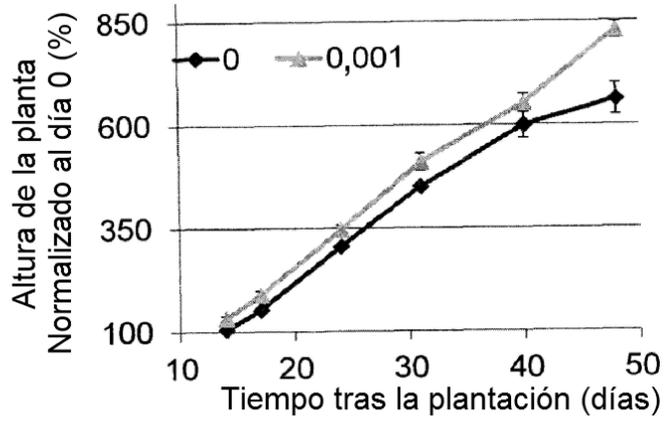


FIG. 14A

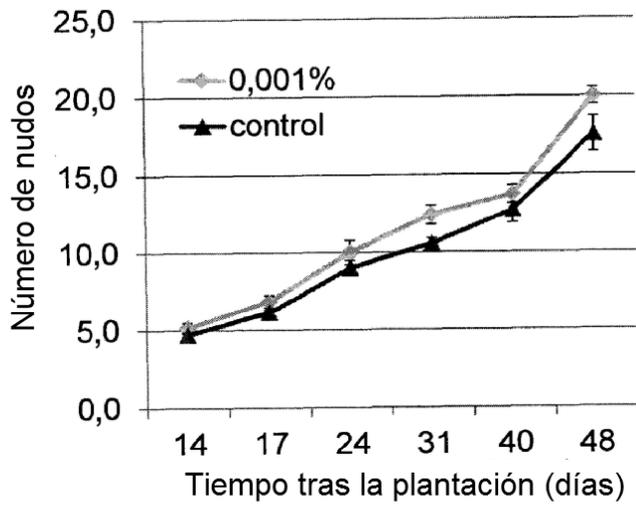


FIG. 14B

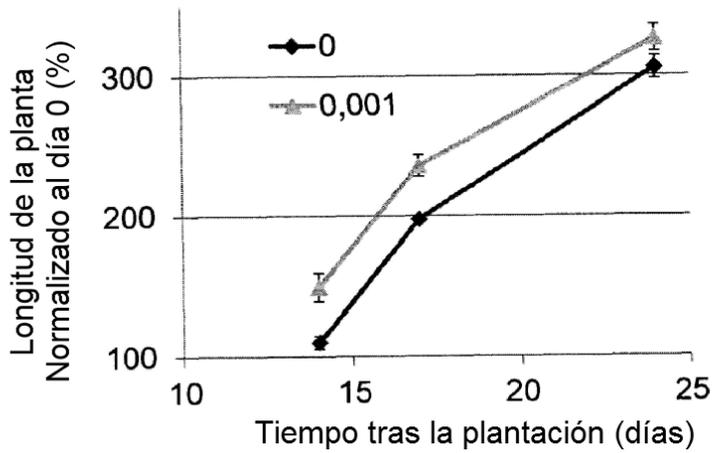


