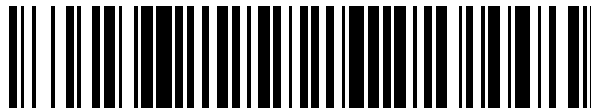


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 005**

51 Int. Cl.:

A01N 37/02 (2006.01)

A01N 37/06 (2006.01)

A01N 25/04 (2006.01)

A01N 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2007 PCT/IB2007/050580**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007 WO07096833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007 E 07713166 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 1988774**

54 Título: **Composición en forma de una microemulsión que contiene ácidos grasos libres y/o derivados de ácidos grasos libres**

30 Prioridad:

27.02.2006 ZA 200601725

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

11.10.2019

73 Titular/es:

**NORTH-WEST UNIVERSITY (100.0%)
1 Hoffman Street, Joon van Rooy Building
2531 Potchefstroom, ZA**

72 Inventor/es:

GROBLER, ANNE FREDERICA

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 727 005 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición en forma de una microemulsión que contiene ácidos grasos libres y/o derivados de ácidos grasos libres

- 5 **[0001]** Esta divulgación se refiere a una formulación de fomento de plantas que es en sí misma fitológicamente beneficiosa y que es también adecuada para uso como vehículo de suministro, o como componente de un vehículo de suministro, para uso en el suministro a una planta, y para distribución o translocalización en una planta, de una variedad de sustancias fitológicamente beneficiosas en forma de moléculas, compuestos, productos biológicos o químicos que tienen un efecto fitológicamente beneficioso para plantas [a las que se hace referencia colectivamente en la presente memoria como "sustancias fitológicamente beneficiosas"]. La expresión "fomento de plantas" se usa en la presente memoria para indicar que la formulación tiene la propiedad, sin la adición de otras sustancias fitológicamente beneficiosas para las que puede servir como vehículo de suministro, de tener un efecto estimulante del crecimiento sobre plantas en al menos uno de los estadios de crecimiento de una planta, para mejorar la producción o rendimiento de cultivo por la planta, o para mejorar la apariencia de la planta o para potenciar la resistencia a enfermedades en la planta. Se refiere también a procedimientos de producción de la formulación de fomento de plantas y vehículo de suministro, y a la preparación de diversas formulaciones que incorporan la formulación como vehículo de suministro y una cualquiera o más de una variedad de sustancias fitológicamente beneficiosas y a procedimientos de administración de tales sustancias fitológicamente beneficiosas a una planta implicando el uso del vehículo de suministro, que sirve entonces también para efectuar la translocación o distribución de las sustancias fitológicamente beneficiosas en o sobre la planta. Se apreciará o resultará evidente que la referencia a "efectos beneficiosos", como se aplica a una planta, ha de entenderse desde una perspectiva humana en que se pretenden incluir las sustancias fitotóxicas, tales como sustancias usadas como herbicidas en el control de plantas indeseables, dentro del grupo de sustancias a las que se hace referencia en la presente memoria como "sustancias fitológicamente beneficiosas".
- 10
- 15
- 20
- 25 **[0002]** Se aplican vastas cantidades de una gran variedad de sustancias a plantas con el fin de potenciar el crecimiento de plantas para mejorar la producción (en el caso de plantas de cultivo y de campo) o apariencia (en el caso de ornamentales) de las plantas. Tales sustancias incluyen el grupo definido anteriormente como sustancias fitológicamente beneficiosas. Incluye fertilizantes, tanto de variedad de macronutrientes como micronutrientes, estimulantes o reguladores del crecimiento y plaguicidas, incluyendo fungicidas, insecticidas y herbicidas. Como se usa en la presente memoria, la palabra "planta" pretende cubrir plantas terrestres y acuáticas, incluyendo plantas marinas y "ornamentales" pretende cubrir todas las plantas que no se pretende que produzcan un cultivo que tenga valor económico.
- 30
- [0003]** La aplicación de sustancias fitológicamente beneficiosas se considera generalmente como una técnica que necesita mejora, ya que un gran porcentaje de las sustancias aplicadas no se absorben ni se retienen sobre las plantas a las que se aplican. Aparte del desperdicio consiguiente de material costoso, y por ello el aumento innecesario del coste de producción causado por tal desperdicio, las sustancias no utilizadas también dan lugar a contaminación del suelo y los recursos hídricos.
- 35
- 40 **[0004]** Parece no haber referencia en la bibliografía al uso de un sistema de suministro biológico diseñado para abordar la administración potenciada de nutrientes específicos o reguladores del crecimiento para plantas y/o la translocación sistémica de tales nutrientes o reguladores del crecimiento por las plantas. Es conocido en el campo agrícola que los nutrientes y otras sustancias fitológicamente beneficiosas pueden formularse con los denominados agentes quelantes o adyuvantes. Al contrario que la presente invención, los agentes quelantes son un grupo claramente distinguible sin referencia a un sistema de suministro y se usan como fuentes de micronutrientes que se forman combinando un agente quelante con un metal mediante enlace coordinado. La estabilidad del enlace metal-quelato afecta a la disponibilidad para las plantas de los metales micronutrientes cobre, hierro, manganeso y cinc. Es un quelato eficaz aquel en que la tasa de sustitución del micronutriente quelado por otros cationes en el suelo es bastante baja, manteniendo por tanto el micronutriente aplicado en forma quelada. Los quelatos son generalmente aplicables solo a sustancias catiónicas. Se cree que un agente quelante, tal como EDTA, tiene un impacto negativo sobre el ambiente.
- 45
- 50
- 55 **[0005]** Según las prescripciones para quelatos en la Preliminary Organic Materials List de los California Departments of Food and Agriculture, los quelatos naturales están permitidos, pero los agentes quelantes sintéticos están limitados a uso solo con pulverizadores micronutrientes para una deficiencia documentada. Todos los demás usos de los quelatos sintéticos están prohibidos. EDTA, sulfonatos de lignina y ácidos lignosulfónicos se considera que son agentes quelantes sintéticos. Recientemente, se anunció un sistema de lanzadera para el suministro de cationes. El sistema de lanzadera consiste en polisacáridos de cadena larga que pueden complejar con nutrientes catiónicos en agrupaciones (nanoagrupaciones), volviendo así neutro el complejo de nutriente-quelato. Los quelantes (ligando de lanzadera) envuelven entonces los nutrientes agrupados y los lanzan a la pared celular, donde suministran sus nutrientes. Se cree que el suministro tiene lugar mediante un proceso aleatorio mediante el cual los poros en la planta y el ligando de lanzadera tanto se contraen como se expanden como resultado de la vibración térmica, un fenómeno natural. Se cree que cuando se sincronizan la contracción del quelante y la expansión del poro, se suministra el nutriente. Tras la descarga del mineral, el ligando de lanzadera es repelido de la superficie de la planta y es atraído de vuelta a la nanoagrupación, donde puede repetir el proceso una y otra vez. El sistema quelante de lanzadera puede
- 60
- 65

extenderse a otros cationes inactivos en el suelo. Sin embargo, el sistema sigue estando basado en el uso de quelatos, puede complejar solo con compuestos catiónicos y no penetra el tejido de la planta.

5 **[0006]** El aceite Cloak Spray comercializado en Sudáfrica por Nutri-Tech Solutions, es una combinación orgánica de aceite de colza prensado en frío emulsionado y aceite de pescado omega 3. El aceite Cloak se cree que es un esparcidor de alta calidad, adhesivo y sinérgico (véase a continuación) que se reivindica que mejora el desempeño de todos los fertilizantes foliares. Sin embargo, no se hacen reivindicaciones respecto a la translocación de sustancias en la planta o al suministro de otras sustancias o fertilización por el sistema de raíces de la planta.

10 **[0007]** El procedimiento más establecido de introducción de material o sustancias en células de planta es por pulverización de la sustancia en presencia de un agente humectante, esparcidor o adhesivo. Mediante esta técnica, se pulveriza material sobre hojas de plantas en presencia de un agente humectante que causaría la adhesión del material a la capa cerosa exterior de las hojas, aumentando así el tiempo de contacto entre el material para absorber por la planta y la hoja de planta misma. Aunque parte del material se incorpora, el agente humectante, que
15 habitualmente contiene un adherente, causa que las hojas se vuelvan pegajosas y atraigan el polvo, lo que a su vez puede conducir a la oclusión de los estomas. Se han descrito portadores para el sector agrícola, pero se refieren a procedimientos de aplicación y no a la potenciación de la acción del compuesto activo debido a un suministro aumentado a la célula u organismo diana. La aproximación más cercana a un sistema de suministro que puede usarse para superar barreras para entrar en plantas se encuentra en el uso de adyuvantes para potenciar la actividad de
20 algunos compuestos activos en las clases de herbicidas y hormonas.

[0008] Aunque estas técnicas funcionan adecuadamente en el entorno apropiado sobre algunos compuestos que se absorben fácilmente por las hojas, no se considera que sean generalmente adecuadas para el suministro efectivo de una serie de macronutrientes y micronutrientes, así de como un gran número de plaguicidas y reguladores
25 del crecimiento. Ha habido por tanto una necesidad largamente sentida de un proceso apropiado mediante el cual los compuestos puedan introducirse selectivamente en células de plantas para potenciar allí el crecimiento o para tratar enfermedades o deficiencias de plantas.

[0009] Los adyuvantes son compuestos química y biológicamente activos (no químicamente inertes) y pueden clasificarse según su función (activadora o de utilidad), su química (tal como organosiliconas) o fuente (aceites
30 vegetales o del petróleo). Producen efectos acusados. La mayoría de adyuvantes son incompatibles con algunos materiales y condiciones y pueden dar como resultado efectos tóxicos en plantas y animales, y algunos adyuvantes tienen el potencial de ser móviles y contaminar fuentes de aguas superficiales o subterráneas. El uso de adyuvantes puede ser problemático cerca del agua, ya que pueden ocurrir efectos adversos en algunas especies acuáticas.

[0010] El documento WO0205849 divulga un procedimiento para la administración de una sustancia ácido nucleico a las células de un animal, una planta o un microorganismo, estando caracterizado el procedimiento porque la sustancia ácido nucleico se formula con un medio de administración que comprende una solución de gas óxido
40 nitroso en un disolvente portador fisiológicamente aceptable para el gas, y cuyo medio de administración incluye al menos un ácido graso o éster u otro derivado adecuado del mismo seleccionado del grupo consistente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico [C20: 5 omega 3], ácido docosahexaenoico [C22: 6 omega 3], ácido ricinoleico y derivados de los mismos seleccionados del grupo consistente en los ésteres de alquilo C1 a C6 de los mismos, los ésteres de glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de reacción de aceites naturales hidrogenados compuestos en su mayoría por aceites basados en ácido
45 ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno.

[0011] El documento WO0205850 divulga un procedimiento de potenciación de la acción de un agente farmacéutico seleccionado del grupo consistente en el grupo que comprende agentes antimicrobianos, agentes antihelmínticos y agentes ectoparasitarios, pero excluyendo solución de alquitrán de hulla y antihistamínicos
50 antagonistas de H1, caracterizado porque el agente se formula con un medio de administración que comprende una solución de gas óxido nitroso en un disolvente portador farmacéuticamente aceptable para el gas, y cuyo medio de administración incluye al menos un ácido o éster graso u otro derivado adecuado del mismo seleccionado del grupo consistente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico [C20: 5 omega 3], ácido docosahexaenoico [C22: 6 omega 3], ácido ricinoleico y derivados de los
55 mismos seleccionados del grupo consistente en los ésteres de alquilo C1 a C6 de los mismos, los ésteres de glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de reacción de aceites naturales hidrogenados compuestos en su mayoría por aceites basados en ácido ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno.

[0012] Es un objeto de la divulgación proporcionar una formulación de fomento de plantas que tiene por sí
60 misma efectos beneficiosos en términos de crecimiento, apariencia, producción y/o rendimiento de plantas a las que se aplica en uso, y cuya formulación es también adecuada para uso como vehículo de suministro, o como componente de un vehículo de suministro, para el suministro de una o más sustancias fitológicamente beneficiosas a una planta, y la distribución o translocación de sustancias fitológicamente beneficiosas a plantas, para proporcionar formulaciones que incorporan tales vehículos con o sin al menos una sustancia fitológicamente beneficiosa, con la que al menos
65 algunas de las desventajas de las formulaciones existentes puedan al menor reducirse, para proporcionar un

procedimiento para la producción de tales vehículos y un procedimiento de preparación de formulaciones que incorporan tales vehículos y al menos una sustancia fitológicamente beneficiosa, y para proporcionar un procedimiento de administración de tales sustancias fitológicamente beneficiosas a una planta que implica el uso de los vehículos de suministro, que sirven entonces también para efectuar la translocación o distribución de las sustancias fitológicamente

5 beneficiosas en o sobre la planta.

[0013] Según la presente invención, se proporciona un uso, como formulación de fomento de plantas que es fitológicamente beneficiosa, de una formulación que comprende una microemulsión constituida por una dispersión de vesículas o microesponjas de un componente basado en ácido graso en un portador acuoso, comprendiendo el

10 componente basado en ácido graso al menos una sustancia basada en ácido graso de cadena larga seleccionada del grupo consistente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3], ácido docosahexaenoico [C22:6 ω 3] y ácido ricinoleico, y derivados de los mismos seleccionados del grupo consistente en ésteres de alquilo C₁ a C₆ de los mismos, ésteres de glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de reacción de aceites naturales hidrogenados y no hidrogenados compuestos en su

15 mayoría por aceites basados en ácido ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno, en la que dicha formulación incorpora un gas seleccionado de óxido nitroso y dióxido de carbono disuelto en la mezcla de ácidos grasos, en la que dicha formulación incluye dl-alfa-tocoferol o su isómero fisiológicamente activo, y en la que dicha formulación incluye además una sustancia fitológicamente beneficiosa adicional seleccionada del grupo de sustancias conocido por ser útiles como nutrientes de plantas; un plaguicida de plantas, incluyendo un herbicida, fungicida,

20 bactericida, insecticida, agente antiviral de planta; un regulador del crecimiento de plantas seleccionado de los productos del grupo consistente en 2-(1-2-metilnaftil)acetamida; ácido 2-(1-2-metilnaftil)acético; 2-(1-naftil)acetamida; ácido 2-(1-naftil)acético; 2,4-D (sal de sodio); 3,5,6-TPA; ácido 4-indol-3-ilbutírico; 6-benciladenina; polímero de alquilamina grasa alcoxilada; polímero de alquilamina; clorhidrato de aminoetoxivinilglicina; nitratos amoniacados; auxinas; arseniato de calcio; carbarilo; cloruro de clormecuat; clorprofamo; clortal-dimetilo; cloprop; cianamida;

25 daminozida; decan-1-ol; diclorprop; (éster 2-butoxietílico) de diclorprop; dimetipina; dinocap; dibromuro de dicuat; diurón; etefón; fluazifop-p-butilo; giberelinas; glifosato-isopropilamina; glifosato-trimesio; haloxifop-P-metilo; ácido indolilacético; hidrazida maleica; cloruro de mepicuat; metilciclopropeno; aceite mineral; n-decanol; octan-1-ol; paclobutrazol; dicloruro de paracuat; pendimetalina; prohexadiona-calcio; ácido salicílico, clorato de sodio; tidiazurón; trinexapac-etilo y uniconazol; un inmunomodulador de plantas y un bioestimulante seleccionado del grupo de

30 productos conocidos como fitohormonas.

La dispersión se caracteriza preferiblemente porque al menos un 95 % de las vesículas o microesponjas son de un tamaño diametral de entre 50 nm y 5 micrómetros. Se entenderá que las vesículas o microesponjas en la dispersión son elásticas y no necesariamente de forma perfectamente esférica, y por consiguiente el término "tamaño diametral"

35 no ha de entenderse como un término de precisión geométrica. Ha de entenderse además que no es practicable determinar tal tamaño diametral en tres dimensiones sin el uso de instrumentación altamente sofisticada. Por consiguiente, ha de determinarse en dos dimensiones mediante observación microscópica y por tanto hace referencia a la medida máxima observada en vesículas o microesponjas como se ven en dos dimensiones.

40 **[0014]** La dispersión se caracteriza preferiblemente además también porque la microemulsión tiene un potencial zeta de entre -35 mV y -60 mV.

[0015] Opcionalmente, el componente de ácido graso de la microemulsión puede consistir o incluir una mezcla de ácidos grasos esterificados, y a este respecto se prefiere hacer uso del producto conocido como éster etílico de

45 vitamina F. Este producto está comercialmente disponible con la descripción comercial de éter etílico de vitamina F CLR 110 000 Sh.L. U./g de CLR Chemicals Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH de Berlín, Alemania. La distribución típica de ácidos grasos de este producto es como sigue:

<C ₁₆	:	0
C _{16.0}	:	8,3 %
C _{18.0}	:	3,5 %
C _{18.1}	:	21,7 %
C _{18.2}	:	34,8 %
C _{18.3}	:	28,0 %
>C ₁₈	:	1,6 %
desconocido	:	2,1 %

50 **[0016]** El componente de ácido graso puede incluir como alternativa o consistir en los ácidos grasos de cadena larga conocidos como ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3] y ácido docosahexaenoico [C22:6 ω 3]. Tal combinación de productos está disponible en Roche Lipid Technology con el nombre comercial "Ropufa '30' n-3 oil". Se ha encontrado útil incorporar estos ácidos donde se desea suministrar una sustancia hidrófoba a la planta. Un producto alternativo que puede usarse con este fin es uno del grupo de productos de Incromega disponibles en BASF.

55

[0017] El componente de ácido graso puede incluir, además de las sustancias anteriormente mencionadas o mezclas de sustancias, también el producto de reacción de aceites naturales hidrogenados, compuestos en su mayor parte por aceites basados en ácido ricinoleico, con óxido de etileno. Es preferible producir esta sustancia a partir de aceite de ricino, del cual es conocido que el contenido de ácido graso está compuesto predominantemente por ácido ricinoleico. Este producto puede modificarse en la medida de hidrogenación, etilación y adición de grupos tales como polietilenglicol. Se está comercializando un intervalo de tales productos por BASF con la descripción comercial Cremophor de diversas calidades. Para ciertas aplicaciones, se proporciona un vehículo de suministro en que la calidad Cremophor, u otra composición de ácido ricinoleico modificado, usada es aquella en que las moléculas de ácido ricinoleico se modifican por la adición a las mismas de grupos de polietilenglicol que comprenden entre 35 y 45 unidades de óxido de etileno.

[0018] La formulación puede estar disponible en formas que pueden pulverizarse como líquidos. Incluye el ingrediente o ingredientes activos de una sustancia o sustancias como se reivindican en las reivindicaciones, cualquier aditivo que potencie adicionalmente la efectividad, estabilidad o facilidad de aplicación, tales como tensioactivos y otros adyuvantes y cualquier otro ingrediente, incluyendo disolventes, portadores o tintes. El procedimiento de aplicación y especie para tratar determinan cuál formulación es preferible.

[0019] Los nutrientes de plantas pueden seleccionarse del grupo de elementos consistente en carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, cinc, cobre, boro, molibdeno y cloro. El crecimiento de plantas en su fase de germinación, vegetativa o productiva puede estimularse potenciando el suministro de nutrientes, incluyendo nutrientes en fase gaseosa.

Ejemplos de la invención y divulgación

[0020] Se ilustrarán ahora la invención y divulgación, únicamente a modo de ejemplos con referencia a la siguiente descripción no limitante de preparaciones, ejemplos y figuras, en que

la figura 1 es una gráfica que ilustra el aumento del número de nudos en plantas de pepino tratadas mediante el uso de la formulación de fomento de plantas como se describe en el Ejemplo 5;

la figura 2 es una gráfica que ilustra el aumento del tamaño de hojas en plantas de pepino tratadas mediante el uso de la formulación de fomento de plantas como se describe en el Ejemplo 5;

la figura 3 es una gráfica que muestra el número de pepinos medianos a grandes recolectados en diferentes momentos de plantas tratadas con una formulación de fomento de plantas en comparación con plantas de control no tratadas como se describe en el Ejemplo 5;

la figura 4 es una gráfica que muestra el número de pepinos extra grandes recolectados en diferentes momentos de plantas tratadas con una formulación de fomento de plantas en comparación con plantas de control no tratadas como se describe en el Ejemplo 5;

la figura 5 es una gráfica que muestra los números totales de pepinos recolectados en diferentes momentos de plantas tratadas con una formulación de fomento de plantas en comparación con plantas de control no tratadas como se describe en el Ejemplo 5;

la figura 6 es una gráfica que muestra el número de pimientos verdes recolectados en diferentes momentos de plantas tratadas con una formulación de fomento de plantas en comparación con plantas de control no tratadas como se describe en el Ejemplo 5;

las figuras 7, 8, 9 y 10 son micrografías de secciones de calabacines tratados con formulaciones de fomento de plantas como se describe en el Estudio 1 del Ejemplo 6;

las figuras 11 y 12 son gráficas que ilustran el crecimiento de plantas de Clivia tratadas con diferentes formulaciones de fomento de plantas como se describe en el Estudio 2 del Ejemplo 6;

la figura 13 es una gráfica que muestra el diámetro medio de cabeza de plantas de lechuga tratadas con elementol R frente a plantas de control durante un periodo de 12 semanas después del trasplante como se describe en el Ejemplo 16;

la figura 14 es una gráfica que muestra el crecimiento comparativo medio de la altura de planta en plantas de lechuga tratadas con elementol-R frente a plantas de control durante un periodo de 12 semanas después del trasplante como se describe en el Ejemplo 16;

la figura 15 es una gráfica que muestra un ejemplo de una comparación planta a planta de plantas de lechuga tratadas con elementol R frente a plantas de control como se describe en el Ejemplo 16, usando plantas con un número similar

de hojas en el 1º tratamiento;

la figura 16 es una gráfica que ilustra el % medio de potenciación en relaciones de Fm:Dm durante el periodo de ensayo causada por el tratamiento con elementol R de plantas de lechuga frente a plantas de control como se describe en el Ejemplo 16;

la figura 17 es una gráfica que ilustra la diferencia en plantas de lechuga tratadas con elementol R y plantas de control en términos de % de humedad como se describe en el Ejemplo 16;

10 la figura 18 es una gráfica que ilustra la tasa de respiración por mg de proteína para el periodo de estudio en plantas de lechuga tratadas con elementol R y plantas de control como se describe en el Ejemplo 16;

la figura 19 son dos gráficas que muestran una comparación de los contenidos medios de clorofila A y B por mg de proteína por masa fresca entre plantas de lechuga tratadas con elementol R y plantas de control durante el periodo del estudio como se describe en el Ejemplo 16;

la figura 20 es una gráfica que refleja las relaciones de clorofila A:B obtenidas a partir de la clorofila corregida por mg de proteína y masa fresca como se describe en el Ejemplo 16;

20 la figura 21 es una gráfica que muestra los cambios en el número medio de yemas florales formadas durante las primeras semanas después del trasplante (WAT) en plantas de tomate tratadas con elementol R y de control como se describe en el Ejemplo 17;

la figura 22 es una gráfica que muestra el % medio de potenciación de la producción de yemas florales de plantas de tomate tratadas con elementol R y de control como se describe en el Ejemplo 17;

la figura 23 es una gráfica que muestra el aumento lineal del rendimiento acumulado medio para 3 plantas de tomate durante el periodo de estudio como se describe en el Ejemplo 17;

30 la figura 24 es una gráfica que muestra la relación de fruto acumulado medio a yema acumulada media de plantas de tomate tratadas como se describe en el Ejemplo 17;

la figura 25 es una gráfica que muestra el % medio de humedad encontrado en el fruto de plantas de tomate tratadas con elementol R frente a plantas de control como se describe en el Ejemplo 17;

35 la figura 26 es una gráfica que muestra el efecto de ComCat® (CC), elementol R (E) y combinaciones de los mismos sobre los cambios en el número acumulado de frutos recolectados de 3 plantas por grupo durante un periodo de 13 semanas como se describe en el Ejemplo 18;

40 la figura 27 es una gráfica que muestra la masa de fruto acumulado total observada de plantas tratadas con ComCat® que está atrapado en elementol R en comparación con el aumento observado con elementol R o ComCat® individualmente como se describe en el Ejemplo 18;

la figura 28 es una gráfica que muestra el aumento de la masa de fruto fresca por la combinación de elementol R y CC como se describe en el Ejemplo 18;

50 la figura 29 es una gráfica que muestra la tasa de respiración por contenido de proteína después de la primera administración (semana 5) y la segunda administración (semana 9) de elementol R, ComCat® y tratamiento de combinación como se describe en el Ejemplo 18;

la figura 30 es una gráfica que ilustra las cantidades comparativas de clorofila B por mg de proteína como se determina en la semana 13 del ensayo descrito en el Ejemplo 18;

60 la figura 31 es una gráfica que muestra las lecturas de Brix comparativas en la semana 13 para plantas tratadas con elementol R, tratadas con CC y tratadas con combinación descrito en el Ejemplo 18 con HClO₄ como fondo;

la figura 32 es una fotografía de rábanos germinando sobre papel de germinación en el estudio in vitro descrito en el Ejemplo 19; la figura 33 es una gráfica que ilustra la longitud comparativa media medida para coleóptilos de trigo para el control de fertilizante y las diversas dosificaciones de elementol R descrito en el Ejemplo 19;

60 la figura 34 es una gráfica que muestra la potenciación del rendimiento de grano de trigo por una sola administración de elementol R cultivado en ensayos de campo como se describe en el Ejemplo 19;

65 la figura 35 es una gráfica que muestra los pesos comparativos medios de planta, raíz y hoja de plantas de maíz cultivadas a partir de semillas tratadas con el fungicida captán, con una combinación de captán y elementol R o con

semillas no tratadas como se describe en el Ejemplo 19.

PREPARACIÓN 1

5 PREPARACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE FOMENTO DE PLANTAS ADECUADA PARA USO COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA USO EN EL SUMINISTRO DE UNA SUSTANCIA FITOLÓGICAMENTE BENEFICIOSA A PLANTAS

[0021] Una formulación puede elaborarse como sigue:

10

Etapa 1: Se satura un volumen de agua deseado con el gas indicado (en este ejemplo óxido nitroso, pero se usa el mismo procedimiento general con modificaciones menores cuando se emplea dióxido de carbono) a presión ambiental usando un recipiente a presión y rociador. Se conecta el recipiente a un suministro de óxido nitroso a través de una válvula de control de flujo y regulador de presión. Se suministra al recipiente cerrado óxido nitroso a una presión de 0,2 MPa durante un periodo de 96 horas, habiéndose determinado que a la temperatura anteriormente mencionada el agua se satura con óxido nitroso durante tal periodo de tiempo a la presión anteriormente mencionada. En el caso de preparación de la formulación básica o madre (a la que se hace referencia en la presente memoria como elementol B) para usar sola, o cuando se va a usar como vehículo de suministro para nutrientes o la mayoría de plaguicidas orgánicos sintéticos, se usa agua desclorada. Cuando se pretende usar la formulación madre como vehículo de suministro para péptidos o biocatalizadores de plantas, el agua se tampona con fosfato a un pH de 5,8.

Etapa 2: Se elaboraron las siguientes composiciones basadas en ácido graso: En primer lugar, se calentó a 75 °C éster etílico de vitamina F CLR 110 000 Sh. L. U./g obtenida de CLR Chemicals Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH de Berlín, Alemania, que está compuesto principalmente por 21 % de ácido oleico, 34 % de ácido linoléico y 28 % de ácido linoleico que están modificados por esterificación con un grupo etileno del extremo carboxi. En segundo lugar, se calentó a 80 °C el ácido graso hidrogenado pegilado ácido ricinoleico (también conocido por el nombre INCI aceite de ricino PEG-n-hidrogenado) y se mezcló con el primer grupo de éster etílico de vitamina F basado en ácido graso a 70 °C. La relación del primer grupo de ácidos grasos al último ácido graso era generalmente de 3:1 para aplicación foliar. En el caso de adición de la preparación a contenedores grandes que suministran a plantas por irrigación por goteo en entornos controlados en base continua, la relación era de 5:1 a 6:1.

Etapa 3: Se añadió dl- α -tocoferol a porcentajes variables (concentración final de entre 0,1 % cuando se usa como antioxidante general (elementol B) y 0,25 % v/v cuando se usa como regulador de la fase reproductiva de plantas o para sincronización (elementol R)) a la mezcla de ácidos grasos calentada anterior, como antioxidante o como modulador de crecimiento.

Etapa 4: Se calentó el agua o agua tamponada a 73 °C y se mezcló con la mezcla de ácidos grasos con la ayuda de una cizalla de alta velocidad a una concentración final de entre 3,2 y 4 %, dependiendo del uso específico de la preparación. Esta mezcla de ácidos grasos constituía la preparación básica que contiene vesículas de tamaños en el intervalo nanométrico como se determina por análisis del tamaño de partícula en un calibrador Malvern.

Etapa 5: A la preparación básica pueden añadirse los ácidos grasos etilados adicionales DHA (ácido decahexanoico) y EPA (ácido eicosapentanoico). La cantidad preferible de los dos ácidos grasos era de 0,5 %. La adición de estos ácidos grasos da como resultado la formación de microesponjas en lugar de vesículas, con partículas de entre 2-5 μm de tamaño, como se determina por análisis del tamaño de partícula en un calibrador Malvern.

Etapa 6: Se diluye esta preparación básica con agua para administración a plantas. Las diluciones eran generalmente de 1: 1 para aplicación a tallo, 1:10 para plantas ornamentales en ambientes abiertos, 1:200 para vástagos acodados, 1:600 y 1:800 para huertos, 1:1000 para cultivos a campo abierto y entornos controlados, 1: 1500 para coloración de frutos y 1:5000 en sistemas hidropónicos dependiendo del procedimiento de administración, el tipo de cultivo (p. ej., irrigación por goteo, pulverización foliar a mano, por tractor o avión).

[0022] Pueden fabricarse partículas estables de tamaños bastante homogéneos en el intervalo de 50 nm a 50 μm con facilidad a gran escala. El tamaño y la forma de las partículas pueden controlarse reproduciblemente. Se determinó el potencial zeta de elementol B y elementol R preparados como se describe anteriormente mediante y se encontró que era de -46 mV y -38 mV, respectivamente. Pueden efectuarse variaciones en el tamaño de partícula de las microemulsiones variando la composición y pueden efectuarse igualmente variaciones en el potencial zeta de la emulsión variando la composición.

15

PREPARACIÓN 2

20 PREPARACIÓN TÍPICA DE UNA FORMULACIÓN QUE CONTIENE UNA SUSTANCIA FITOLÓGICAMENTE BENEFICIOSA EN LA FORMULACIÓN DE FOMENTO DE PLANTAS COMO COMPONENTE DE UN VEHÍCULO DE SUMINISTRO

[0023]

Etapa Pueden atraparse una o más sustancias fitológicamente beneficiosas en preparaciones de elementol B básico o elementol B tamponado

5 1: descritas anteriormente, mediante mezclado concienzudo de la sustancia deseada en la formulación de elementol a temperatura ambiente o de campo antes de dilución para administración como se describe en le etapa 6 de la preparación

10 1. El mezclado puede ocurrir por sacudidas o agitación. Después de mezclar, se dejan "curar" generalmente las preparaciones durante al menos 30 minutos, pero no más de 3 horas, antes de dilución con agua para administración. En el caso de sustancias con grandes pesos moleculares tales como péptidos, se dejan las preparaciones durante una noche a 4 °C.

15 EJEMPLO 1

USO DE ELEMENTOL COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTES FOLIARES A SANDÍA

20 Introducción:

[0024] Al contrario que en cultivos de sandía anteriores en una parcela seleccionada de 160 ha, el cultivo de sandía de este estudio tenía un bajo potencial de rendimiento, aunque no había cambios en comparación con prácticas anteriores. Se observó lo siguiente durante enero de 2005:

25

1.) Senescencia prematura que ocurre durante enero de 2005. Era un fenómeno disperso.

2.) Este último se atribuyó principalmente a nematodos que daban como resultado la reducción de la eficiencia de las raíces. Esto dio como resultado que muchos frutos se deformaran y sufrieran "podredumbre apical".

30

3.) Las infecciones fúngicas foliares eran comunes, independientemente de la aplicación proactiva de fungicidas en base de 10 días. Los fungicidas se alternaron para reducir el riesgo de resistencia por los hongos.

Ensayo:

35

[0025] Se tomó la decisión de mantener el programa fungicida, pero introduciendo una aplicación de nutrientes como pulverización foliar.

[0026] La pulverización experimental, por hectárea, contenía lo siguiente:

40

5 kg de CaCl₂ disueltos en 26,0 litros de agua.

1,0 litro de "calcio complejado con aminoácidos" (100 g/litro de Ca)

45 0,5 litros de "cobre complejado con aminoácidos" (75 g/litro de Cu)

6 ml de elementol B

[0027] El concepto tenía lo siguiente como objetivos:

50

1.) Reforzar la resistencia interna de las plantas a la infección fúngica con cobre y elementol B y

2.) Tener calcio disponible en el "meristema" para mejorar la "integridad de la pared celular" durante cualquier desarrollo foliar y radicular futuro, dando como resultado potencialmente una resistencia fúngica adicional y una eficiencia foliar y radicular mejorada.

55

[0028] Se añadió elementol B a los aminoácidos y se dejó "curar" la combinación durante 15 minutos antes de dilución. Se realizó la dilución añadiendo 28,5 litros de agua de CaCl₂. Se preparó el agua de CaCl₂ con 48 horas de adelanto. El fin de la disolución previa de CaCl₂ era someter el cloro a "UV", esperando tener un efecto reducido de este elemento durante el ensayo. La "combinación de aminoácido/elementol" de 1,56 litros, junto con el agua "enriquecida con Ca" de 28,5 litros dieron como resultado un total de unos 30 litros de la preparación que se aplica por hectárea. La aplicación era por pulverización foliar aérea.

60

[0029] Se repitió la misma aplicación 10 días después, habiendo aumentado el elementol B en la preparación a 12 ml/ha.

65

Control:

5 **[0030]** Se trataron franjas de control idénticamente a las franjas de ensayo, pero excluyendo elementol B.

Repetición:

10 **[0031]** Puesto que tanto el ensayo como el control recibieron dos aplicaciones aéreas, se obtuvo la integridad de repetición usando un sistema de posicionamiento global diferencial SATLOC (DGPS). Se montó este instrumento en la aeronave como equipo estándar. Se guardó cada "ronda de pulverización" durante la primera aplicación. Esto dejó aplicar la segunda aplicación con menos de 0,5 metros de desviación de la primera aplicación.

Observaciones:

15 **[0032]** Al cabo de 48 horas de la primera aplicación, había una diferencia visual entre las franjas tratadas y las de control. Las franjas de ensayo mostraban signos de "rejuvenecimiento". Las plantas tratadas mostraban un tono mucho más oscuro de verde en comparación con el control. Al mismo tiempo, estas plantas mostraron un aumento observable de la floración en comparación con el control. Este fenómeno incitó al granjero a requerir una segunda aplicación con un componente elementol B aumentado (12 ml/ha).

20 **[0033]** Ambas aplicaciones se realizaron durante enero de 2005.

25 **[0034]** Las sandías tratadas con elementol B, independientemente de los volúmenes aplicados muy bajos (6 ml y 12 ml, respectivamente) envejecieron bien después del control. Este retraso en la senescencia variaba entre 2 y 5 semanas. Aunque la deformación entre los frutos no se redujo por este tratamiento, se redujo significativamente la podredumbre apical.

[0035] Debido a la aparición dispersa, por el campo, del problema inicial, solo se hicieron observaciones.

30 EJEMPLO 2

USO DE ELEMENTOL B COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA ADMINISTRACIÓN FOLIAR DE FUNGICIDA SOBRE GARROFÓN

35 Introducción:

[0036] Se realizó la plantación de garrofón sobre una parcela de 120 ha en semilleros separados 910 mm (espaciado antiguo de 3 pies).

40 Ensayo:

[0037] Este ensayo tenía lo siguiente como objetivo:

45 Pulverizar elementol B como aplicación foliar junto con un fungicida, con tractor, para observar cualquier reacción por las plantas con respecto a la floración/rendimiento.

[0038] Para el ensayo, se delimitó un área de 10 hectáreas usando tecnología GPS y marcadores de terreno.

[0039] La pulverización experimental, por hectárea, comprendía lo siguiente:

50 200 litros de agua

40 ml de elementol básico

55 250 ml de Punch® C

Control:

60 **[0040]** El área de control comprendía 10 hectáreas en el mismo bloque. Un área intermedia de 30 metros separaba ensayo y control. La pulverización aplicada aquí no contenía elementol.

Repetición:

65 **[0041]** Se previó la repetición por delimitación tanto de los bloques de ensayo como de control usando tecnología GPS y marcadores de terreno. Se administraron dos pulverizaciones.

Observaciones:

5 [0042] Se realizó el muestreo de vainas a mano. El procedimiento de muestreo usado fue filas aleatorias de 10 x 10 metros. Se usó también este procedimiento para muestrear el control.

Conclusión:

10 [0043] El resultado del muestreo fue como sigue:
Punch® C con elementol B: 2.390 kg/ha
Punch®, sin elementol: 2.180 kg/ha

[0044] Estudios posteriores mostraron que el elementol B contribuía al efecto antifúngico, así como a la mejora del rendimiento.

15 EJEMPLO 3

DETERMINACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD Y EFECTOS BENEFICIOSOS DE ELEMENTOL R POR ADMINISTRACIÓN FOLIAR SOBRE FRESAS

20 Introducción:

[0045] La plantación de las fresas en la parcela de ensayo de 12 ha comenzó a principios de abril de 2005. El material de plantas es todo de primera generación. Los bloques plantados descendían en dirección occidental y la elevación es de alrededor de 100 metros por encima del nivel del mar. El suelo tiene un contenido de arcilla de menos de 5 % y un contenido de carbono orgánico de 0,5 %.

Ensayo:

30 [0046] Este ensayo tenía lo siguiente como objetivo:
Pulverizar elementol R como aplicación foliar, con tractor, para observar cualquier reacción de las plantas con respecto a la floración.

35 [0047] La pulverización experimental, por hectárea, comprendía lo siguiente:

200 litros de agua

250 ml de elementol R

40 [0048] Se realizó la pulverización en las siguientes condiciones:

Temperatura: 23 ° Celsius (Δ entre bulbo húmedo y seco: < 5 °C)

Humedad: 28 %

Distribución de gotitas: media de 15/cm²

Bloques tratados: Bloques 6 y 7

Bloque de control: Bloque 5

Fisiología: La pulverización comenzó solo una vez el 20 % de las plantas empezaron a florecer

Control:

45 [0049] Cerrar el túnel de control n.º 5 durante la aplicación de elementol R a los bloques 6 y 7 prevenía la contaminación por deriva.

Observaciones:

50 [0050] Los dos bloques tratados, por muestreo aleatorio, procuraban el acceso de 100 % más flores que el bloque de control. Se realizó esta observación 21 días después de la aplicación. No se observaron signos de fitotoxicidad.

EJEMPLO 4

USO DE ELEMENTOL B COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO BÓRICO FOLIAR SOBRE CÍTRICOS (NARANJA NAVEL var. LINA)

5 Introducción:

[0051] El huerto de ensayo era un huerto de 15 ha en el que los árboles son de aproximadamente 12 años, lo que significa que los árboles son maduros. La población de plantas por hectárea es de 617 árboles/ha. Las naranjas navelinas son una variedad temprana. Llevar estas al mercado en primer lugar tiene grandes ventajas financieras para el granjero.

[0052] Los altos niveles de ácido giberélico, en plantas frutales, da como resultado una coloración retardada del fruto. La experiencia de campo indicaba que la tasa de crecimiento vegetativo de la mayoría de plantas puede reducirse aplicando, como pulverización foliar, un volumen calculado de boro. La fuente de boro usada generalmente era ácido bórico (H_3BO_3).

[0053] El mismo granjero, durante la estación de ensayo, aplicó ácido bórico, de forma calculada, a limones que se habían sobrenitrificado. La sobrenitrificación de limones conduce a un crecimiento vigoroso con reducción de la formación de frutos. Se consiguió el encauzamiento de este fenómeno de crecimiento usando ácido bórico.

Ensayo:

[0054] Habiendo conseguido la inhibición del crecimiento vigoroso con ácido bórico en los limones, se supuso que tal aplicación en combinación con elementol B puede dar como resultado una coloración temprana de naranjas Navel en los árboles, evitando por tanto el desverdizado con etileno en una cámara de atmósfera controlada.

[0055] Se presentó este ensayo en naranjas Navel variedad Lina. El área superficial era de 15 hectáreas. El objetivo era la coloración temprana en los árboles. No se delimitaron controles en el área de ensayo. Se monitorizaron huertos de granjeros adyacentes al ensayo como posible control.