FIG. 14C

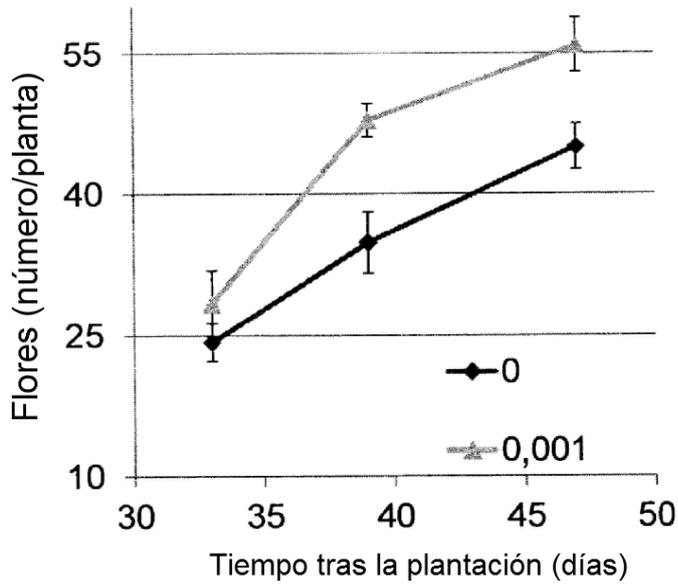


FIG. 15

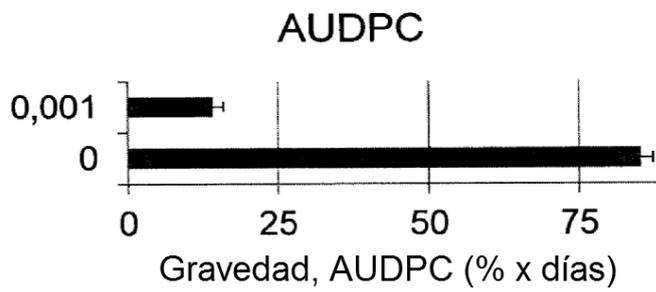