[0056] La pulverización experimental, por hectárea, comprendía lo siguiente:

2000 litros de agua

130 ml de elementol B

1 kg de ácido bórico

[0057] Se disolvió/suspendió el boro en agua antes de añadir el elementol. Se dejó un tiempo de curado de 30 minutos antes de añadir agua para la dilución final.

Observaciones:

[0058] Las navelinas tratadas cambiaban de color en los árboles aproximadamente 2 semanas antes que los controles adyacentes. Estas naranjas Navel se recogieron una semana antes que cualquier otra en la vecindad.

EJEMPLO 5

INVESTIGACIONES EN ENTORNO CONTROLADO DEL IMPACTO DE ELEMENTOL R SOBRE EL RENDIMIENTO DE PLANTAS DE PEPINO:

Materiales y procedimientos:

Materiales

[0059] Túneles cubiertos con plástico Dicla (plástico de 2 um de grosor con protección UV inherente para plantas) con 2x tanques de 5000 l y bombas, medio de crecimiento de serrín, bolsas de plástico de 15 litros, plantones (pepino) de Dicla, Sudáfrica, plantones de pimiento verde de King Arthur, atomizador Stihl, nitrato de calcio de Ocean u Omnia (Sudáfrica), NutriVeg (Omnia) o HydroGro (Ocean), ácido nítrico (Ocean), sulfato de potasio (Ocean).

Procedimientos:

[0060] Configuración general: Se asignaron cada uno de un túnel y un tanque al producto de prueba, y se usaron cada uno de un túnel y un tanque como control. Se enfriaron los túneles por enfriamiento con aire por abertura y cierre de compuertas. Las compuertas y puertas estaban habitualmente cerradas entre las 18:00 y 19:00 de la noche,

y se abrían entre las 06:00 y 08:00 cada mañana, dependiendo de la temperatura. La orientación de los túneles era de norte a sur, atendiendo a la dirección del viento predominante para ayudar al enfriamiento. No se usó ningún sistema de calentamiento ni enfriamiento artificial en los túneles.

5 Plantas:

[0061] Pepinos: Se trasplantaron 720 plántones de pepino de 3 semanas de edad de bandejas de plántones a bolsas de plástico que contienen serrín en cada uno de los túneles al inicio del verano. Se realizó la plantación en 6 filas de 120 plantas por fila. Se seleccionaron las plantas más fuertes para el túnel de control.

10

[0062] Pimientos verdes: Se plantaron 500 plántones de King Arthur en bolsas de plástico de 10 litros llenadas con serrín en el túnel de prueba, mientras que se plantaron 504 plántones similares en bolsas de plástico de 15 litros llenadas con serrín. Se hicieron crecer las plantas fuera de los túneles durante los primeros 2 meses sin adición de elementol R, y se movieron entonces a los túneles para la temporada de fructificación de pimientos. La adición de elementol R a las plantas de prueba se inició dos semanas después de la transferencia de las plantas del exterior a los túneles. Se observó una diferencia significativa en el rendimiento de pimientos verdes en la prueba. Se investigó la posibilidad de que las plantas simplemente puedan ser más felices dentro del túnel de prueba por razones distintas que el tratamiento con elementol R. Para controlar esta posibilidad, se interrumpió el tratamiento con elementol R durante un periodo de 10 días (días 120-130), después de lo cual se retomó.

15

20

Irrigación:

[0063] Pepinos: Las plantas pequeñas recibieron 15 minutos de irrigación por goteo 3 veces al día mediante irrigadores de 4 litros/hora, por tanto, un total de 3 litros/día. Se aumentó la irrigación a 30-40 minutos/día (> 4 litros/día) después de 6 semanas, cuando las plantas empezaron a dar frutos que podían recolectarse y a acomodarse a las altas temperaturas del verano de hasta 45 °C dentro de los túneles.

25

[0064] Pimientos: El tratamiento de las plantas pequeñas fue similar al de los pepinos, pero el volumen de irrigación se aumentó después de 8 semanas a > 5 litros/día/planta.

30

Producto de prueba:

[0065] El producto de prueba es un sistema de suministro beneficioso para plantas, llamado elementol R. Se teorizó que este sistema puede aumentar

35

a) la solubilidad y

b) la absorción de nutrientes, y más específicamente calcio.

40

[0066] Se administró el producto de prueba por irrigación de raíces. Se mezcló elementol R con el nutriente del tanque que suministraba irrigación al túnel de prueba.

[0067] La mezcla de nutrientes para irrigación era como sigue:

45

A cada tanque llenado con 5000 l de agua de pozo, se añadieron 500 ml de ácido nítrico para rebajar el pH a 6,0, después de lo cual se premezclaron 2 kg de mezcla nutriente y 2 kg de nitrato de calcio con agua y se añadieron al tanque en ese orden. Para el tanque y túnel de prueba, el premezclado era con 1 l de elementol y agua. En el caso de pimientos verdes, se reemplazaron 500 g de nitrato de calcio por 500 g de sulfato de potasio cuando las plantas empezaron a dar fruto. Cada dos semanas, se añadieron 100 ml de un desinfectante tal como Praline al tanque lleno para prevenir el crecimiento de algas. Cada 4 días, se aclararon las plantas con agua de pozo solo, después de lo cual continuó la alimentación de nutrientes.

50

Análisis:

55 Pepinos:

[0068] Se investigaron los siguientes parámetros durante las diversas fases del crecimiento de plantas:

i) Longitud de planta

60

ii) Longitud de hoja

iii) N.º de nudos

65 iv) Rendimiento de pepinos

5 **[0069]** Longitud de planta: Durante el periodo de crecimiento inicial, es posible medir la longitud de planta. Se midió en 20 plantas seleccionadas aleatoriamente de cada fila (120 plantas para cada túnel) la longitud desde el nivel de serrín a la rama más alta del tallo. Se marcaron las bolsas de plástico de las plantas medidas con cal para prevenir medidas repetidas de las mismas plantas. Se calculó la longitud media de las plantas en cada fila y se usó para comparación.

10 **[0070]** Se determinó la longitud de hoja de las dos hojas inferiores de la planta, usando un número similar de plantas y un procedimiento de selección y cálculo como se describe para la longitud de planta.

[0071] Número de internudos: Se contó el número de ramas formadas, usando un número similar de planta y el procedimiento de selección y cálculo como se describe para la longitud de planta.

15 **[0072]** Rendimiento de pepino: Se recolectaron los pepinos. Se contaron y pesaron solo aquellos pepinos aptos para la venta en una cadena de establecimientos de gama alta. Los pepinos que estaban curvados, amarillos o cuya apariencia general no era según los requisitos de venta, no se tuvieron en cuenta.

Pimientos verdes:

20 **[0073]** El experimento de pimientos verdes se detuvo debido a la llegada del invierno. Un sistema de calentamiento eléctrico instalado en los túneles probó ser insuficiente y las plantas se expusieron a temperaturas menores de 2 °C. Se determinó solo el rendimiento comercializable para los pimientos verdes.

Resultados y discusión:

25

Pepinos:

30 **[0074]** Se determinó la longitud de planta para 120 plántones seleccionados aleatoriamente de 4, 5 y 6 semanas de edad después del trasplante. Se calculó la longitud media, que representa el crecimiento medio para cada túnel. La Tabla 1 ilustra el crecimiento medio semanal de los plántones. Mientras que las plantas de control medias eran inicialmente más altas (semanas 4) que las plantas del túnel de prueba, las plantas que se irrigaron con elementol R añadidos crecieron más rápido que las del túnel de control como se determina 2 semanas después del inicio del tratamiento con elementol R.

Semanas	Elementol	Control
4	4,08	4,5
5	6,33	6,45
6	13,04	12,9

35

[0075] La figura 1 ilustra el aumento del número de nudos por la adición de elementol R a la mezcla nutriente 3 semanas después del trasplante de los plántones y el inicio del tratamiento. Se determinaron los nudos para 20 plantas seleccionadas aleatoriamente en cada una de las 6 filas, teniendo cuidado de que se usaran plantas diferentes que para la determinación de la longitud. En cada fila, las plantas tratadas con elementol R contenían más nudos después de 3 semanas de tratamiento, aunque el aumento era menor de 1 (0,73) nudo por planta al promediar. El error estándar es menor para las plantas que se irrigaron con mezcla de elementol-nutriente, indicando un efecto sincronizador sobre el crecimiento de plantas.

45 **[0076]** Cuando un aumento de 0,73 nudos por 3 semanas de tratamiento se proyecta a un periodo de crecimiento total de 18 semanas, la diferencia media en el número de nudos/planta como resultado de la administración de elementol R es de 4,4 nudos/planta, lo que es estadísticamente significativo. La importancia del aumento de nudos es que indica el número tanto de hojas como de yemas frutales que desarrollará la planta.

50 **[0077]** La figura 2 ilustra el aumento del tamaño de hoja por administración a raíces de elementol R. Se determinó la longitud de hoja para 120 plantas en cada túnel; 20 plantas por fila 3 semanas después del inicio de la administración de elementol R. Como es el caso con la longitud de planta, los tamaños de las hojas de las plantas en el túnel de prueba eran ligeramente menores que los de plantas de control antes de iniciar la administración de elementol. La diferencia en el tamaño de hoja causada por el tratamiento con elementol es significativa y es importante en el desarrollo de la planta, puesto que las hojas son responsables de la fotosíntesis. Una vez más, el error estándar era menor para las plantas que recibieron elementol R.

55

[0078] Se acepta generalmente que el periodo de rendimiento para pepinos es de 12 semanas, aunque algunos productores recolectan fruto durante un periodo de 16 semanas. En las figuras 3 y 4, se ilustra el rendimiento de las plantas durante un periodo de 12 semanas, por tanto, la edad de las plantas como se ilustra a continuación es la suma de:

5 3 semanas de crecimiento de siembra a plantón (no tratado) + 3 semanas de crecimiento antes de recolección tratado con elementol R + 12 semanas de recolección con tratamiento con elementol R. Aunque las plantas seguían produciendo flores en la semana 20, se detuvo la investigación en ese punto debido a una fuerte infestación por mosca blanca en ausencia de un programa formal de plaguicidas.

10 **[0079]** Al inicio de la recolección, se clasificaron los pepinos como medianos a grandes (hasta 37 cm). Sin embargo, al final de la 4ª semana y hasta la 20ª semana de recolección, los pepinos recolectados eran de entre 41 y 47 cm de longitud, dando un número menor de pepinos, pero con una mejor recolección en términos de peso. Por esa razón, los resultados de rendimiento se separan para los dos periodos temporales.

15 **[0080]** Es necesario señalar que la recolección de los dos túneles ocurría simultáneamente, y por lo tanto el rendimiento está ligado a días específicos de la semana. Esto puede ser ligeramente artificial, ya que la recolección del túnel de control 3 días después que el túnel de prueba puede haber dado una distribución más igual de rendimiento de pepinos para las semanas 9 a 13. Durante la semana 14, una avería del suministro eléctrico a la irrigación y las bombas durante un periodo de 48 h causó una disminución significativa de rendimiento tanto en las plantas de control como tratadas con elementol. El estrés causado por la no irrigación parecía ser mejor tolerado por las plantas tratadas con elementol, como puede verse en la figura 4.

20 **[0081]** La Tabla 2 muestra la diferencia total así como el % de diferencia entre los rendimientos de pepinos de los dos túneles.

Tabla 2: Diferencia en rendimiento		
	Experimental	Control
Suma	7797	5941
% del total	56,75498617	43,24501
Relación	0,761959728	
% de dif.	31,24053	
N.º/mes	3898,5	2970,5
N.º/planta/mes	5,414583333	4,125694
Frutos/planta	16,24375	12,37708

Pimientos verdes:

30 **[0082]** La figura 6 ilustra el rendimiento de pimientos verdes durante un periodo de 70 días. Se inició la recolección 3 meses (90 días) después de plantar, mientras que el tratamiento con elementol R se inició 2 semanas antes de la recolección. Después del día 160, se expusieron las plantas a temperaturas tan bajas que se detuvo el experimento, aunque las plantas seguían produciendo fruto recolectable.

35 **[0083]** Se ilustra en la figura 6 el impacto del elementol R sobre el rendimiento de pimientos verdes. La primera flecha indica el inicio de la interrupción de 10 días del tratamiento con elementol, mientras que la segunda flecha indica cuándo se retomó el tratamiento con elementol R. Cada punto indica la recolección combinada para ese túnel durante un periodo de 10 días. Es inmediatamente observable una disminución de rendimiento después de la interrupción del tratamiento con elementol R en el túnel de prueba. El rendimiento disminuía y se estabilizaba a un nivel similar al del túnel de control, indicando que el rendimiento aumentado puede atribuirse específicamente a la presencia de elementol R.

40 **[0084]** La Tabla 3 muestra el rendimiento total y el % de diferencia en rendimiento por túnel.

Tabla 3: Diferencia en rendimiento		
	Experimental	Control
Total	3003	2458

% del total	54,98993	45,01007142
% de diferencia durante el periodo total	22,1725 %	
% de diferencia antes de la interrupción del tratamiento	42,35294 %	

[0085] La determinación del % de diferencia entre los dos grupos puede realizarse en realidad solo durante el periodo de tiempo antes de la interrupción del tratamiento, puesto que es difícil estimar el efecto a largo plazo de tal interrupción.

5

Conclusión

[0086] Se investigó el impacto de elementol R sobre el rendimiento de frutos de dos especies de planta diferentes, el de pepinos y de pimientos verdes. La adición de elementol R a la mezcla de nutrientes de planta daba como resultado aumentos estadísticamente significativos del rendimiento de fruto recolectable en ambas especies de planta.

10

EJEMPLO 6

15 **PENETRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN PLANTAS DICOTILEDÓNEAS- INVESTIGACIÓN DEL POTENCIAL DE LA TECNOLOGÍA DE ELEMENTOL B PARA APLICACIONES AGRÍCOLAS:**

[0087] Los antecedentes de los proyectos son como sigue:

20 Antecedentes del estudio

[0088] El elementol B consiste principalmente en un número y combinación específicos de función de ácidos grasos insaturados y óxido nitroso.

25 **[0089]** Se procedió a estudios preliminares para determinar

1) la permeación/penetración de elementol B en plantas y la translocación de elementol B en plantas con el tiempo y

2) la posible contribución de elementol B al suministro a plantas de nutrientes de plantas.

30

Procedimientos y materiales:

Preparación de elementol:

35 **[0090]** Se diluyeron 45 g de medio elementol básico con 225 g de agua purificada saturada con óxido nitroso (N_2O-H_2) a temperatura

ambiente. Se sacudió la mezcla vigorosamente y se añadieron 1250 μ l del marcador fluorescente rojo Nilo (1,6 μ g/ μ l; Molecular Probes, Holanda).

40

Estudio 1

Sujetos de prueba:

45 **[0091]** Se obtuvieron calabacines (dicotiledóneas) cultivados hidropónicamente (n= 3) en estadio de floración plantados en bolsas que contienen virutas de madera (medio de soporte) a partir de un vivero para este estudio piloto. Se asignaron las plantas como sigue:

Planta 1: Control- nada administrado.

50

Planta 2: Adición de 100 ml de mezcla de elementol preparada a la bolsa de medio de soporte con virutas de madera para investigar la aplicación a raíces.

Planta 3: Se pulverizó toda la planta con la mezcla de elementol excepto una hoja, que se cubrió con plástico antes de pulverizar.

55

[0092] Después de la administración de la mezcla de elementol como se describe anteriormente, las plantas no recibieron nutrientes adicionales pero se regaron diariamente. Después de 3 semanas, se compararon los calabacines recolectados en términos de tamaño y peso.

Permeación/penetración y visualización de la translocación:

5 **[0093]** Se diseccionaron hojas para obtener tejido de planta de localizaciones desprovistas de venas prominentes, así como cortes transversales de venas prominentes. Se realizaron disecciones de raíces a lo largo de la longitud de la raíz superior. Se visualizaron la absorción y translocación del elementol marcado fluorescentemente por microscopía de barrido láser confocal en un Nikon PCM2000 con un microscopio invertido Nikon Eclipse 300, equipado con láseres de criptón/argón y helio/neón de Spectra Physics. Se usaron los siguientes objetivos: Plan Apo 100x/1,4 Oil DIC H; Plan Apo 60x/1,4 Oil DIC H; y un Plan Fluor/0,75 DIC M. Se capturaron digitalmente imágenes
10 confocales (micrografías) mediante detectores de fluorescencia y fotomultiplicadores. Se realizó la formación de microimágenes instantáneas con un sistema de videocámara Nikon DMX. Se obtuvieron estudios de profundidad usando un cabezal de barrido de 3D en combinación con un motor de paso z en profundidad.

Resultados:

15 **[0094]** Se ilustran los resultados en las micrografías obtenidas por microscopía de barrido láser confocal.

Planta 1: En esta micrografía, no se administró elementol a la planta. Se visualiza el material debido a la autofluorescencia.

20 Planta 2: Se absorbió elementol R (premarcado con el marcador fluorescente rojo Nilo) por la planta a través de las hojas y es visible en secciones transversales de venas prominentes tanto de partes cubiertas como tratadas y en disecciones de las hojas. En esta micrografía, casi todas las vesículas de elementol B han permeado las células de la hoja misma, permaneciendo pocas de las vesículas de elementol en venas prominentes de la planta. La penetración
25 de hoja y translocación por las hojas ocurrieron en menos de 60 minutos (tiempo medio de aproximadamente 20 minutos).

Planta 3: Las vesículas de elementol B penetraban en la planta a través de las raíces y se visualizan en los segmentos de raíz, así como en las secciones transversales de las venas prominentes. Se observaron permeación y translocación
30 de raíces en menos de 60 minutos.

[0095] Los pesos encontrados para los primeros calabacines recolectados se dan a continuación:

Planta 1: Aunque se observaron varias flores en esta planta, no estaban presentes calabacines a la fecha de
35 recolección, mientras que las plantas 2 y 3 producían por una única aplicación de elementol B y agua.

Planta 2: 64,95 g

Planta 3: 28,38 g

40 **[0096]** El estudio no continuó.

Estudio 2

45 **[0097]** Captación y/o suministro potenciado de nutrientes en Clivia cultivadas hidropónicamente

La captación de algunos de los minerales y oligoelementos de medios hidropónicos suministrados es a veces problemática. El estudio 1 mostraba en un número muy pequeño de plantas que las vesículas de elementol se captan por las plantas y pueden incluso contribuir a su crecimiento. En el estudio 2, se atrapó una mezcla de nutrientes
50 hidropónica básica en vesículas de elementol y se monitorizó el crecimiento de las plantas.

Sujetos de prueba:

[0098] Se plantaron 5 grupos de 6 semillas de Clivia cada uno en virutas de madera en tiestos de cartón. Se
55 trataron los grupos

diariamente como se describe a continuación:

El grupo 1 recibió 5 ml de H₂O.

60 El grupo 2 recibió 5 ml de medio hidropónico diluido en H₂O a la concentración estipulada.

El grupo 3 recibió 5 ml de medio hidropónico mezclado con una baja concentración de elementol B (1,98 %) a la concentración estipulada.

65

El grupo 4 recibió 5 ml de medio hidropónico mezclado con una alta concentración de elementol B (4 %) a la misma concentración usada en los grupos 3 y 4.

El grupo 5 recibió 5 ml de medio hidropónico diluido con H₂O saturada con óxido nitroso a las mismas concentraciones usadas para los otros grupos.

Resultados:

Formación de bulbo:

10

[0099] Después de 5 semanas, se investigaron los bulbos con los siguientes resultados:

El grupo 3 mostraba una formación significativa de bulbos, con 2 de las semillas mostrando la formación de múltiples bulbos a partir de una única semilla, mientras que el grupo 5 mostraba formación de bulbos, pero los bulbos parecían blandos y viscosos. El grupo 1 mostraba una mala formación de bulbos pequeños. El grupo 2 mostraba formación de bulbos, pero los bulbos pesaban solo un 38 % de los bulbos del grupo 3.

15

Crecimiento vegetativo:

20

[0100] Se determinó el crecimiento vegetativo midiendo la longitud de la hoja más larga de la planta después de los periodos de tiempo indicados, como se indica en las figuras 11 y 12, que ilustran el crecimiento con el tiempo y una comparación del crecimiento después de 5 semanas. El crecimiento de los 2 grupos que contienen nutrientes hidropónicos disueltos en H₂O o N₂O-H₂ pero no elementol B está muy a la par, con las hojas del grupo que recibía N₂O-H₂O ligeramente más largas que las plantas que recibían agua solo. De los grupos que recibían nutrientes hidropónicos mezclados con elementol B, el grupo que recibía la concentración baja de elementol mostraba el mejor crecimiento de todos los grupos, mientras que el grupo que recibía la concentración alta de elementol mostraba el peor crecimiento. Se hicieron crecer las plantas en tiestos de cartón y los problemas con el drenaje estaban claros por el crecimiento de moho en las virutas de madera y sobre los cartones de los tiestos que recibían la concentración alta de elementol, así como por la viscosidad de los bulbos de este grupo. En este estadio, no pueden extraerse conclusiones de este grupo. Tendrá que investigarse una serie de dilución de elementol.

25

30

EJEMPLO 7

USO DE ELEMENTOL R COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA LA ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTE FOLIAR (CALCIO) EN FRESAS

35

Introducción:

40

[0101] La plantación de las fresas en la parcela de ensayo de 12 ha comenzó a principios de abril de 2005. El material de plantas es todo de primera generación. Los bloques plantados descendían en dirección occidental y la elevación es de alrededor de 100 metros por encima del nivel del mar. El suelo tiene un contenido de arcilla de menos de 5 % y un contenido de carbono orgánico de 0,5 %.

Ensayo:

45

[0102] Este ensayo tenía lo siguiente como objetivo:

Pulverizar elementol B y calcio como aplicación foliar, en tractor, para observar cualquier reacción por las plantas con respecto a niveles de calcio mejorados en las hojas.

50

[0103] La pulverización experimental, por hectárea, comprendía lo siguiente:

250 litros de agua

55

250 ml de elementol

5 kg de CaCl₂

Ensayo y control:

60

[0104] Los bloques de ensayo eran los números 5, 6 y 7, mientras que los bloques de control eran 1, 2, 3 y 4. Se trataron los bloques de ensayo con la combinación mencionada, mientras que se trataron los bloques de control usando un complejo comercial de "ácido fúlvico/CaCl₂". El porcentaje de calcio tanto en ensayo como en control era el mismo.

65

Observaciones:

[0105] Se determinaron los niveles de calcio en hoja en los bloques de ensayo 21 días después de la aplicación y se encontró que eran los siguientes:

5

Bloque	% de Ca antes de tratamiento	% de Ca después de tratamiento	% de ganancia
5	0,86	1,00	16,28
6	0,85	1,01	18,52
7	0,88	1,07	21,59

[0106] Se determinaron los niveles de calcio en hoja en los bloques de control 21 días después de la aplicación y se encontró que eran los siguientes:

Bloque	% de Ca antes de tratamiento	% de Ca después de tratamiento	% de pérdida
1	0,86	0,85	1,16
2	1,15	0,84	26,95
3	1,08	0,80	25,93
4	1,03	0,84	18,45

10

Conclusión:

[0107] Resulta evidente por los resultados que hay una mejora definida de los niveles de calcio en hoja cuando se aplica CaCl₂ en combinación con elementol R a fresas.

15

EJEMPLO 8

USO DE ELEMENTOL R EN ADMINISTRACIÓN FOLIAR PARA DETERMINAR LOS EFECTOS SOBRE PIMIENTOS ROJOS

20

Introducción:

[0108] Se realizó la plantación en una parcela de prueba de 1,2 ha usando plántones de vivero. Se irrigaron por goteo las plantas. El espaciado en la fila deja las plantas separadas 300 mm, mientras que las filas eran filas dobles separadas 450 mm. La población de plantas por hectárea era de 30.000.

25

[0109] El enfoque de fertilización era suministrar unos 300 kg/ha de nitrógeno, principalmente en forma de nitrato de calcio y nitrato de potasio. El objetivo de rendimiento era de 30 ton/ha. La floración ocurre durante diciembre y continúa, mientras que la recolección se inicia a finales de febrero y continúa hasta finales de junio. La recogida principal es de mitad de marzo a mitad de mayo, después de lo cual el volumen empezaba a decaer. Durante el pico de recogida, pueden recolectarse 4 ton/ha cada 10 días.

30

Ensayo:

35 **[0110]** Este ensayo tenía lo siguiente como objetivo:

Pulverizar elementol R como aplicación foliar para observar el efecto sobre la "floración aumentada", así como la coloración temprana hacia el periodo de recolección.

40 **[0111]** La pulverización experimental, por hectárea, comprendía lo siguiente:

200 litros de agua

200 ml de elementol R

45

Control:

[0112] El área de control comprendía un área pequeña en el mismo bloque y no recibía elementol R.

50 Observaciones:

[0113] Se observaron más flores en el ensayo en comparación con el control hacia finales de diciembre, pero no se hicieron recuentos.

[0114] Hacia finales de enero, el fruto en el ensayo mostraba signos de coloración avanzada en comparación con el control, pero la observación se hizo difícil debido a las altas temperaturas que daban como resultado la coloración del control también. La sensación es, sin embargo, que había una mejor coloración en el ensayo en comparación con el control.

Conclusión:

10 **[0115]** No está claro si el elementol contribuía de hecho significativamente a la coloración avanzada de los pimientos rojos, puesto que otros factores, tales como temperaturas, distribución de la fertilización, etc. pueden haber influido en el resultado. El granjero sintió sin embargo que había diferencia.

15 **[0116]** La importancia real es que el granjero procuró 29 ton/ha durante el periodo de recolección de las que 24 ton eran de valor comercial. Este rendimiento es sustancialmente mejor en comparación con la media de área.

[0117] Debido a las observaciones del granjero, aumentaba la aplicación de elementol R a 250 ml/ha durante 4 semanas consecutivas, cuando las plantas empiezan a florecer, con los siguientes resultados:

20 Las plantas eran más grandes con mejor cobertura foliar;

El rendimiento de fruto recolectado aumentaba un 15 % debido a la administración de elementol R;

25 La coloración de las plantas tratadas con elementol es "agresiva".

[0118] El granjero encontró que eran necesarios al menos 3 tratamientos antes de observar el impacto máximo de elementol R.

30 EJEMPLO 9

USO DE ELEMENTOL B COMO VEHÍCULO DE SUMINISTRO PARA ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTE FOLIAR A GIRASOLES

35 Introducción:

[0119] Se realizó la plantación en semilleros separados 910 mm (espaciado antiguo de 3 pies). Se calculó la población de plantas en la plantación en 40.000 semillas por hectárea, con una emergencia esperada de entre 35.000 y 38.000 plantas.

40 Acción (ensayo):

[0120] Se implicaron dos campos separados aproximadamente 1 km, no porque estuvieran destinados o preparados para ensayo, sino simplemente porque estaban en estrecha proximidad entre sí y uno podía servir como control para el otro. La parcela de ensayo era de aproximadamente 95 ha de extensión y la parcela de control de aproximadamente 200 ha.

[0121] Se pulverizaron las plantas de ensayo con lo siguiente:

50 1 litro/ha de "AminoPotas" (100 g/l de "K" complejado o quelado con aminoácido)

½ litro/ha de "Aminocalcium" (100 g/l de "Ca" complejado o quelado con aminoácido)

5 kg/ha de urea (2,3 g de "N" como NH₄)

55 50 ml/ha de elementol B

27 l/ha de agua

60 **[0122]** Se elaboraron las mezclas de pulverización en un vagón cisterna de mezclado y la aplicación era por pulverización aérea.

Control:

65 **[0123]** Se pulverizó el control con la misma mezcla, excluyendo elementol b.

Observaciones:

5 **[0124]** Se realizaron las medidas realizadas para establecer la diferencia en rendimiento entre ensayo y control mediante la "pesada" separada de la tolva de recolección combinada (el cubo en que fluye la semilla una vez separada de la cubeta de flores).

Conclusión:

10 **[0125]** El resultado del muestreo fue como sigue:

Ensayo:	2.735 kg/ha
Control:	1.650 kg/ha
Diferencia:	1.085 kg/ha
Potenciación media:	65,8 %

EJEMPLO 10

15 USO DE ELEMENTOL R EN LA DESVERDIZACIÓN DE MANZANAS

[0126] Se aplicó elementol R por pulverización manual al inicio de la formación de fruto en una fila de ensayo de un huerto, mientras que otras filas en el huerto no recibían tratamiento. Las manzanas pulverizadas con elementol R desverdecían sustancialmente antes que las manzanas no tratadas.

20

[0127] Se obtuvieron resultados similares con pimientos rojos con coloración agresiva debido al tratamiento de elementol. (4 aplicaciones) tasa de aplicación de 1 l/ha (véase el Ejemplo 8). Lo que hace significativo los resultados de coloración de las manzanas, cítricos y pimientos rojos es el hecho de que estos resultados muestran que la administración de elementol R tenía el mismo impacto en plantas C3 y C4, en anuales y perennes, en entorno controlado y ensayos de campo abierto.

25

EJEMPLO 11

EFFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE ELEMENTOL A VIDES

30

[0128] Se seleccionaron dos vides en el mismo viñedo para comparar el efecto de una única aplicación de elementol B a toda la vid, incluyendo los tallos, con pulverización manual, pero excluyendo las raíces.

[0129] El diámetro de los tallos de vid tratados engrosó significativamente y el índice foliar aumentó drásticamente. El rendimiento de fruto era también mayor.

35

EJEMPLO 12

40 PROTECCIÓN FÚNGICA POR ELEMENTOL Y AUMENTO DE LA VIDA DE ALMACENAMIENTO DE ROSAS CON ELEMENTOL B

[0130] Se trataron rosas Red Success, conocidas por ser altamente susceptibles a infestación por roya blanca, con Dithane elaborado y aplicado según la especificación del fabricante. Se pulverizaron las plantas de ensayo con formulaciones de Dithane similares a las que se añadía elementol B para obtener una dilución de 1 a 10.

45

[0131] Se encontró que las plantas tratadas con Dithane/elementol B no tenían signos de roya blanca cuando todas las plantas alrededor se infectaban, y además parecían durar mucho más tiempo después de la recogida antes de empezar a marchitarse.

50 EJEMPLO 13

UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LA POTENCIACIÓN DE LA EFICACIA DE ROUND-UP POR ELEMENTOL

[0132]

55

Finalidad: La erradicación de la acederilla.

Mala hierba: La acederilla, una mala hierba robusta y resistente que es casi imposible de erradicar con ningún tratamiento.

60

Tratamiento:

5 **[0133]** Se usó Roundup Turbo como herbicida de la siguiente manera. Se trataron parcelas de control de referencia y se evaluaron de la misma manera que las parcelas de tratamiento con respecto al herbicida añadido y las prácticas de cultivo. Se asignaron diversas parcelas de tratamiento. Se describe el tratamiento con más detalle a continuación.

Tratamiento de prueba:

10 **[0134]** Se diluyó una concentración de Roundup Turbo al 0,6 % y 40 ml de elementol B a 401 y se aplicó a 1 ha. Se pulverizó un campo de 80 ha con esta mezcla.

Tratamiento de referencia:

15 **[0135]** Se usó Roundup Turbo como herbicida de la siguiente manera: Se diluyó el herbicida a una concentración final de 2,8 % de Roundup Turbo sin la adición de elementol B. Se aplicó un volumen similar por hectárea a una extensión similar (80 ha).

20 **[0136]** Parcela de control: Se presentaron las parcelas de control en franjas de un campo mayor plantadas con pasto pangola. Las áreas no tratadas de este campo se usaron como parcela de control.

Procedimiento de aplicación:

25 **[0137]** El procedimiento de aplicación era exactamente el mismo tanto para tratamiento de prueba como de referencia en términos de tasas de dosificación y equipo de aplicación (boquilla a presión). Se aplicó el herbicida por pulverización con tractor y aparato de pulverización. Se aplicó el herbicida solo una vez a mediados de invierno. No se añadieron agente humectante ni adyuvante a ninguno de los tratamientos de prueba o referencia.

Resultados y observaciones:

30

[0138]

a) Una semana después de la aplicación, la hierba o acederilla mostraba marchitamiento en las plantas de prueba pero no de referencia.

35

b) Después de dos semanas, las plantas de prueba tratadas mostraban síntomas fitotóxicos típicos, es decir, amarilleamiento de las hojas (clorosis), que era seguido de necrosis.

40 c) Un mes y medio después de la aplicación, la mayoría de la acederilla mostraba una grave fitotoxicidad, mientras que todas las hierbas habían muerto.

d) Las observaciones reseñadas incluyen todas las variaciones, inhibitoras o estimulantes, entre las plantas tratadas y no tratadas (de control). Tales variaciones pueden ser efectos formativos (deformación de hoja y tallo) y/o tasas de crecimiento y desarrollo.

45

Conclusión

[0139] A pesar de usar un 79 % menos de Roundup Turbo en el tratamiento de prueba, la muerte resultante de la mala hierba estaba potenciada en presencia de elementol B.

50

EJEMPLO 14

UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LA POTENCIACIÓN DE VÁSTAGOS ACODADOS DE MANZANA Y ÁRBOLES DE VIVERO POR ELEMENTOL R (2005/2006)

55

[0140] Vástagos acodados: Esto es un conglomerado de tallos cultivados a partir de un portainjerto específico, cuyos ejemplos son M7 o M9. El propósito de este cultivo es producir una gran cantidad de "tallos" sobre los que puedan injertarse variedades de manzana de elección. Tales variedades pueden ser Gala, Royal Gala, Brae burn, Oregon Red Spur, etc. Durante tal cultivo, el éxito se mide por la cantidad de tallos disponibles para injerto de cualquier conglomerado. El grosor de tallo es el criterio principal, mientras que la calidad y volumen de raíces son secundarios. Los tallos que son demasiado finos no permiten el injerto.

60

[0141] Árboles de vivero: Esto es portainjerto que se ha injertado antes de trasplantarse para crecimiento inicial. El ideal es hacer crecer estos hasta al menos 1,5 metros de altura antes de considerarlos preparados para trasplante comercial.

65

Objetivo del ensayo

5 **[0142]** El objetivo primario era introducir elementol R con el fin de establecer el efecto que tiene sobre la mejora del grosor de tallo en un entorno de vivero. El efecto se constató por primera vez en robles tratados aleatoriamente.

[0143] El objetivo secundario era potenciar el crecimiento de los árboles injertados para trasplante comercial.

Procedimiento

10

[0144] El procedimiento de aplicación era un pulverizador foliar junto con algo de pulverizador de nutriente aplicado foliar. Se trataron 80 vástagos acodados con 100 ml de elementol R/20 litros de agua, lo que significa que se aplicaron 1,25 ml de elementol R junto con nutrientes por vástago acodado. Esta aplicación se inició durante noviembre de 2005 y se repitió cada 10 días. Se mantuvo el programa hasta el presente.

15

Control

[0145] Los vástagos acodados de control recibían el mismo tratamiento, excepto porque no se añadió elementol R.

20

Resultado

25 **[0146]** Resultados obtenidos durante la primera semana de febrero de 2006: Los acodos tratados procuraban 63/100 (63 %) de tallos injertables, mientras que el control procuraba solo 34/100 (34 %). El grosor medio de tallo era de 11 mm.

30 **[0147]** Resultados obtenidos durante la segunda semana de febrero de 2006: Los árboles injertados a partir de tallos portainjerto que están en el programa de elementol R son de media de 2 m de alto, mientras que aquellos cultivados sin elementol son de media de 1,5 m de alto. Los árboles tratados con elementol R han empezado a ramificar, es decir, se han desarrollado brotes laterales, mientras que la ramificación está completamente ausente en los árboles donde no se aplicó elementol R.

35 **[0148]** Debe tomarse conciencia de que quedan aproximadamente 6 semanas de desarrollo tanto para control como ensayo. Aunque se prevé que el control pueda mejorar, es improbable que iguale el ensayo con elementol R.

EJEMPLO 15

UN ESTUDIO COMPARATIVO PARA DETERMINAR EL EFECTO DE ELEMENTOL R SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESCAMAS DURAS

40

[0149] La semilla de trébol flecha es conocida por ser una semilla de escamas duras que carece de consistencia en la germinación. Se mostró que la formulación de elementol era beneficiosa con respecto a la germinación de estas semillas al empapar cantidades de semillas en agua limpia, elementol R no diluido y una solución de elementol al 5 % en agua durante 24 h y empaquetar entonces las semillas empapadas en semilleros y observar la germinación de las mismas. Se encontró que las semillas que se habían empapado durante 24 horas en la solución de elementol al 5 % en agua tenían una tasa de germinación un 30 % mejor que los dos otros grupos de semillas.

45

EJEMPLO 16

50 EL EFECTO BIOESTIMULANTE DE ELEMENTOL R: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN FOLIAR DE ELEMENTOL R SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LECHUGA

1. Material, crecimiento de planta y tratamiento

55 **[0150]** Planta: Lechuga o cos, romana (*Lactuca sativa*) de la familia: Asteraceae/Compositae (familia de áster/margarita). Cultivar: Se usó lechuga (*Lactuca sativa* L.), cultivar Red Poem, y estaba bien establecida (aproximadamente 6 semanas de edad) cuando se adquirió de un vivero local.

1.1 Procedimiento de cultivo: Sistema de "goteo" hidropónico no circulante

60

[0151] Se usaron tuberías de PVC con orificios para encajar las macetas y se conectaron con un depósito y una bomba de acuario para suministrar a las plantas cantidades iguales de agua y nutrientes a través de la tubería de PVC. Se sellaron los escapes para asegurar que no escapa agua del sistema. Se colocó un depósito que contiene la solución nutriente bajo las tuberías y una bomba de acuario suministraba a las plantas agua y nutrientes. Se conectó la bomba a un temporizador para controlar la cantidad de agua y nutrientes suministrada a las plantas. Se capturó la

65

escorrentía en un depósito separado, no circulando por tanto el sistema, y se desechó.

[0152] Para controlar la cantidad de agua para cada planta, se usaron irrigadores para regular la presión en el sistema y suministrar iguales cantidades de agua (± 9 ml cuatro veces al día) a cada planta. El sistema de goteo no circulante aseguraba que las plantas recibían un suministro óptimo de agua y que el pH y CE (conductividad eléctrica) del medio nutriente eran constantes. Se midió la CE de los nutrientes en el depósito de suministro así como en el depósito de escorrentía, lo que permitió la determinación de la cantidad de nutrientes suministrada frente a la cantidad desechada. Puede calcularse por tanto la cantidad de nutrientes usada por la planta o retenida por el medio de soporte. Por tanto, cuando la CE cae o aumenta demasiado, podrían añadirse o retenerse nutrientes de la solución nutriente suministrada a las plantas consiguientemente. Se usó un medidor de conductividad digital PW 9526 Digital para medir la CE en milisiemens por centímetro ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). La no circulación del medio nutriente puede restringir la extensión de enfermedades en el sistema de plantas infectadas a plantas no infectadas.

1.2 Medio de crecimiento, nutrientes y trasplante

15

[0153] Se usó fibra de coco como medio de soporte en el sistema hidropónico. Es un medio inerte con la capacidad de retener suficiente agua y aire para un buen desarrollo de raíces y buena retención de agua.

[0154] Se usó una solución nutriente Hygrotech con la siguiente composición: Macroelementos: Nitrógeno (N) 68 g/kg, potasio (K) 208 g/kg, fósforo (P) 42 g/kg, magnesio (Mg) 30 g/kg, azufre (S) 64 g/kg. Microelementos: Hierro (Fe) 1254 mg/kg, cobre (Cu) 22 mg/kg, cinc (Zn) 149 mg/kg, manganeso (Mn) 299 mg/kg, boro (B) 373 mg/kg y molibdeno (Mo) 37 mg/kg.

[0155] Los nutrientes consistían en una mezcla de solución nutriente Hygrotech y solución nutriente de nitrato de calcio en cantidades iguales: Se disolvieron 36 g de Hygrotech y 36 g de nitrato de calcio en 2 l de agua y se añadieron entonces a un depósito que contiene 38 l de agua. El pH y la conductividad eléctrica de la solución nutriente son una indicación de los iones disueltos presentes en las soluciones nutrientes y se monitorizaron.

[0156] Se trasplantaron las lechugas de los contenedores originales a los contenedores hidropónicos que contienen fibra de coco así como grava gruesa en el fondo del contenedor para asegurar un drenaje adecuado de agua y aireación de las raíces. Antes de trasplantar las lechugas, se aclararon de cualquier suelo adicional que pudiera estar todavía alrededor de las raíces. Se pesaron las plantas. Después del trasplante, se colocaron las plantas en el sistema y se dejaron aclimatar durante una semana antes de empezar la experimentación.

[0157] Se colocaron también las plantas en orden aleatorio cada semana para asegurar que reciben iguales cantidades de luz solar, calor, agua, etc.