FIG. 16A

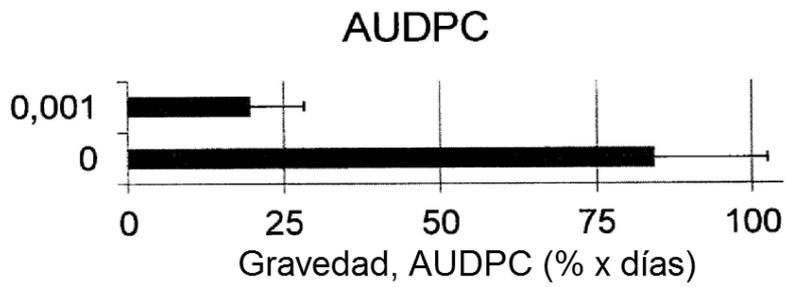


FIG. 16B

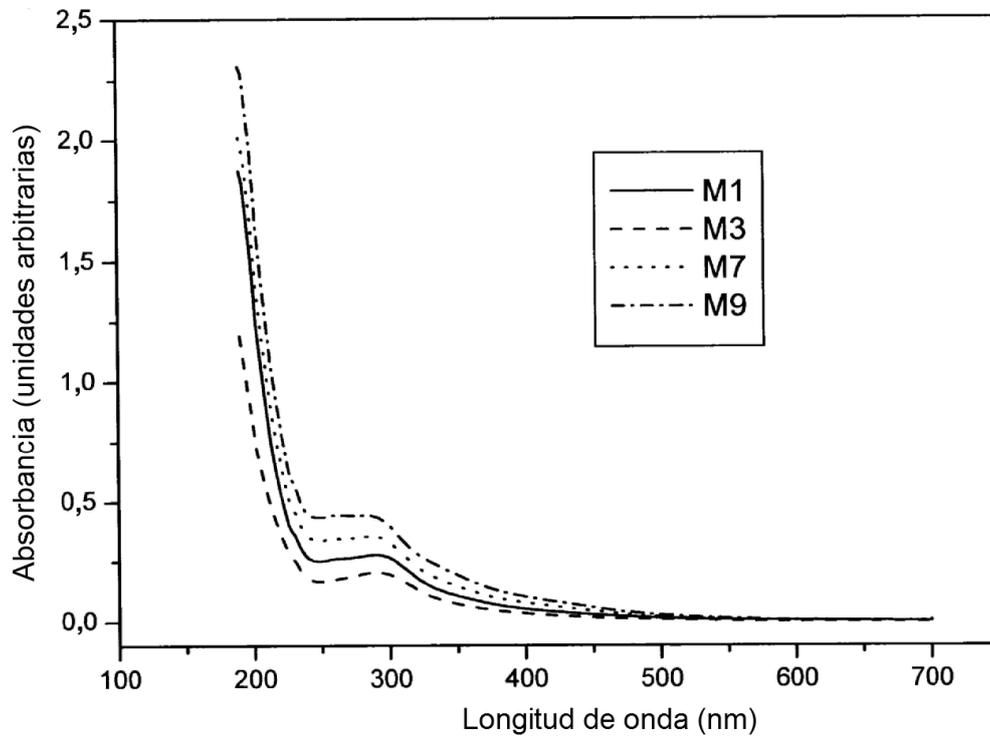


FIG. 17