1.3 Condiciones de invernadero

[0158] Se realizó el estudio dentro de un invernadero para asegurar los niveles óptimos de temperatura así como humedad para las plantas en el sistema hidropónico. La mayoría de las condiciones atmosféricas podían controlarse efectivamente y se minimizó el riesgo de enfermedades. Se midió la temperatura del invernadero semanalmente a las 12 de la tarde justo por encima del sistema hidropónico con un termógrafo.

[0159] Se reguló la temperatura en el invernadero por un acondicionador de aire. Se reguló la temperatura a un máximo de 24 y un mínimo de 15 °C. La temperatura máxima era de 28 °C y la temperatura mínima era de 4 °C. Se obtuvieron la temperatura máxima y mínima usando un termohigrógrafo y se tomó la temperatura tanto de día como de noche.

[0160] Se midió la humedad relativa (HR) usando un termohigrógrafo giratorio y se tuvieron en consideración tanto la humedad diurna como nocturna. La humedad relativa podía determinarse en porcentaje de humedad máxima de la atmósfera, % de HR. El % de HR máxima era de 98 % y el % de HR mínima era de 29 % (26 de marzo de 2006).

1.4 Intensidad de luz

55

[0161] Se midió la intensidad de luz dentro del invernadero con un fotómetro Quantum Radio. Se determinó la intensidad de luz a las doce diariamente justo por encima del sistema hidropónico. Las nubes y condiciones nubladas influían en la intensidad de luz. El cambio de estación afectaba también a la intensidad de luz. Durante los meses de invierno, la intensidad de luz era menor que la tomada durante los meses más cálidos. La intensidad de luz máxima a las 12:00 era de $4600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La intensidad de luz mínima a las 12:00 era de $850 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

[0162] Se tuvo cuidado de exponer todas las plantas a cantidades iguales de luz solar y otros factores abióticos. Se movieron las plantas a diferentes disposiciones cada semana.

65 1.5 Tratamiento de planta

[0163] Las plantas de control (C) no recibieron ningún tratamiento en absoluto. El tratamiento con elemento R como se describe anteriormente se preparó como sigue:

5 Se mezclaron 3 ml de elementol R con 250 ml de H₂O.

[0164] El tratamiento foliar de las plantas de prueba consistía en pulverizar la mezcla de elementol R sobre las hojas hasta el estado de saturación, pero justo antes del estado de goteo. Se pulverizaron las plantas con frascos pulverizadores y se tuvo cuidado de no contaminar el sistema o el medio de soporte. Se trataron las plantas cada 4
10 semanas (semana 1, 5 y 9) hasta el final del estudio. Por cada 2 plantas usadas como control, se trataron 3 plantas con mezcla de elementol R. Al tratar dos o más de dos plantas con el mismo tratamiento, pudo obtenerse una buena media por tratamiento.

1.6 Tratamiento de enfermedades

15

[0165] Ocurren diversas enfermedades en lechuga. Las enfermedades fúngicas se trataron sistémicamente con Funginex®. Se trataron las plantas siempre que se observó enfermedad fúngica aplicando Funginex® diluido (3 ml de fungicida añadido a 500 ml de H₂O) sobre las hojas.

20 2. Medida de parámetros relacionados con el crecimiento y el desarrollo

[0166] Antes del trasplante de las plantas jóvenes de lechuga, se pesaron y después de ello se pesaron semanalmente con una balanza Mettler PJ 3000. Se determinó el peso del material no vegetal y maceta y se restó de la masa total para determinar el peso de planta después del crecimiento de cada semana.

25

2.1 Crecimiento y desarrollo

[0167] Se midió el crecimiento de las cabezas de lechuga semanalmente. Se calcularon los valores de diámetro de cabeza medio a partir de tres valores de diámetro. Se midió la altura de planta desde la parte superior de la fibra de coco a la parte superior de la hoja más alta. Se calculó entonces el diámetro de cabeza y la altura medios para cada tratamiento.

30

[0168] El tratamiento con elementol potenciaba el crecimiento medio de las plantas como se determinó en el diámetro de cabeza por una media de 11 % durante el periodo de ensayo (véase la figura 13, que es una gráfica que muestra el diámetro de cabeza medio de plantas de lechuga tratadas con elementol R frente a plantas de control durante un periodo de 12 semanas después del trasplante). Los asteriscos indican el momento de tratamiento. Se dieron tres tratamientos con elementol durante el periodo de ensayo.

35

[0169] Se calculó el % de potenciación según la siguiente fórmula:

40

$$\% \text{ de potenciación} = \frac{\text{diámetro de cabeza medio de planta de prueba} - \text{diámetro de cabeza medio de plantas de control}}{\text{diámetro de cabeza medio de plantas de control}} \times 100$$

[0170] El crecimiento comparativo medio en la altura de planta de las plantas era muy similar para las plantas tratadas y de control hasta la semana 11, cuando las plantas alcanzaron la madurez (véase la figura 14, que es una gráfica que muestra el crecimiento comparativo medio en la altura de planta de plantas de lechuga tratadas con elementol R frente a plantas de control durante un periodo de 12 semanas después del trasplante). Obsérvese el drástico aumento de crecimiento en la semana 11. La potenciación del crecimiento se correlacionaba con la floración: las plantas tratadas con elementol R eran las primeras en florecer, sugiriendo que elementol R podría acortar el tiempo de desarrollo.

50

[0171] Es otra medida de la potenciación del desarrollo de planta comparar el número de hojas de una planta tratada y de control (véase la figura 15, que es una gráfica que muestra una comparación planta a planta de plantas de lechuga tratadas con elementol R frente a plantas de control usando plantas con un número similar de hojas en el 1º tratamiento). Los asteriscos indican las semanas de tratamiento (semana 1 y 5). La potenciación media durante el periodo de 5 semanas se calculó que era de 20,7 %.

55

2.2. Masa fresca y seca (Fm:Dm), relación de Fm:Dm y % de agua

[0172] Esta relación indica la cantidad de agua y masa seca presente por cada gramo de material de planta. La masa seca es la cantidad de material seco dejada después de retirar todo el agua y es una indicación de la efectividad del crecimiento. Se midió la masa fresca y seca de las plantas cada dos semanas. Para determinar la masa fresca, se cortaron 10 discos cilíndricos de exactamente el mismo tamaño de hojas frescas y se determinó la masa de cada disco. Se colocó el disco en una estufa Labotec a 72 °C durante 72 horas. Se determinó entonces la masa seca.

60

Se obtuvo la relación de masa fresca a masa seca dividiendo la masa fresca entre la masa seca.

[0173] Se calculó que el % de potenciación medio total de las relaciones de Fm:Dm causada por tratamiento con elementol R durante el periodo de ensayo era de 39,5 % (véase la figura 16, que es una gráfica que ilustra el % de potenciación medio de las relaciones de Fm:Dm durante el periodo de ensayo causada por tratamiento con elementol R de las plantas de lechuga frente a plantas de control). Se calculó que el % de potenciación medio total durante el periodo de ensayo era de 39,5 %. Véase también la figura 17, que es una gráfica que ilustra la diferencia en plantas de lechuga tratadas con elementol R y plantas de control en términos de % de humedad.

10 **[0174]** Para determinar el % de humedad de las hojas, se usó el siguiente cálculo:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(\text{masa fresca} - \text{masa seca})}{\text{masa fresca}} \times 100$$

[0175] El % de humedad indica la cantidad de agua presente en la planta. La cantidad de agua presente en lechuga debe estar correlacionada con la masa seca de la lechuga. El % de humedad era relativamente estable durante el periodo de ensayo, aunque el % de humedad de las plantas tratadas con elementol se mantenía a un 5 % de contenido de humedad durante las últimas 6 semanas del ensayo (semana 8 a semana 14), indicando que el tratamiento con elementol da como resultado cierta capacidad de retención de agua. El mayor contenido de humedad no es suficiente para explicar el mucho mayor aumento de la relación de Fm:Dm.

20
3. Medida de parámetros relacionados fisiológicos

[0176] Se usaron como parámetros fisiológicos respiración de planta, fotosíntesis, clorofila, proteína (PAGE-SDS al 12 %) y contenido de azúcar. Además de reflejar la salud de la planta, estos parámetros pueden dar una indicación de la razón para la potenciación del crecimiento y desarrollo por elementol. Se determinó cada uno de estos parámetros (excepto azúcares) una vez por semana para todas las plantas.

3.1 Contenido de proteína

30 **[0177]** Se midió la proteína bisemanalmente de la semana 1 en adelante según el procedimiento descrito a continuación. Se tomó ± 1 gramo de masa fresca semanalmente para determinar la concentración de proteína de cada planta. Se molieron las hojas frescas en 5 cm³ de tampón Tris-HCl mM (pH 6,8) que contenía EDTA 2 mM, β -2-mercaptoetanol 14 mM y PMSF 2 mM usando mortero y almirez. Se centrifugó el extracto bruto en una centrífuga de sobremesa enfriada durante 10 minutos a 12.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se diluyó 5 veces. Se determinó la concentración de proteína de la dilución según el procedimiento Bio-Rad de Bradford (1976). Se determinó la absorbancia de la dilución a 595 nm con un lector de microplacas de Bio-Rad con gamma-globulina bovina como patrón con una concentración de 0,5 mg/ml. Al tomar cuatro lecturas por planta, pudo determinarse de forma razonablemente precisa la concentración de proteína.

40 **[0178]** Se determinaron semanalmente las concentraciones de proteína de las plantas tratadas y las plantas controladas y no mostraban diferencias significativas.

3.2 Respiración y fotosíntesis

45 **[0179]** Pudo determinarse la tasa de consumo de O₂ para respiración, así como la tasa de fotosíntesis, mediante manometría a presión usando un respirómetro Gilson diferencial sumergible. Se tomaron lecturas, expresadas en nmol de O₂ por hora por gramo de masa fresca, cada pocos minutos. Este procedimiento estaba adaptado de Stauffer (1972). Se siguió un procedimiento de estado estacionario de intercambio de gas. Se midió la respiración en condiciones oscuras, mientras que se midieron tanto fotosíntesis como respiración en condiciones de intensidad de luz constante.

[0180] Se cortaron 10 discos de hoja por planta de hojas frescas con aproximadamente 1,5 cm de diámetro. Se retiraron los discos aleatoriamente de hojas aleatorias para asegurar resultados bien representativos para cada planta. Se pesaron los discos y se colocaron entonces en un recipiente de reacción Warburg con 500 μ l de H₂O destilada. Se añadieron 300 μ l de KOH al 12 % al pocillo central junto con papel de filtro plegado para ampliar el área de absorción de CO₂ de la atmósfera interior del recipiente. El KOH absorbe CO₂ formando bicarbonato y asegura que se mide solo la cantidad de consumo y síntesis de O₂. Se fijó cada recipiente al aparato y se dejó equilibrar en la oscuridad durante el periodo requerido. El equilibrado tuvo lugar mientras la máquina oscilaba a 25 °C en un baño de agua. Después del equilibrado, se cerraron las válvulas atmosférica y manométrica para asegurar un sistema hermético. Se tomaron lecturas (R) a intervalos de tiempo predeterminados: R₁ es la diferencia de lectura manométrica entre 10 y 20 minutos en la oscuridad. P&R es la diferencia de lectura manométrica entre 40 y 50 minutos a la luz. R₂ es la diferencia de lectura manométrica entre 65 y 75 minutos en la oscuridad. Las lecturas manométricas corresponden a un cambio en el volumen de gas, que es igual a la cantidad de O₂ consumida y sintetizada. Se obtiene la tasa de respiración y fotosíntesis mediante las siguientes fórmulas:

Respiración:

[0181]

5

$$\mu\text{l de O}_2 \text{ conservado} = \frac{\text{O}_2\text{R}_1}{\text{minutos R}_1} + \frac{\text{O}_2\text{R}_2}{\text{minutos R}_2} \div 2$$

Fotosíntesis:

10 **[0182]**

$$\mu\text{l de O}_2 \text{ producido} = \frac{\text{O}_2\text{P\&R}}{\text{minutos P\&R}} + \frac{\text{O}_2\text{R}_1}{\text{minutos R}_1} + \frac{\text{O}_2\text{R}_2}{\text{minutos R}_2} \div 2$$

[0183] Se convirtió la tasa de $\mu\text{l de O}_2/\text{minuto}$ en:

15

$$\mu\text{l de O}_2/\text{h/g de Fm} \rightarrow (\Delta \mu\text{l}/\text{min} \times 60 \text{ minutos}) \div \text{g de masa fresca}$$

[0184] Se corrigieron los valores de intercambio de gas según el procedimiento de Gregory y Purvis (1965) usando la siguiente ecuación:

20

$$X = \frac{\Delta Vg \times (T'')(Pb - 3 - Pw)}{(T + 273)(P')}$$

[0185] donde:

25 X= volumen total de gas medido (mm^3) a temperatura y presión estándares (STP)

ΔVg = cambio de volumen en el respirómetro

T'= temperatura estándar, 273°K

30

T= temperatura de baño caliente, 25 °C

Pb= presión atmosférica reinante, mm de Hg

35 Pw= presión de vapor de agua a la temperatura reinante a la que se realizó el experimento

P'= presión estándar, 760 mm de Hg

[0186] Si:

40

$$1 \mu\text{l de volumen} \times 273 [645 \text{ mm de Hg (BFN)} - 3 - 23,756]$$

$$(25 \text{ °C} + 273)(760)$$

$$45 = 273 (618,244)$$

$$(298)(760)$$

$$= 0,745234 \mu\text{l a } 25 \text{ °C}$$

50

[0187] Por tanto, 1 μl = 0,745234 μl de volumen real en Bloemfontein (BFN).

[O₂] en la atmósfera = ± 21 %

1 mol de O₂ = 22,414 dm³ (litros)

= 22,414 litros (dm³) = 1 mol de O₂

Si: 1 litro = 0,0446149 mol de O₂

A nivel del mar 1 μl = 0,0446149 μmol de O₂

En BFN: 1 μl = 0,745234 μl = 0,0332485 μmol de O₂

[0188] Para convertir μl de O_2 en μmol de O_2 :

$$\mu\text{l de O}_2/\text{h/g de Fm} \rightarrow \Delta \mu\text{l de } \mu\text{l de O}_2/\text{h/g de Fm} \times 0,0332485 \mu\text{mol de O}_2$$

5

[0189] Se determinaron las tasas de respiración y fotosintética cada semana y, aplicando las fórmulas anteriormente mencionadas, se corrigieron los valores para compensar la diferencia en las presiones de aire a nivel del mar o altitudes mayores. Las tasas de respiración y fotosíntesis, así como las relaciones de fotosíntesis: respiración, eran relativamente constantes y comparables durante el periodo de 13 semanas de este ensayo. Sin embargo, cuando se corrige la tasa de respiración por el contenido de proteína, se encuentra potenciación de la tasa de respiración en plantas tratadas con elementol.

[0190] Se midieron las tasas de respiración y fotosíntesis y pusieron en correlación entre sí. La tasa de fotosíntesis debe superar siempre la tasa de respiración, porque la ganancia de carbono debe superar el uso de carbono o si no habrá una pérdida neta de carbono. Cuanto más alta es la tasa de fotosíntesis: respiración, mejor es la tasa de crecimiento, ya que hay un aprovechamiento neto mayor de carbono cuando las relaciones son altas. La relación era relativamente constante durante las 13 semanas del ensayo.

[0191] La fotosíntesis, como la respiración, muestra una forma de "U"; cuando se plantó la lechuga, las plantas eran muy verdes y tenían un alto contenido de clorofila. La tasa tanto de fotosíntesis como de respiración era alta durante el periodo de crecimiento inicial, ya que el alto metabolismo de las plantas jóvenes requiere también una alta tasa de fotosíntesis para suministrar a la planta cantidades adecuadas de azúcares que se respiran. La fotosíntesis y respiración disminuyeron entonces, después de lo cual aumentó la tasa de fotosíntesis de nuevo. La tasa de fotosíntesis debe superar siempre la tasa de respiración para suministrar a la planta suficientes azúcares para el metabolismo primario y suministrar a la planta azúcares durante el metabolismo secundario, así como para almacenar compuestos adicionales para uso posterior. La tasa de fotosíntesis aumentaba durante las últimas semanas para acompañar la elevación de la tasa de respiración. Una mayor fotosíntesis es también debida a más clorofila presente en las últimas semanas. El mayor contenido de clorofila da como resultado una mejor capacidad de fotosíntesis.

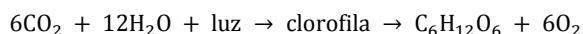
[0192] La tasa de respiración de plantas tratadas con elementol es generalmente ligeramente mayor que la de los controles, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas, excepto en la semana 5 directamente después del segundo tratamiento con elementol (figura 18).

3.3 Contenido de clorofila

35

[0193] La síntesis de nuevo material vivo requiere una entrada de energía que se obtiene del sol mediante el proceso de fotosíntesis. La clorofila es un componente esencial de la fotosíntesis. La clorofila es el principal pigmento absorbente de luz. Las moléculas de clorofila se disponen específicamente en y alrededor de complejos proteicos llamados fotosistemas, que están embebidos en las membranas tilacoides de cloroplastos. Unas pocas formas diferentes de clorofila ocurren de forma natural, incluyendo clorofila a y clorofila b. Se forman también pigmentos protectores por muchas plantas. Algunos de estos pigmentos accesorios, particularmente los carotenoides, sirven para absorber y disipar la energía lumínica en exceso, o funcionan como antioxidantes. Otros pigmentos, tales como carotenoides, desempeñan un papel en la absorción de luz a diferentes longitudes de onda.

45 Se muestra la reacción global de fotosíntesis en la siguiente ecuación (que produce un azúcar de hexosa) (Stern, 2003).



50 **[0194]** Durante la fotosíntesis, están implicadas dos reacciones de luz, que incluyen el fotosistema I (PS I) y el fotosistema II (PS II). Estos recolectan luz a diferentes longitudes de onda para máxima eficiencia. Estos dos sistemas tienen que trabajar cooperativamente para ser eficientes. Los sistemas pueden ser dependientes de la luz o independientes de la luz. Una reacción importante durante la fotosíntesis implica el transporte de electrones del agua a NADP. posiblemente durante el mecanismo conocido como el esquema Z. La tasa de fotosíntesis puede medirse determinando la cantidad de dióxido de carbono consumida o la cantidad de oxígeno liberada usando técnicas manométricas. Ocurren diferentes tipos de fotosíntesis y se denominan fotosíntesis C_3 (la mayoría de plantas), fotosíntesis C_4 , la mayoría de hierbas, y fotosíntesis CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), que ocurre en la mayoría de las plantas suculentas. Los factores que influyen en la fotosíntesis incluyen la intensidad y cantidad de luz, la disponibilidad de agua, la adaptación a áreas de sol y sombra, la disponibilidad de CO_2 , la temperatura, la edad de la hoja y la translocación de carbohidratos.

[0195] Se determinó semanalmente el contenido de clorofila usando el procedimiento de extracción de MacKinney (1941), cortando 10 discos de tamaño igual aleatoriamente de hojas aleatorias de la planta. Se molieron los discos en acetona al 80 % en un mortero con un almirez sobre hielo y se centrifugó el homogeneizado en una centrífuga de sobremesa enfriada durante 10 minutos a 12.000 rpm. Se diluyó el sobrenadante 5X. Se determinaron

65

los valores de absorbancia de cada dilución usando un espectrofotómetro Pye Unicam SP8-400 uv/vis. Se midieron los valores de absorbancia a 663 nm así como a 645 nm en una cubeta de vidrio de 1 cm.

[0196] Se determinaron las concentraciones de clorofilas como sigue (MacKinney (1941)):

$$\text{Clorofila a (mg/g)} = [12,7 (A663) - 2,69 (A645) \times (V \div (1000 \times W))]$$

$$\text{Clorofila b (mg/g)} = [22,9 (A645) - 4,68 (A663) \times (V \div (1000 \times W))]$$

[0197] donde: A= absorbancia de la dilución a la longitud de onda dada

V= volumen final de extracto

W= masa fresca de discos usada

[0198] Cuando se procede a una comparación entre la cantidad de clorofila en las plantas experimentales y de control, debería corregirse la cantidad de proteína y masa fresca, ya que se ha mostrado que estas difieren entre los dos grupos. Las plantas tratadas con elementol R muestran un aumento medio tanto de clorofila a como b cuando se comparan con las plantas de control (figura 19).

[0199] De forma interesante, la potenciación especialmente de clorofila a, pero en cierta medida también de clorofila b, refleja una potenciación similar en las plantas tratadas con elementol que la observada en la altura de planta, número de hojas y cantidad de proteína. Se observó una potenciación media de 14 % y 20 % durante el periodo de estudio total para clorofila a y clorofila b, respectivamente, mientras que se observó una potenciación media de 42 % y 34 % durante las últimas 4 semanas (semana 9 a 13) del estudio para clorofila a y b respectivamente. Los resultados combinados sugieren firmemente que el aumento del contenido de clorofila causado por el tratamiento con elementol es directamente responsable del efecto bioestimulante de elementol R.

[0200] A pesar de la diferencia en la potenciación relativa de clorofila a y b, la comparación entre las relaciones de clorofila a a b corregidas en plantas tratadas con elementol y de control no mostraba diferencia (véase la figura 20, que es una gráfica que refleja las relaciones de clorofila a:b obtenidas de la clorofila corregida por mg de proteína y masa fresca). Las curvas casi idénticas confirman la ausencia de ningún efecto fitotóxico sobre los aparatos de fotosíntesis de las plantas.

3.4 Contenido de azúcares

[0201] La cantidad de azúcar presente es un resultado directo de la cantidad de nutrientes disponibles. Aumentar las tasas de N y P aumentaba gradualmente el contenido de glucosa en lechuga, pero disminuía la vida de almacenamiento (www.ars.usda.gov). La tasa de respiración así como la tasa de fotosíntesis tienen un efecto sobre la cantidad de azúcares disponibles.

Se usó el procedimiento UV de Boehringer Mannheim (kit n.º 10716260035) para determinar las concentraciones de sacarosa, fructosa y glucosa presentes en hojas de lechuga. La sacarosa está presente en concentraciones mucho más altas que la glucosa. Se encontró un aumento estadísticamente significativo, pero pequeño, en la cantidad de sacarosa en plantas de control en comparación con plantas tratadas con elementol R. La glucosa por otro lado era ligeramente más alta en las plantas tratadas que en las de control.

3.5 Brix

[0202] La savia de floema de planta contiene muchas sustancias que suministran energía a la planta. Uno de los términos usados con referencia a la calidad se llama índice Brix y este concepto se introdujo por un químico alemán del siglo XIX, A.F.W. Brix. El valor de Brix es una medida del contenido de sólidos solubles (CSS) porcentual en una solución. Aunque el Brix se expresa a menudo como el porcentaje de sacarosa, es importante darse cuenta de que "sacarosa" es aquí una suma de sacarosa, fructosa, vitaminas, aminoácidos, proteínas, hormonas y otros sólidos (www1.agric.gov.ab.ca). La forma de almacenamiento principal de carbohidratos en plantas, a saber almidón, es insoluble y por lo tanto no contribuye directamente al valor de Brix.

[0203] Cada grado de Brix es equivalente a 1 gramo de azúcar y otros CSS por 100 gramos de zumo. Generalmente, cuando mayor es el Brix mayor es el contenido de azúcar, especialmente niveles aumentados de sacarosa y glucosa (Baxter y col., 2005), y esto normalmente da como resultado un mejor sabor (Baxter y col., 2005; www1.agric.gov.ab.ca). Un Brix alto, CE alta y pH bajo están asociados generalmente a alta calidad de fruta (www.cals.ncsu.edu).

[0204] Cuando se cultiva un cultivo en condiciones favorables, tales como sistemas hidropónicos donde hay un suministro ilimitado de minerales y otros nutrientes requeridos, suficiente luz solar y temperatura, puede esperarse

un Brix mayor en las plantas que estos producen (www1.agric.gov.ab.ca). Bisogni y col. (1976) encontraban una correlación entre CSS y dulzor, aroma y calidad global. Winsor (1966) reseñaba que la mejor calidad del fruto era la de aquellos ricos tanto en azúcares como ácidos orgánicos. (www1.agric.gov.ab.ca).

5 **[0205]** Brix es igual al % de sólidos disueltos en la savia de floema. Una savia de Brix alto tiene una actividad acuosa reducida, con una correspondiente reducción del punto de congelación así como una tendencia proporcionalmente mayor a retener humedad.

10 **[0206]** Los productos con mayor Brix tienen también una vida de almacenamiento más larga y son más resistentes a la infestación de plagas y enfermedades. Aunque la temperatura, pH, etc. pueden influir en sí y lo rápido que los organismos crecen, la actividad acuosa puede ser el factor más importante. La actividad acuosa es por tanto un factor crítico en la determinación de la vida de almacenamiento, así como en el éxito de campo. Los niveles de Brix de savia superiores al 12 % aseguran generalmente también contra infestaciones de insectos chupadores de savia.

15 **[0207]** Lo más importante, un Brix alto proporciona proporcionalmente más contenido nutricional del alimento y asegura un buen aroma madurado naturalmente verdadero, especialmente cuando el refractómetro muestra una lectura difusa o dispersa, indicando una variedad de proteínas de planta disueltas complejas y componentes de aroma en buena medida.

20 **[0208]** El Brix se usa a menudo para determinar la calidad de algunos alimentos seleccionados. Las lecturas de Brix son lecturas de todas las sustancias disueltas presentes en la hoja de lechuga, y no solo del contenido de azúcar o sacarosa. El Brix se usa de hecho para determinar la calidad de lechuga.

25 **[0209]** Se calibró el refractómetro Brix a temperatura ambiente usando una solución de sacarosa al 10 % con una lectura de Brix de 1,3475. Se usó HClO₄ neutralizado como patrón. Se restó la lectura de la lectura de Brix, así como del % de azúcares. Después del calibrado, se colocó una muestra en el refractómetro y se tomaron lecturas de Brix en lecturas de Brix, así como % de azúcar.

30 **[0210]** Se usó otro procedimiento para determinar la lectura de Brix. Se molieron ± 0,1 gramos de masa fresca en 200 µl de agua (por tanto la muestra se diluyó 4x) y se colocaron 20 µl de muestra en el refractómetro y se tomaron lecturas de Brix.

35 **[0211]** A pesar del menor contenido de sacarosa, los valores de Brix indican una mejor calidad de lechuga obtenida por las plantas tratadas con elementol. Puesto que el Brix refleja los productos insolubles en la lechuga, las lechugas tratadas con elementol están enriquecidas en material de planta distinto de sacarosa. El % de potenciación en Brix por tratamiento con elementol obtenido con el procedimiento de HClO₄ era de 15 % y con el procedimiento de agua de 12 %. La diferencia del 3 % obtenida con estos dos procedimientos debería ser debida a la mayor presencia de ácidos orgánicos, hormonas o vitaminas de base oleosa, ya que estos son solubles en HClO₄.

40 EJEMPLO 17

EFFECTO BIOESTIMULANTE DE LA ADMINISTRACIÓN DE ELEMENTOL R SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTO EN UN ENTORNO CONTROLADO

45 1. Material, crecimiento de planta y tratamiento

[0212] Cultivar: Tomate *Lycopersicon esculentum* Mill de la familia: Solanaceae cv.

50 **[0213]** Plantones: Se adquirieron plantones de Floradade, de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad, de un vivero local en Bloemfontein. Se trasplantaron 12 de estos plantones al sistema hidropónico preparado en el invernadero. Este invernadero estaba situado en el tejado del edificio de Plant Science de la University of the Free State.

1.1. Procedimiento de cultivo:

55 **[0214]** Se configuraron dos sistemas hidropónicos de reflujo y flujo de reciclado idénticos. Cada sistema consistía en 2 bandejas de amianto rectangulares (90 cm x 20 cm) llenadas con el medio de soporte, que consistía en grava de sílice de tamaño medio desinfectada. Se trasplantaron 3 plantones por bandeja separados ± 30 cm y las filas separadas ± 42 cm. Este espaciado permite ± 0,135 cm² por planta, dando como resultado 9 plantas/1,22 m².

60 **[0215]** Para limitar el crecimiento de algas y bacterias, se usaron tuberías, conectores y depósitos de PVC negros no translúcidos para construir los sistemas de reciclado. Cada sistema tenía un depósito separado de 70 litros, con una bomba de agua pequeña dentro. Ambas bombas estaban conectadas con un único temporizador digital, que regulaba los intervalos de ciclos de riego. Se sincronizó el momento de riego para que las bandejas se llenaran a un nivel específico, después del cual el temporizador se apaga y el agua se drenaba al depósito. Se anegaron las plantas

65

6 veces al día durante 5 minutos, en el intervalo de 06:00 a 18:00.

1.2 Condiciones de invernadero

5 **[0216]** La temperatura en el invernadero se controló parcialmente por un acondicionador de aire. Las temperaturas nocturnas y diurnas medias estaban en el intervalo de 16 a 25 °C, respectivamente. Se usaron tres instrumentos, a saber, termómetro, termohigrógrafo e higrómetro giratorio, para determinar la temperatura. Se montó el termómetro en la pared oriental (orientada al norte). Se colocó el termohigrógrafo estratégicamente dentro del invernadero para proporcionar un registro de 24 h de las condiciones de invernadero de lunes a viernes. El termohigrógrafo proporciona una indicación tanto de temperatura como de humedad relativa. Se midió la intensidad de luz de tres localizaciones diferentes con un fotómetro de modelo LI-185A a una altura de 2 m desde el nivel del suelo. La intensidad de luz varía considerablemente con la latitud y el momento del año. Esto es el resultado de la inclinación de la tierra y la rotación alrededor del sol. La intensidad de luz a mediodía (LI) disminuía a medida que se acercaban los meses de invierno, seguido de un aumento de la semana 14^a después del trasplante (WAT) hasta la terminación en la WAT 25^a.

20 **[0217]** Se midieron temperatura, humedad relativa e intensidad de irradiación siguiendo el mismo procedimiento que las medidas semanales. Se tomaron lecturas cada dos horas de 8:00 a 16:00 durante un día durante mayo y julio. La humedad relativa (HR) es la relación entre el peso de humedad presente realmente en el aire y la capacidad de contención de humedad total de un volumen unitario de aire a una temperatura y presión especificadas (Smith y Bartok, 2006). La HR a medio día aumentaba inicialmente a 82 %, pero desde la 18^a semana después de trasplante se observó una caída a tan baja como 50 % (24^a WA). La HR es dependiente de la temperatura, viendo que el aire caliente tiene una capacidad de contención de humedad mayor que el aire más frío; por lo tanto, a medida que aumenta la temperatura del aire, disminuye la humedad relativa, aunque la cantidad de agua permanezca constante. Sin embargo, en este caso la temperatura permanece relativamente constante; por lo tanto, la caída de HR podría ser el resultado de un crecimiento vigoroso de las plantas, dando como resultado una transpiración densa y alta hasta el comienzo del periodo de recolección. El vigor de crecimiento y tasa de transpiración cesan naturalmente a medida que el periodo de recolección llega a su fin.

30 1.2. Solución nutriente

[0218] La solución nutriente aplicada, a saber Hygrotech Hygroponic, es una mezcla optimizada de nutrientes desarrollada específicamente para la producción de tomate hidropónico. Esta mezcla consistía inicialmente en mezcla Hygroponic y nitrato de calcio. Se añadió nitrato de potasio a partir del tercer racimo de flores hasta el final del ensayo. Se disolvió en agua del grifo la combinación de la concentración prescrita de cada componente.

40 **[0219]** Se llenaron los depósitos con 70 litros de solución nutriente y se repusieron según fuera necesario. Cada dos semanas, antes de rellenar, se aclararon los depósitos con agua del grifo limpia para eliminar cualquier sustancia dañina que pudiera haberse acumulado. Se midieron el pH y la CE de la solución nutriente en cada depósito antes y después de rellenar los depósitos, usando un medidor de pH PHM 85 Precision y un medidor de conductividad digital PW 9526, respectivamente.

2.1.3. Tratamientos

45 **[0220]** Durante la segunda WAT, se rastrillaron las plantas con cordel de nailon negro para fomentar las plantas. Durante la 2^a semana, se aplicó la primera de las 6 aplicaciones de tratamientos aplicables. Se resumen los tratamientos a continuación:

Tratamiento	Abreviatura	Composición del tratamiento
Control	C	sin aplicación
Elementol R	P	3 ml de elementol R/250 ml de H2O (2 x dist)

50 **[0221]** Se dispusieron específicamente las plantas en un esfuerzo por tener tanto plantas de sol como de sombra para cada tratamiento. La única diferencia entre las plantas era, por lo tanto, el tratamiento foliar particular.

2. Parámetros físicos: crecimiento, desarrollo y rendimiento de plantas

55 2.1 Altura de planta

[0222] Se determinó la altura de cada planta (desde el nivel de grava a la punta más alta) con una cinta métrica. Tan pronto como las plantas alcanzaron el techo, y el peso de la planta derribó las plantas, se acabó este procedimiento.

[0223] Las plantas de ambos tratamientos mostraban un aumento lineal de altura, con una altura media tanto para plantas tratadas como de control en el intervalo entre 130 y 160 cm en la semana 10 después del trasplante.

5 2.2 Desarrollo regenerativo

[0224] Se evaluó en primer lugar el impacto de elementol R sobre el rendimiento de plantas contando el número de yemas florales en las plantas. El desarrollo y crecimiento de plantas están directamente relacionados con la formación de yemas florales, flores y frutos. Se registraron las yemas florales tan pronto como aparece una yema floral claramente distinguible, y las flores cuando es evidente un color amarillo definitivo. Las primeras yemas florales aparecían tres semanas después del trasplante, alcanzando una media de aproximadamente 25 yemas para plantas de control (C) a las 7 semanas después del trasplante.

[0225] Aunque los tratamientos con elementol R (Er) no tenían un efecto estadísticamente significativo sobre la altura de planta, el tratamiento con elementol R daba como resultado un aumento estadísticamente significativo del número medio de yemas florales, especialmente entre la 5ª y 7ª semana después del trasplante (figura 21).

[0226] En comparación con las plantas de control, el tratamiento con elementol R estimulaba la formación de yemas significativamente desde la semana 6. Se calculó el % de potenciación según la fórmula descrita en el Ejemplo 16, con una potenciación del 92 % registrada, con una potenciación media de yemas florales de 44 % a partir de la semana 4, cuando pudieron contarse yemas florales claramente distinguibles, a la semana 7 (tabla 1 siguiente y figura 22).

WAT	Er	C	% de potenciación
4	16,5	13	26,92308
5	21	16,5	27,27273
6	30	23	30,43478
7	48	25	92
% de potenciación media semana 4-7			44,15765

[0227] Para prevenir el daño a plantas en desarrollo y la inviabilidad del recuento de yemas en configuración hidropónica densamente poblada, se decidió terminar este procedimiento 7 semanas después del trasplante.

2.3 Rendimiento

[0228] La contribución de elementol R al rendimiento no pudo determinarse en el Ejemplo 16, donde crecimiento de hoja y planta eran los parámetros relevantes. En el caso de plantas de tomate, sin embargo, una potenciación de las yemas florales debería reflejar una potenciación del rendimiento de plantas, si la nutrición dada a las plantas hidropónicas es suficiente. Por lo tanto, se contaron los frutos. El fruto necesitaba alcanzar 5 mm de diámetro antes de registrar su apariencia. Se registra el rendimiento acumulado medio de fruto durante el periodo de estudio en la tabla 2 (véase también la figura 23).

WOH	Control	E
1	0,0	0,0
2	1,5	6,0
3	13,5	12,0
4*	39,0	49,5
5*	49,5	63,0
6*	51,0	63,0
7*	64,5	96,0

8*	72,0	97,5
9*	81,0	114,0
10*	88,5	126,0
11	105,0	142,5
12	121,5	157,5
13	123,0	178,5

[0229] El aumento semanal de rendimiento tanto para plantas de control como tratadas es lineal desde la semana 3, con una fase de latencia desde el trasplante a la semana 3. Se usó la prueba t de Fisher (unifactorial), que devuelve la probabilidad asociada a la prueba t de Student y determina si es probable que dos muestras hayan procedido de las mismas dos poblaciones subyacentes, para analizar los datos de rendimiento. Se determinó el valor de probabilidad como 0,000261, lo que significa que la probabilidad de que la serie de rendimiento obtenida por el fruto tratado con elementol R y el fruto de control sea la misma es menor de 1 de 1000.

[0230] La potenciación de rendimiento media calculada durante el periodo de estudio, excluyendo la semana 1, usando de nuevo la fórmula descrita en el ejemplo 1, era de 53,7 %.

[0231] Se calculó el rendimiento acumulado medio por planta. Como se esperaba, el % de potenciación de rendimiento de fruto por planta era exactamente igual al obtenido para el rendimiento acumulado total (53,7 %).

[0232] El cálculo de las relaciones de fruto a yema para ambos grupos (tabla 3) muestra una disminución progresiva pero similar durante las primeras 7 semanas, después de lo cual se terminó el recuento de yemas. En la semana 7, solo crecen 26 o 26 frutos de cada 100 yemas (véase la figura 24). Esto es debido probablemente a nutrición insuficiente para ambos grupos en vista de los altos rendimientos obtenidos, a pesar del uso de una mezcla nutriente optimizada para tomates crecidos de forma hidropónica. Cuanto mayor es el rendimiento, mayor sería el impacto de una nutrición insuficiente. Por lo tanto, podría haberse obtenido una mayor potenciación del rendimiento de plantas tratadas con elementol R en comparación con plantas de control si la nutrición se hubiera ajustado al rendimiento aumentado.

2.4. Parámetros físicos del fruto

25

2.4.1. Contenido de humedad

[0233] Tanto el rendimiento de fruto total como el contenido de sólidos solubles desempeñan un papel importante en el éxito económico en el mercado de tomates procesados. Para la elección de tomates con fines de procesamiento, se presta atención específica a la calidad bioquímica. Los frutos con alto contenido de sólidos solubles, por ejemplo, contienen menos agua y son más dulces y en consecuencia requieren menos procesamiento y adición de azúcar para preparar pastas de textura apropiada (Baxter y col., 2005). Además, se van a usar una serie de parámetros organolépticos y nutricionales para definir la calidad del fruto. Estos parámetros de calidad incluyen azúcares, acidez titulable (AT), conductividad eléctrica (CE), contenido de vitamina C y compuestos fenólicos, contenido de sólidos solubles (CSS) y firmeza, por nombrar unos pocos (Anza, Riga y Garbisu, 2006).

[0234] El contenido medio de humedad daría por tanto una indicación de la calidad del tomate. Para determinar el contenido de humedad, se colocó una rodaja de cada fruto de tomate representativo en una placa Petri (de la cual se predeterminó el peso) y se pesó mediante una microbalanza Sauter RL 200. Se colocó entonces en una estufa Labotech a ± 68 °C durante 7 días. Después del periodo de deshidratación, se pesó de nuevo la placa Petri que contenía la rodaja de tomate. La pérdida de peso representa la cantidad de humedad presente en el tomate. De media, el fruto tratado con elementol R contiene ligeramente menos humedad que el grupo de control, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (véase la figura 25, que muestra el % medio de humedad encontrado en el fruto de plantas de tomate tratadas con elementol R frente a plantas de control como se describe en el Ejemplo 17). El fruto tratado con elementol R tenía generalmente un menor contenido de humedad respecto a la masa de tomate total, indicando un fruto con más productos insolubles, tales como azúcares y proteínas, dando como resultado tomates de mayor calidad.

[0235] El % medio de potenciación de la masa seca (DM) del fruto tratado con elementol es de -1,05 % durante el periodo de estudio, indicando que no existe diferencia entre las plantas tratadas y de control. Sin embargo, la masa seca comparativa tiene una amplia distribución. Se calculó la prueba t de probabilidad de que los dos intervalos se originaran en el mismo grupo (es decir, similitud) como 0,330525. Se observa un patrón inverso cuando se comparan las relaciones de masa de humedad: Dm. Esto puede indicar que el procedimiento usado para esta determinación no es preciso. Una causa posible es no tener en cuenta el contenido de ácido orgánico y aceite del fruto.

55

3. Parámetros bioquímicos del fruto

3.1. Conductividad eléctrica (CE) y pH

5 **[0236]** Cada dos semanas, se seleccionaron objetivamente 15 frutos representativos de cada tratamiento. Se molió una parte del fruto en un tubo de ensayo usando un homogeneizador Polytron. Se determinaron el pH y CE del tejido mediante un medidor de pH PHM 85 Precision y un medidor de conductividad digital PW 9526, respectivamente.