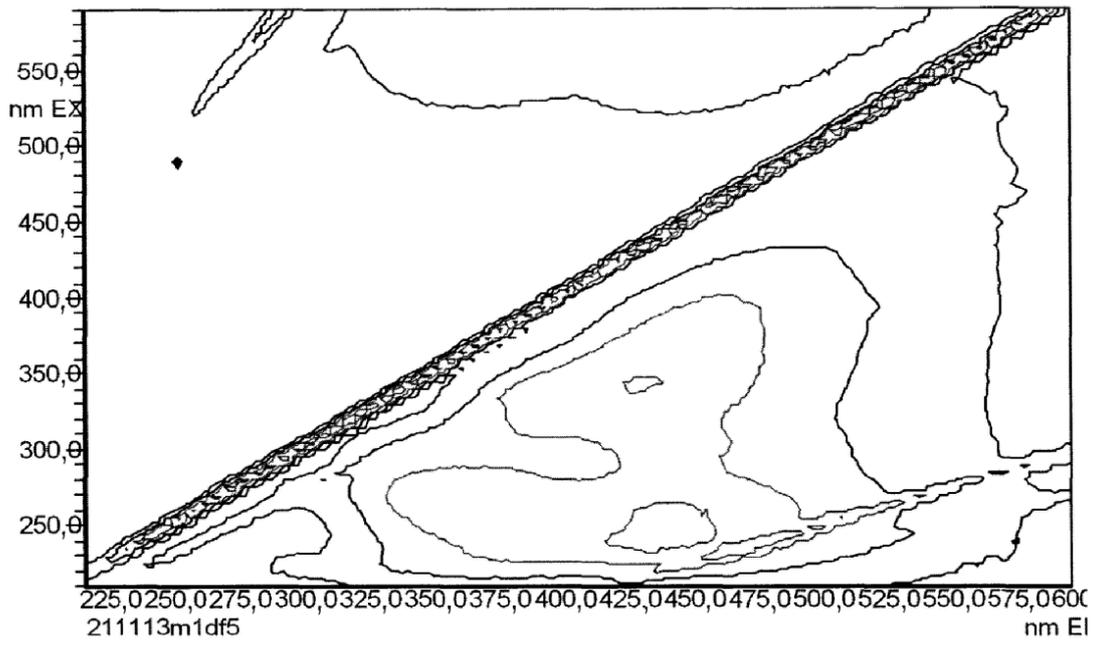


FIG. 18A

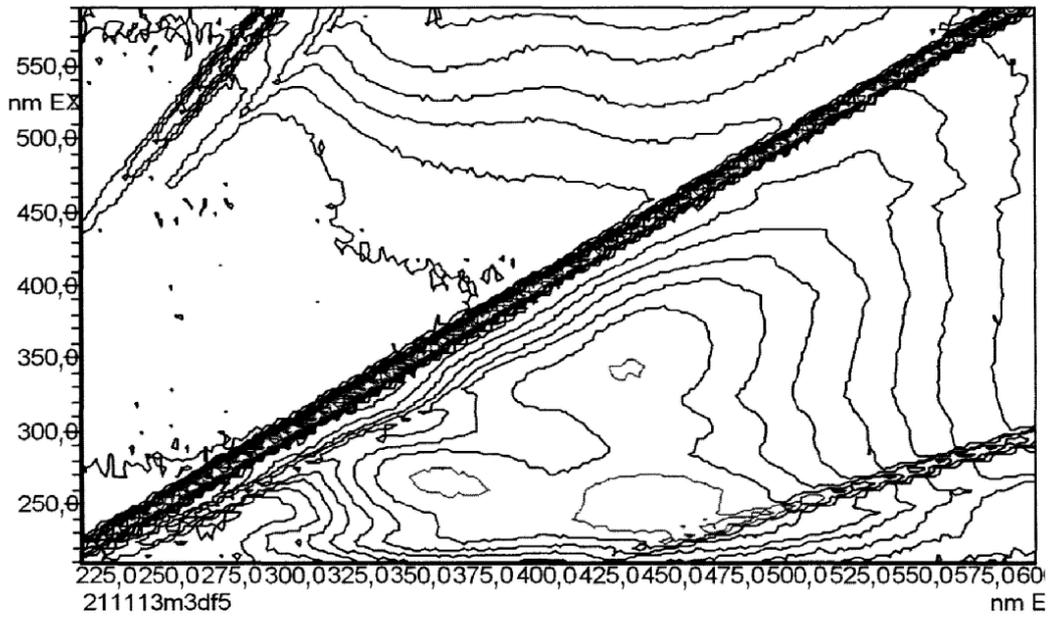


FIG. 18B



FIG. 18C

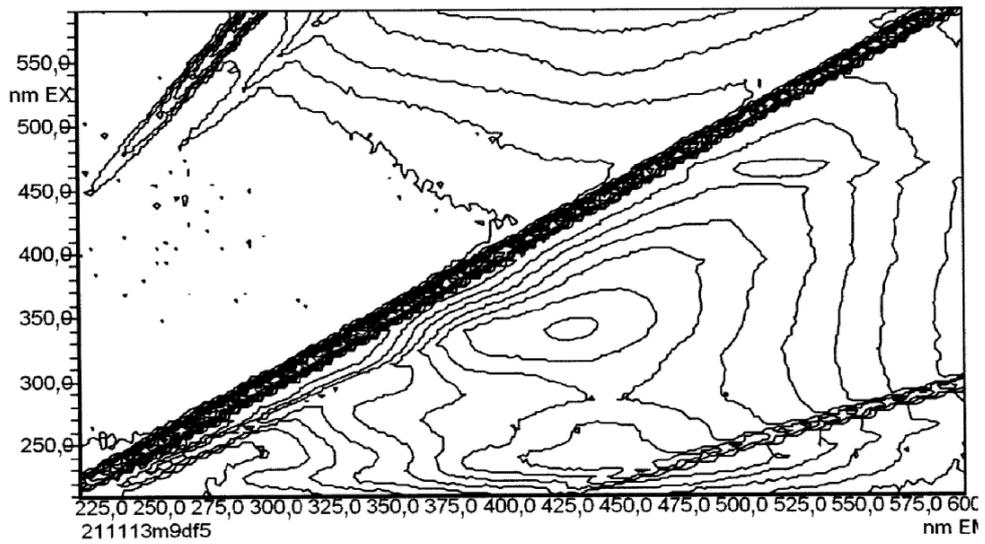