[0237] Un flujo mayor de corriente eléctrica implica una mayor concentración de iones disueltos en el fruto.
 10 Tanto el rendimiento de fruto total como el contenido de sólidos solubles desempeñan un papel importante en el éxito económico en el mercado de tomates procesados. Para la elección de tomates con fines de procesamiento, se presta atención específica a la calidad bioquímica. Los frutos con alto contenido de sólidos solubles, por ejemplo, contienen menos agua y son más dulces y en consecuencia requieren menos procesamiento y adición de azúcar para preparar pastas de textura apropiada (Baxter y col., 2005).

15 **[0238]** La CE del fruto mostraba un aumento progresivo. La CE media determinada para plantas de control durante el periodo de estudio era de 3,395, mientras que para las plantas tratadas con elementol R era de 3,393. Era evidente una relación inversa, aunque sea con una pendiente muy moderada, cuando se compara la conexión entre los valores de pH y CE del fruto.

20 **[0239]** Se determinó que el pH medio del fruto de control durante el periodo de estudio era de 4,245, mientras que se encontró un pH de 4,248 para el fruto de plantas tratadas con elementol R. Por lo tanto, a pesar del rendimiento potenciado en gran medida de las plantas tratadas, no había diferencias en la calidad del fruto en términos de humedad, masa seca, CE o pH. La estrecha correlación de los valores indica también la precisión de las medidas.

25 3.2. Carbohidratos

[0240] La calidad de fruto y rendimiento de los tomates se determinan en gran medida por uno de los componentes bioquímicos de la calidad de fruto, a saber la cantidad de contenido de azúcar soluble (Damon y col., 30 1988; Islam y col., 1996). Las concentraciones de glucosa y fructosa en el apoplasto están presentes en una relación de aproximadamente 1:1 (Damon y col., 1988), con las concentraciones de hexosa al menos 4 veces mayores que la sacarosa en todos los estadios de desarrollo. Guan y Janes (1991) encontraban que los niveles de sacarosa son relativamente bajos en fruto de tomate, son independientes de la intensidad de luz y continúan bajando durante el desarrollo. El contenido de sacarosa de fruto crecido con luz y en la oscuridad en sus estudios no mostró diferencias 35 significativas. La acumulación de carbohidratos puede impulsarse por lo tanto por el metabolismo de sacarosa.

[0241] Preparación de muestras para ensayar el contenido de carbohidratos de los tomates recolectados: Se prepararon muestras añadiendo 10 g de tejido de fruto representativo a 5 ml de agua bidestilada en un tubo de ensayo. Se homogeneizó la muestra durante ± 30 segundos con un homogeneizador Polytron. Se aclaró el material restante 40 en los lados del tubo de ensayo al tubo de ensayo con 2 ml adicionales de H₂O bidestilada. Se sacudió el tubo de ensayo durante 30 minutos, seguido de agitación con vortex vigorosa, y se vertió rápidamente en un vaso medidor pequeño. Mientras se agitaba el puré en un agitador electrónico, se ajustó el pH a ± 8,00 usando KOH 1 M y 5 M, después de lo cual se completó la solución (± 13-17 ml) a un volumen final de 20 ml. Se centrifugó una alícuota (± 1,5 ml en tubos de microcentrifuga) de la solución a 12.000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante con una 45 pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo limpio. Se almacenaron las muestras de ensayo a -20 °C hasta el análisis final.

[0242] Para determinar el contenido de glucosa del fruto, se usó el kit de sacarosa/D-glucosa/D-fructosa (10716260035) fabricado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm. Se adaptó el procedimiento prescrito a volúmenes de 1 ml. Se tuvieron en cuenta factores de dilución cuando se calculó el contenido de carbohidratos.

50 **[0243]** La Tabla 3 muestra el contenido comparativo de glucosa, fructosa y sacarosa para el fruto recolectado la semana 13 del estudio.

Tabla 3: Contenido comparativo de azúcar		
mg/Fm	Elementol R	Control
Glucosa	13,73	13,52
Fructosa	14,45	13,32
Sacarosa	30,11	28,04

[0244] Los tomates tratados con elementol R mostraban un aumento considerable del contenido de fructosa y 55 sacarosa, dando como resultado tomates más dulces, que son preferidos por el consumidor.

3.3 Brix

- [0245]** El valor de Brix es un indicativo del porcentaje de sólidos solubles totales (SST) en el zumo de fruta. Cada dos semanas, se determinó el valor de Brix del mismo puré de los 15 frutos representativos usados para pH y CE. El procedimiento de molienda de una parte del fruto en un tubo de ensayo usando un homogeneizador Polytron es por lo tanto exactamente el mismo que para la determinación del pH y CE del fruto. Se inclinó entonces ligeramente el recipiente de puré para recoger una muestra de zumo transparente con una pipeta Pasteur. Se determinó el valor de Brix mediante un refractómetro. Un Brix alto, CE alta y pH bajo están asociados generalmente a alta calidad (www.cals.ncsu.edu). A pesar del hecho de que no se observó una diferencia estadística entre los tomates de control y el fruto tratado con elementol con respecto a CE y bajo pH o contenido de humedad del fruto observado durante la 13ª semana de recolección, el fruto de plantas tratadas con elementol con un valor de Brix medio de 8 % superaba la planta de control, que tenía un valor de Brix medio de 7,4 %. Ambos grupos tenían un valor de Brix significativamente mayor que el valor medio publicado para tomate.
- 15 **[0246]** En conclusión, el tratamiento con elementol R potenciaba tanto el rendimiento de tomates como la calidad del fruto recolectado en términos de % de humedad, productos insolubles y azúcares.

EJEMPLO 18

20 POTENCIACIÓN DE LA CAPTACIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE UN BIOESTIMULANTE COMERCIAL MEDIANTE ELEMENTOL R

1. La finalidad de este estudio

- 25 **[0247]** Los dos ejemplos anteriores muestran que elementol R puede actuar por sí mismo como bioestimulante en términos de crecimiento y rendimiento de plantas. Este estudio investiga si el atrapamiento previo de un bioestimulante comercial, ComCat®, en elementol R puede potenciar la captación y translocación de este bioestimulante, dando como resultado un aumento del crecimiento y rendimiento de plantas más allá del observado con elementol R o el ligero efecto conocido de ComCat® sobre lechuga y tomates crecidos de forma hidropónica.

30

2. Configuración experimental:

- [0248]** La configuración experimental era similar a la descrita en los Ejemplos 16 y 17, excepto porque se administró el bioestimulante (solo y en combinación con elementol R). Se ejecutó el estudio de forma similar a las descripciones en los Ejemplos 16 y 17, y no se describirá de nuevo.

35

2.1 El bioestimulante comercial ComCat®

- [0249]** ComCat®, un agente de refuerzo de plantas ecológico, contiene uno de un grupo de fitohormonas, llamadas brasinoesteroides (Schnabl y col. 2001). Los brasinoesteroides son esteroides promotores del crecimiento encontrados en plantas superiores. Se cree que los brasinoesteroides actúan a bajas concentraciones afectando al crecimiento de plantas, potenciando el alargamiento de tallos y regulando la expresión génica en plantas. Se ha observado un desarrollo mejorado de plantones, raíces y brotes fuertes y un óptimo desarrollo de flores con el uso de ComCat®. Se ha reseñado que los brasinoesteroides, como fitohormonas puras, no solo aumentan los rendimientos de cultivo, sino también la calidad de cultivo (Prusakova y col., 1999). ComCat® contiene sustancias bioquímicamente activas de alta calidad que se han extraído de plantas silvestres sinecológicamente activas.

45

- [0250]** Debido a la interferencia de los cultivadores, la mayoría de plantas cultivadas han perdido el acceso a defenderse ellas mismas contra patógenos. ComCat® aumenta la resistencia de plantas a todos los tipos de estreses y patógenos. Los brasinoesteroides desempeñan una parte decisiva en la activación de la propia resistencia de la planta y mecanismos de tolerancia. ComCat® es el primero de su clase que ha tenido éxito en catalizar esta activación de la propia capacidad de la planta de defenderse de modo óptimo. La planta desarrolla resistencia inducida que aumenta la capacidad de la planta de resistir a patógenos.

50

- 55 **[0251]** Este bioestimulante es un polvo soluble en agua y, cuando se aplica a cultivos como pulverización foliar o tratamiento de semilla, aumenta el desarrollo de raíces, acelera la absorción de nutrientes, intensifica la asimilación de nutrientes, induce la formación de yemas florales, aumenta los rendimientos (Huster, 1999; Schnabl y col., 2001; Pretorius citado por Alam, 2004) e induce la resistencia natural de plantas contra patógenos y estrés biótico (Agra Forum citado por Alam, 2004; Huster, 1999; Schnabl y col., 2001). Khripach y col. (2000) reivindicaban también que esta fitohormona recién descubierta tiene la capacidad de regular la captación de iones en la célula de planta.

60

2.2 Programa de administración foliar

2.2.1 Lechuga

65

[0252] Se prepararon los tratamientos para los diferentes grupos de plantas como sigue:

Según las instrucciones de dosificación de ComCat®: ComCat®= 2 g/l

5 Por tanto: = 0,5 g/250 ml

i) ComCat® (CC)

0,5 g de CC + 250 ml de H₂O

10

ii) Elementol R (E)

3 ml de E + 250 ml de H₂O

15 iii) Combinación de ComCat® y Elementol (CC/E) de plena potencia

0,5 g de CC + 3 ml de E + 250 ml de H₂O

iv) Combinación de ComCat® y elementol de media potencia (1/2 CC/E)

20

0,25 g de CC + 3 ml de E + 250 ml de H₂O

iv) Combinación de ComCat® y elementol de cuarto de potencia (1/4 CC/E)

25 0,125 g de CC + 3 ml de E + 250 ml de H₂O

2.2.2. Tomates

[0253]

30

Nombre del tratamiento	Abreviatura	Composición del tratamiento
Elementol R	PE	3 ml de Elementol R/250 ml de H ₂ O (2xdist)
ComCat	CC	0,5 g de Comcat/250 ml de H ₂ O (2xdist)
ComCat y elementol	CC/E	0,5 g de Comcat + 3 ml de Elementol R/250 ml de H ₂ O (2xdist)
0,5 Comcat y elementol R	0,5 CC/E	0,25 g de Comcat + 3 ml de Elementol R/250 ml de H ₂ O (2xdist)

3. Resultados

3.1 Crecimiento y desarrollo y diámetro de cabeza

35

3.1.1. Lechuga

[0254] El atrapamiento previo de CC en E no influía en gran medida en el diámetro de cabeza de planta o altura de planta. Algunas de las plantas no aumentaban al 100 %, lo que significa que no duplicaban su tamaño. Algunas plantas que se trataron con CC y E actuaban individualmente como las mejores de las plantas tratadas, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas, excepto de la semana 11 en adelante, cuando las plantas tratadas con elementol R sobrepasaban a todos los demás tratamientos. Algunas de estas combinaciones pueden tener un efecto inhibitor sobre las plantas, mientras que E y CC tenían individualmente ambos un efecto estimulante.

40

[0255] Las plantas alcanzaron un diámetro de cabeza máximo durante las primeras 7 a 8 semanas, después de lo cual disminuye el diámetro de cabeza, probablemente debido a que las plantas se podaban constantemente para obtener material de hoja para hacer experimentos fisiológicos.

45

3.1.2 Tomates

50

[0256] La aplicación de ComCat® daba como resultado una tasa de crecimiento ligeramente reducida. Sin embargo, cuando se aplica ComCat® junto con elementol a cualquier concentración (CC/E y 0,5 CC/E), esta reducción del crecimiento vegetativo se mitiga de forma dependiente de la dosis, pero el crecimiento sigue siendo significativamente menor que el de elementol R solo.

55

3.2 Yemas florales medias de tomates

[0257] El elementol R solo, así como ComCat® (CC) y los tratamientos de combinación, mostraban un aumento marcado de yemas florales, especialmente entre la 5ª y 7ª semana después del trasplante. No se midió una diferencia clara entre estos tratamientos, aunque CC mostraba el menor aumento.

5

3.3 Rendimiento medio de tomate

[0258] No eran observables diferencias claras para el tamaño y masa de fruto entre todos los tratamientos. La aplicación de ComCat® (CC) no consiguió, como bioestimulante, potenciar tanto el tamaño como la masa de fruto en tomates crecidos de forma hidropónica. La aplicación de ComCom® con elementol R a plena potencia no tenía efecto sobre los cambios en el tamaño y masa de fruto, pero la aplicación de la combinación de CC/E daba como resultado mayor tamaño de fruto y diámetro de fruto individual y masa fresca (véase 3.2.2 a continuación). Esto sugiere que esta baja concentración de ComCat®/elementol ralentiza la disminución de la masa de fruto observada para todo el periodo de recolección, lo que implica un mejor rendimiento físico para el periodo de recolección. La tabla siguiente refleja el

15 rendimiento medio/planta:

N.º medio de frutos/planta			
Control	E	CC	CC/E
Media	Media	Media	Media
0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	2,0	0,5	1,7
4,5	4,0	2,0	5,0
13,0	16,5	6,5	15,3
16,5	21,0	12,5	27,0
17,0	21,0	12,5	28,7
21,5	32,0	23,5	39,3
24,0	32,5	24,5	43,7
27,0	38,0	29,0	55,0
29,5	42,0	30,0	59,7
35,0	47,5	33,0	64,7
40,5	52,5	35,0	73,3
41,0	59,5	37,0	78,0

[0259] El Elementol R estimulaba el rendimiento de tomates significativamente (Ejemplo 17). Sin embargo, cuando se mezcla ComCat® con Pheroids, tanto a potencia completa (CC/E) como media (0,5 CC/E), se estimulaba notablemente la producción de fruto (véase la figura 26, que es una gráfica que muestra el efecto de ComCat® (CC), elementol R (E) y combinaciones de los mismos sobre cambios en el número acumulado de frutos recolectados de 3 plantas por grupo durante un periodo de 13 semanas) y la masa consiguiente de fruto recolectada (véase la figura 27, que es una gráfica que muestra un aumento drástico de la masa acumulada de fruto total observado cuando se tratan las plantas con ComCat® que está atrapado en elementol R, en comparación con el aumento observado con elementol

25 R o ComCat® individualmente).

Rendimiento en términos de masa de fruto total (masa ac media/planta)				
WOH	Control	P	CC	CC/P
2	0	0	0	0
3	61,0	156,2	90,5	115,5
4	459,1	315,3	250,1	518,5
5	1083,4	1093,9	639,9	1424,9

6	1329,9	1331,4	974,8	2137,5
7	1361,0	1331,4	974,8	2221,6
8	1608,7	1888,7	1669,7	2844,7
9	1758,4	1928,6	1704,9	3092,5
10	1925,9	2152,9	1977,7	3808,5
11	2072,0	2261,9	2014,1	4109,5
12	2337,1	2498,0	2121,4	4385,5
13	2562,9	2682,0	2260,5	4818,5
Media	2589,1	2908,5	2358,2	5041,2

[0260] El % de potenciación en términos de rendimiento se calculó como 99 % y 81 % con CC/E y 0,5 CC/E, respectivamente, y la masa recolectada total como 199 % y 204 % con CC/E y 0,5 CC/E, respectivamente, en comparación con los obtenidos con CC. La potenciación de 33 % y 21 % para CC/E y 0,5 CC/E, respectivamente, es bastante menor en comparación con elementol, que por sí solo causaba un aumento del rendimiento y masa de fruto (figuras 26 y 27)- Se demostró que el elementol, como portador novedoso, era un translocador eficiente de moléculas de ComCat®. Se indicaría también que el elementol R potenciaba la captación de ComCat® para ejercer su efecto bioestimulante. Puede entrar en juego también un efecto sinérgico de estos dos productos.

10 3.2 % de humedad y relaciones de masa fresca y seca (Fm:Dm)

3.2.1 Lechuga

[0261] Todos los tratamientos tenían un efecto estimulante sobre las relaciones de Fm:Dm de plantas.

15

3.2.2 Tomates

[0262] CC solo mostraba una mayor masa media de fruto fresco que E solo. Sin embargo, el atrapamiento previo de CC en E aumentaba la masa fresca media de tomates aún más (véase la figura 28). No se observaban diferencias significativas entre CC/E y 0,5 CC/E, excepto para la semana 13, y como la desviación estándar de Fm es bastante grande, puede no ser significativo.

20

4. Parámetros fisiológicos relacionados en lechuga

25 4.1 Contenido de proteína: Medido una semana después de cada tratamiento

[0263] El contenido de proteína era máximo en la semana 2 y mostraba una disminución durante las 12 semanas del ensayo para todos los tratamientos. De las semanas 4 a 12, CC tenía de media la menor cantidad de proteínas. En la semana final, todas las plantas tenían relativamente la misma cantidad de proteínas. La combinación de CC/E tenía el mejor efecto estimulante sobre proteínas.

30

4.2 Tasa de respiración

[0264] Todos los tratamientos de plantas mostraban relativamente la misma tasa de respiración. En la semana 9, las plantas tratadas con CC/E tenían la mejor tasa de respiración. La tasa de respiración disminuye hasta la semana 9, excepto para la combinación de CC/E, y aumenta de nuevo las últimas

35

4 semanas. Todos los tratamientos de plantas muestran esta forma de "U", debido a los mayores requisitos de energía durante el crecimiento y floración tempranos. La combinación de CC/E es el único tratamiento que muestra un aumento de la tasa de respiración (figura 29). Por tanto, en la semana 9, el tratamiento de combinación de CC/E tenía un efecto estimulante sobre las plantas. Todos los tratamientos que implican E tenían una mayor tasa de respiración durante esta semana que CC solo.

40

[0265] Cuando la tasa de respiración se expresa en términos de cantidad de proteína, se observa una fluctuación. La respiración por cantidad de proteína para las plantas tratadas con CC/E muestra un aumento cada vez después de tratar las plantas (semana

45

5 y semana 9; véase la figura 29). Por tanto, la combinación de E y CC estimula la tasa de respiración por mg de proteína. Al final de la semana 13, las plantas de E tenían la máxima tasa de respiración por mg de proteína, probablemente debido a que las plantas tratadas con elementol R florecían antes que las plantas tratadas con CC o

50

combinaciones de CC y E, requiriendo una alta tasa de respiración para suministrar cantidades adecuadas de energía para florecer.

4.3 Tasa de fotosíntesis

5

[0266] De nuevo durante la semana 9, la tasa de fotosíntesis para CC/E era muy alta. En la semana 11, la tasa de fotosíntesis caía considerablemente, indicando que la estimulación causada por CC/E puede ser de corta duración. Al final de la semana 13, el grupo de combinación de 1/4 CC/P mostraba la máxima fotosíntesis, indicando que la combinación de 1/4 CC/P estimula la fotosíntesis más tiempo. Expresar la tasa de fotosíntesis en términos de cantidad de proteína presente da como resultado aproximadamente el mismo resultado que la respiración por mg de proteína, excepto porque las plantas tratadas con 1/4 CC/P muestran la máxima tasa de fotosíntesis al final de la semana 13, indicando que este tratamiento puede tener un efecto más duradero sobre la tasa de fotosíntesis por mg de proteína.

10

[0267] La fotosíntesis debe superar siempre la tasa de respiración. Cuanto mayor es la ganancia de fotosíntesis a respiración, mayor es la acumulación de carbono, dando como resultado la síntesis de más azúcares. Pueden respirarse más azúcares y por tanto la ganancia de energía es mejor. Esta energía actúa como "combustible" para rutas metabólicas. Relaciones mayores dan como resultado un mejor crecimiento. De nuevo la combinación de 1/4 CC/P muestra un aumento de la relación de fotosíntesis: respiración de la semana 5 a la semana 13. Esta combinación tiene la mejor relación al final de la semana 13.

15

20

4.4 Contenido de clorofila

[0268] A pesar de las fluctuaciones, puede verse un aumento global de la clorofila a. Al colocar la cantidad de clorofila a en correlación con la cantidad de proteína presente en la planta, se muestra lo siguiente El tratamiento con E tiene más clorofila a por mg de proteína para la semana 13, seguido en primer lugar de 1/4 CC/E, en segundo lugar 1/2 CC/E y en tercer lugar CC/E y entonces CC. Por tanto, la menor cantidad de CC en combinación con E estimula la clorofila A al máximo (véase la figura 30, que es una gráfica que ilustra las cantidades comparativas de clorofila B por mg de proteína como se determina en la semana 13 del ensayo) CC tenía un efecto inhibitorio sobre la cantidad de clorofila B y este efecto inhibitorio se potencia por el atrapamiento de CC en vesículas de elementol R. Sin embargo, la dilución de la concentración de CC conducía a un aumento de la clorofila B/mg de proteína. Por tanto, la dosificación de CC debería disminuirse cuando se atrapa en elementol R.