FIG. 18D

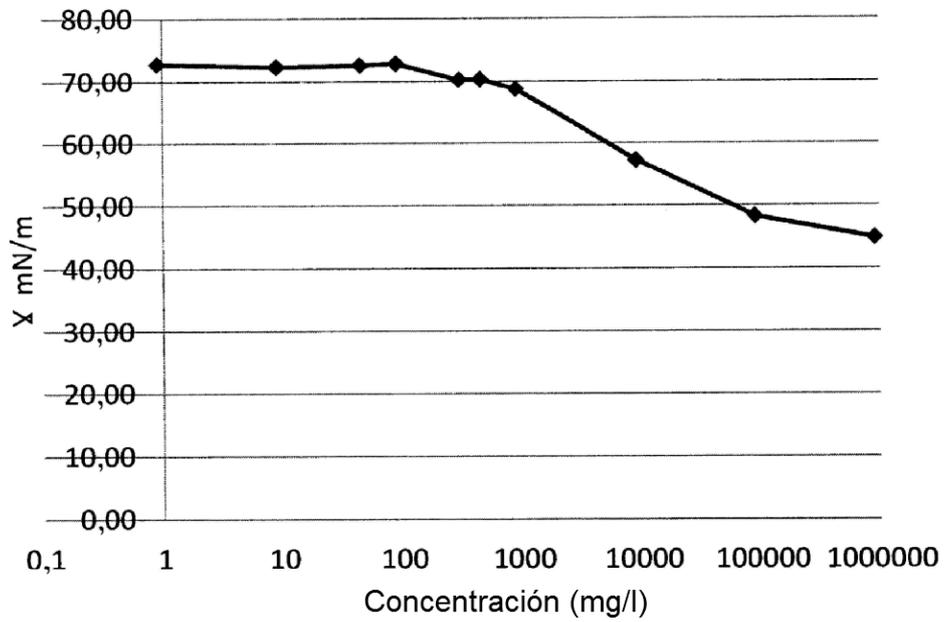


FIG. 19

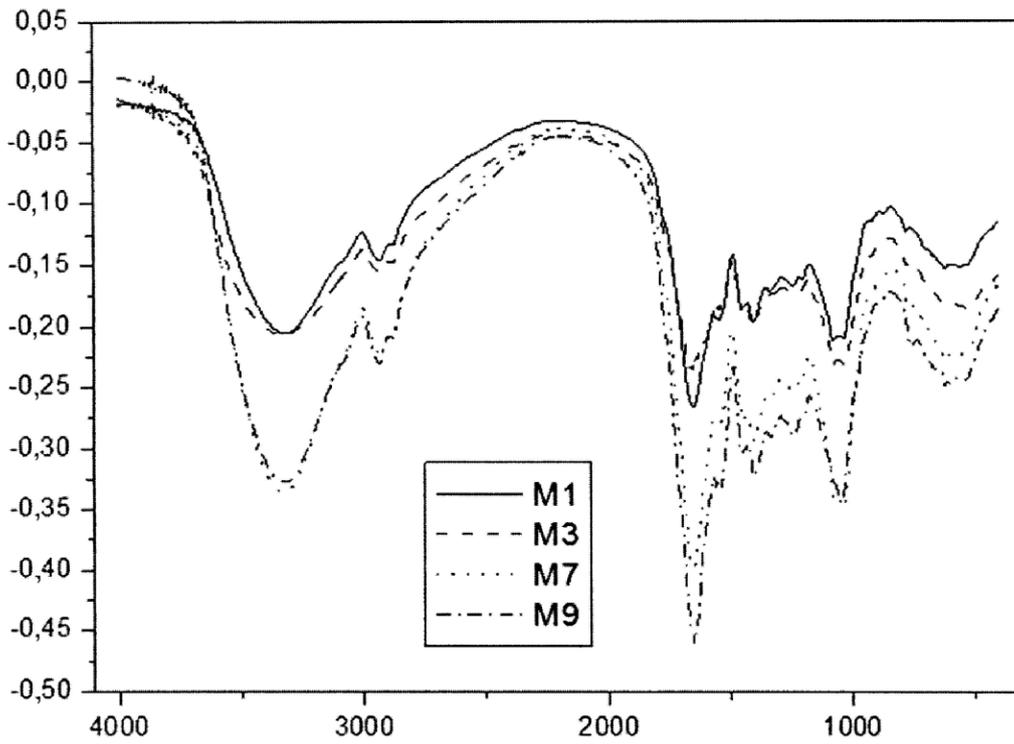


FIG. 20