25

30

[0269] La clorofila B mostraba un patrón similar. En el caso de clorofila B, se observa un aumento global. En la figura 32, se muestra la cantidad de clorofila B por mg de proteína. Aquí, la combinación de 1/4 CC/E y la combinación de 1/2 CC/E muestran también la mejor concentración de clorofila B por mg de proteína. E tiene también una alta concentración de clorofila B por mg de proteína. Por tanto, las menores cantidades de CC usadas con E estimulaban tanto la síntesis de clorofila A como B. CC inhibía el contenido de clorofila B, pero la combinación de CC/E inhibía la cantidad de clorofila B drásticamente, ilustrando que el atrapamiento previo en E potenciaba la captación y translocación de CC. La dilución de CC al 75 % parecía haber anulado el efecto inhibitorio de CC. Para que tenga efecto este efecto inhibitorio, el atrapamiento de CC en E tenía que haber dado como resultado una captación y translocación dependiente de la dosis de CC por E, como puede observarse en la figura 30.

35

40

4.5 Contenido de azúcar

[0270] Se estimula tanto el contenido de glucosa como de sacarosa por el atrapamiento de CC en E. El contenido de azúcar en las plantas es similar para CC y E, pero la combinación de CC/E aumentaba el contenido de azúcar una media del 91 % y el de glucosa una media del 64 %. De nuevo, se encuentra un aumento tanto de la concentración de sacarosa como glucosa a medida que disminuye la potencia de ComCat®.

45

50 4.6 Brix

[0271] En la tabla siguiente, se presentan las medidas de Brix con HClO₄ como fondo. Los valores de Brix miden todas las sustancias disueltas presentes en la hoja de lechuga y no solo el contenido de azúcar o sacarosa. Brix se usa de hecho para determinar la calidad de lechuga. Una lectura de Brix alta indica muchas sustancias disueltas, así como muchos azúcares, lo que indica una buena calidad y una hoja sana. Esto puede haber contribuido a tasas de crecimiento bajas y plantas poco desarrolladas.

55

Lecturas de Brix medias para plantas tratadas con HClO₄ (véase también la figura 31).

60 **[0272]**

Tratamiento	Lectura de Brix (%)
E	4,4261 ± 0,2867

CC	4,7652 ± 0,3586
CC/E	6,6760 ± 0,5235

[0273] La potenciación de las lecturas de Brix por la combinación es indicativa de la mayor captación y translocación de CC por el portador elementol.

5 EJEMPLO 19:

EFFECTO IN VITRO E IN VIVO DE ELEMENTOL R SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTONES:

1. Finalidades del estudio

10

[0274] Investigar el efecto de elementol R sobre la germinación y crecimiento de plantón en plantas tanto C3 como C4. En el proceso de fotosíntesis, CO₂ y agua son sustratos y carbohidratos y oxígeno son productos (Jakob y Heber, 1996). Las plantas se clasifican como C3, C4 o CAM según su mecanismo de fotosíntesis. La ruta de C₃ implica el ciclo de Calvin, mientras que la ruta de C₄ usa un ciclo donde el ácido 3-fosfoglicérico no es el primer producto. La fotosíntesis de C₄ proporciona un mecanismo para altas tasas de asimilación de carbono y es más resistente al proceso de fotorrespiración.

15

[0275] Se investigó el efecto inherente de elementol R por sí mismo y mezclado con un antifúngico (véanse los ensayos de campo de maíz siguientes).

20

2. Efecto in vitro de elementol R sobre el crecimiento de plantones

[0276] Se controlaron las condiciones en términos de humedad y temperatura como se describe en los Ejemplos 16 a 18. Se trataron tres grupos de semilla de rábano como sigue:

25

Grupo	Control	Elementol 125	Elementol 250
Dosificación	20 l de agua/ha	125 ml/20 l/ha	250 ml/20 l/ha
Abreviatura	C	E125	E250

[0277] Se empaparon las semillas en los tratamientos anteriores durante una noche y se expusieron entonces a papel de germinación. Se midió el efecto de los diferentes tratamientos con respecto a su influencia sobre la longitud de raíz de rábano (véase la figura 32, que es una fotografía de rábanos en germinación sobre papel de germinación en el estudio in vitro descrito en el Ejemplo 19. La longitud de raíz aumentada en ambos lados de los plantones de control cortos es debida tanto a la germinación como al crecimiento más rápidos). Se observó una potenciación de la longitud de raíz por encima del control de 53,3 y 52,6 % para Ep125 y 250, respectivamente.

30

3. Efecto in vivo de elementol R sobre el crecimiento de plantón en ensayos de invernadero

35

[0278] Se realizó el siguiente estudio en trigo en ensayos de invernadero:

Cultivar: Trigo Kariega

40 Las condiciones de crecimiento en términos de temperatura y humedad relativa eran relativamente constantes. Se plantaron las plantas en tierra y se irrigaron por irrigación por goteo.

[0279] Los tratamientos consistían en dos grupos: un grupo de referencia (GR) que recibe fertilizante y un grupo de prueba (E) que recibe elementol R. Se plantaron semillas del grupo de referencia con fertilizante (3:1:0) según las instrucciones del suministrador. Se trataron las plantas con elementol R en el estadio de tres hojas con concentraciones similares a las descritas para el ensayo in vitro anterior, pero con 20 ml de E/100 l/ha tanto en la hoja bandera como justo antes de la floración. Se administró el tratamiento mediante aplicación foliar. El formato de ensayo consistía en un diseño de bloque aleatorizado y se ejecutó durante 3 meses y medio.

45

50 **[0280]** Se investigaron semanalmente los siguientes parámetros:

Cualquier signo de fitotoxicidad,

Diferencias en el tamaño y altura de plantones,

55

Crecimiento medio del coleóptilo de trigo (mm),

Control	Ep 125	Ep 250	Ep 500
22	24	27	28

[0281] La tabla anterior ilustra la respuesta temprana en plántones pequeños, pero es representativa de la respuesta general. La respuesta de crecimiento variaba proporcionalmente con la cantidad de dosis de elementol. La administración de elementol R daba como resultado una respuesta a la dosis lineal en términos de crecimiento de coleóptilo de trigo (véase la figura 33, que es una gráfica que ilustra la longitud comparativa media medida para coleóptilos de trigo para control de fertilizante, y las diversas dosificaciones de elementol R). La desviación estándar de la respuesta a la dosis lineal es excepcionalmente pequeña, indicando un alto nivel de confianza en los datos. Tal respuesta a la dosis lineal puede usarse para indicar que una intervención específica en un sistema biológico da como resultado una respuesta específica. Por tanto, la respuesta en el crecimiento de coleóptilo es específicamente debida a la administración de una dosis específica de elementol R. La figura 33 muestra que no se ha alcanzado la dosis máxima y que puede ser posible una potenciación adicional del crecimiento con una dosis mayor. Se calculó que la potenciación del crecimiento, usando una dosis de 500 ml/ha de elementol R era de 27,3 %. No se observaron signos de toxicidad (quemadura de hoja, necrosis, etc.).

15 4. Ensayos de campo

4.1 Efecto in vivo de elementol R en ensayos de campo de trigo

[0282] El cultivar era PAN 3377. Se cultivó trigo según las prácticas agrícolas normales en el Estado Libre Central, Sudáfrica.

[0283] Como en los ensayos de invernadero, los dos grupos consistían en un control de fertilizante (3:2:1) y elementol R a una dosificación de 50 ml/100 l de agua/ha). El tratamiento se limitó a una única aplicación en el estadio de tres hojas. El formato de ensayo era un diseño de bloque aleatorizado. El ensayo duró 7 meses.

25

[0284] Se determinó el rendimiento y se presenta en la figura 34. Se observó un aumento medio de 108 kg de rendimiento por hectárea con el grupo tratado con elementol R en comparación con el grupo de fertilizante de referencia. No se observó fitotoxicidad.

30 4.2 Efecto in vivo de elemental R en ensayos de campo de guisante

[0285] Se cultivaron guisantes según las prácticas agrícolas normales en la granja Koedoesfontein en el Estado Libre del Norte, Sudáfrica, con la siguiente excepción: Se empaparon cada uno de 100 guisantes secos durante una noche en 500 ml de agua de pozo (grupo de control) o elementol R al 5 %. El diluyente era agua de la misma fuente. Aunque los guisantes del grupo de control absorbieron todo el agua durante el empapado, los guisantes del grupo de elementol absorbieron solo 300 ml del elementol R al 5 %. Se plantaron los guisantes en dos bloques separados para prevenir cualquier posible contaminación entre los dos grupos. Se irrigan las plantas por aspersión diaria.

[0286] Se observó la germinación y crecimiento de plánton a partir del día 7. El día 10, se hizo una comparación del número de plántones que medían al menos 300 mm de altura en cada bloque. En el bloque donde las semillas se empaparon en elementol R, se contaron 57 plántones el día 10, mientras que estaban presentes 18 plántones en el grupo de control. Esto representa una potenciación de la germinación y crecimiento de plánton de 3,1 veces. Además, la germinación del grupo de elementol R necesitaba solo 0,6 veces el agua del grupo de control. Este aspecto puede probar ser muy valioso en regiones secas.

45

4.3 Efecto in vivo de elementol R en ensayos de campo de maíz seco

[0287] Se usó un cultivar modificado genéticamente, suministrado por una gran compañía productora de semillas. Se abrió una bolsa de semilla tratada y se trató una porción de las semillas en la bolsa con captán, mientras que se trató otra porción con captán mezclado con elementol R de la siguiente manera. El captán es un fungicida de contacto de amplio espectro que se ha usado en semilla de maíz desde los años 1950. Está habitualmente teñido de rosa y deja un polvo rosa en la bolsa de semillas y la jardinera. Es muy efectivo contra un amplio intervalo de hongos de suelo. Se mezcló la cantidad prescrita de captán directamente con las semillas (grupo de referencia de captán). Para el grupo de prueba, se mezclaron las semillas con una cantidad similar de captán en elementol R al 2 %. Se mezclaron brevemente las semillas de ambos grupos o se agitaron con su tratamiento individual y se dejaron entonces secar. Se plantaron semillas en bloques de 3 o 5 filas que se extienden la longitud del campo de maíz, con bloques no tratados en ambos lados de cada uno de los grupos de tratamiento en la provincia Noroeste, Sudáfrica. Se realizó el cultivo según las prácticas agrícolas generales sin irrigación.

[0288] Se recogieron plantas de cada uno del grupo no tratado, grupo de captán de referencia y grupo de elementol R/captán arrancando 1 de cada 5 plantas de una fila. La recogida de plantas se inició 5 m dentro del campo y continuó hacia el centro del campo hasta recoger 50 plantas de cada grupo.

[0289] Se determinaron la masa de planta total, la masa de raíces y la masa de hojas de cada planta. La figura 35 muestra las masas comparativas medias para cada uno de los grupos. Las semillas no tratadas actuaban como control. El tratamiento de las semillas con captán solo, no daba como resultado ningún cambio del crecimiento de las hojas de planta, y solo una masa de raíces ligeramente potenciada, mientras que las semillas tratadas con la mezcla de elementol R al 2 %/captán mostraban aumentos de masa de hojas, masa de raíces y por lo tanto masa de planta total.

EJEMPLO 20

10 TRANSLOCACIÓN DE VESÍCULAS DE ELEMENTOL PREPARADAS CON CO₂ EN LUGAR DE N₂O.

[0290] Se preparó elementol C como se describe en la preparación 1 para elementol B, pero se usó CO₂ como gas durante el procedimiento de preparación. Se determinó el tamaño de las vesículas en el intervalo entre 300 nm y 2 µm. Se midió el potencial Z como -44 mV, usando un calibrador de Z Malvern.

15

[0291] Las vesículas dispersadas en elementol C que contienen CO₂ se marcaron fluorescentemente con rojo Nilo a una concentración final de 1 µM. Usando un cepillo, se pintó una hoja de una planta de hiedra con esta mezcla. Se pintó un control de agua sobre la hoja de una segunda planta de hiedra. Después de 30 minutos, se recogieron las hojas del lado opuesto de las hojas pintadas y se investigó la presencia de fluorescencia usando microscopía de barrido láser confocal como se describe en el Ejemplo 6, estudio 1. Estaban presentes vesículas fluorescentes en la hoja recogida de la planta pintada con elementol C marcado fluorescentemente, mientras que no se encontraba tal fluorescencia en la hoja recogida de la planta pintada con agua. La fluorescencia no correspondía a la autofluorescencia observada para cloroplastos o membranas tilacoides. Se mostró por tanto que la fluorescencia observada en la hoja de prueba era el resultado de la translocación de una hoja a la hoja opuesta por elementol C que contiene CO₂.

20
25

[0292] La modelización molecular indica que las propiedades relevantes de óxido nitroso y dióxido de carbono en la preparación de vesículas y microesponjas de elementol están compartidas por el oxisulfuro de carbono.

REIVINDICACIONES

1. El uso, como formulación de fomento de plantas que es fitológicamente beneficiosa, de una formulación que comprende una microemulsión constituida por una dispersión de vesículas o microesponjas de un componente
5 basado en ácido graso en un portador acuoso, comprendiendo el componente basado en ácido graso al menos una sustancia basada en ácido graso de cadena larga seleccionada del grupo consistente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3], ácido docosahexaenoico [C22:6 ω 3] y ácido ricinoleico, y derivados de los mismos seleccionados del grupo consistente en ésteres de alquilo C₁ a C₆ de los mismos, ésteres de glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de reacción
10 de aceites naturales hidrogenados y no hidrogenados compuestos en gran medida por aceites basados en ácido ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno, en la que dicha formulación incorpora un gas seleccionado de óxido nitroso y dióxido de carbono disuelto en la mezcla de ácidos grasos; en la que dicha formulación incluye dl-alfa-tocoferol o su isómero fisiológicamente activo y en la que dicha formulación incluye además una sustancia fitológicamente beneficiosa adicional seleccionada del grupo de sustancias conocidas por ser útiles como nutrientes
15 de plantas; un plaguicida de plantas, incluyendo un herbicida, fungicida, bactericida, insecticida, agente antiviral de planta; un regulador del crecimiento de plantas seleccionado de los productos del grupo consistente en 2-(1-2-metilnaftil)acetamida; ácido 2-(1-2-metilnaftil)acético; 2-(1-naftil)acetamida; ácido 2-(1-naftil)acético; 2,4-D (sal de sodio); 3,5,6-TPA; ácido 4-indol-3-ilbutírico; 6-benciladenina; polímero de alquilamina grasa alcoxilada; polímero de alquilamina; clorhidrato de aminoetoxivinilglicina; nitratos amoniacados; auxinas; arseniato de calcio; carbarilo; cloruro
20 de clormecuat; clorprofamo; clortal-dimetilo; cloprop; cianamida; daminozida; decan-1-ol; diclorprop; (éster 2-butoxietílico) de diclorprop; dimetipina; dinocap; dibromuro de dicuat; diurón; etefón; fluazifop-p-butilo; giberelinas; glifosato-isopropilamina; glifosato-trimesio; haloxifop-P-metilo; ácido indolilacético; hidrazida maleica; cloruro de mepicuat; metilciclopropeno; aceite mineral; n-decanol; octan-1-ol; paclobutrazol; dicloruro de paracuat; pendimetalina; prohexadiona-calcio; ácido salicílico, clorato de sodio; tidiazurón; trinexapac-etilo y uniconazol; un inmunomodulador
25 de plantas y un bioestimulante seleccionado del grupo de productos conocidos como fitohormonas.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la dispersión **se caracteriza porque** al menos un 95 % de las vesículas o microesponjas son de un tamaño diametral de entre 50 nm y 5 micrómetros.
- 30 3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la microemulsión tiene un potencial zeta de entre -35 mV y -60 mV.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que el componente de ácido graso de la microemulsión consiste en el producto conocido como éster etílico de vitamina F.
- 35 5. Uso según la reivindicación 1, en el que el componente de ácido graso de la microemulsión incluye o consiste en ácidos grasos de cadena larga conocidos como ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3] y ácido docosahexaenoico [C22:6 ω 3].
- 40 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para estimular al menos uno de los estadios de crecimiento de una planta, mejorar la producción o rendimiento de cultivo por la planta o mejorar la apariencia de la planta o potenciar la resistencia a enfermedades en la planta.

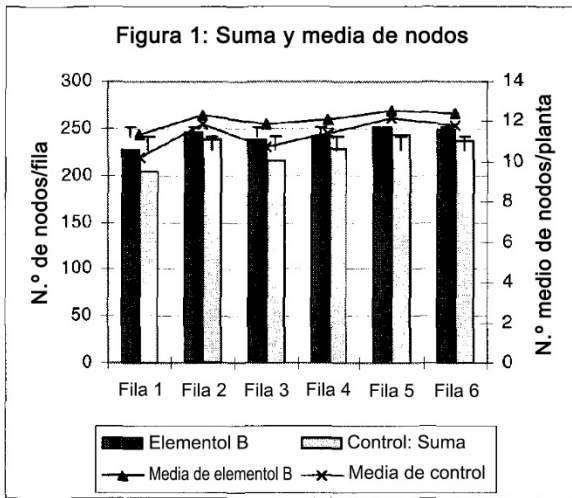


FIGURA 1

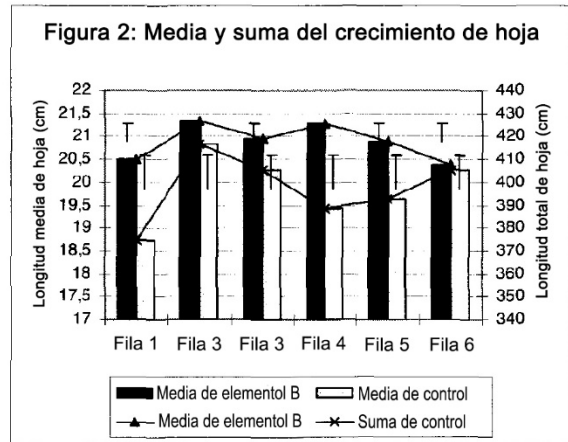


FIGURA 2

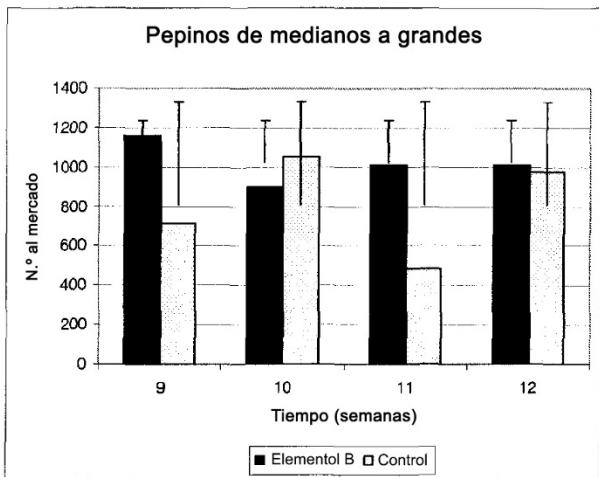


FIGURA 3

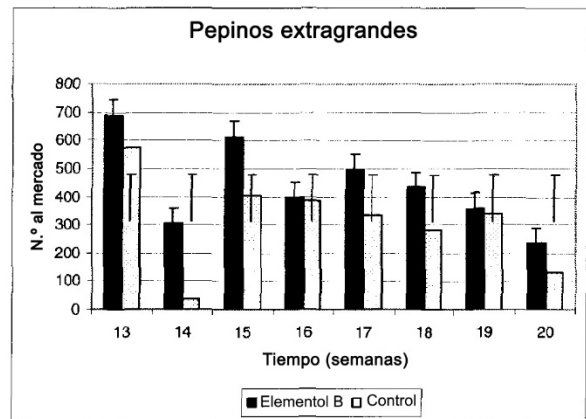


FIGURA 4

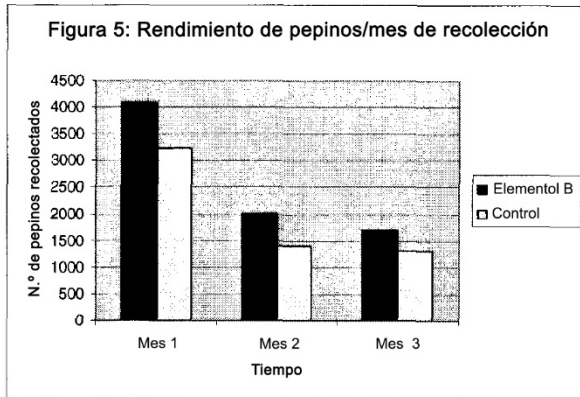


FIGURA 5

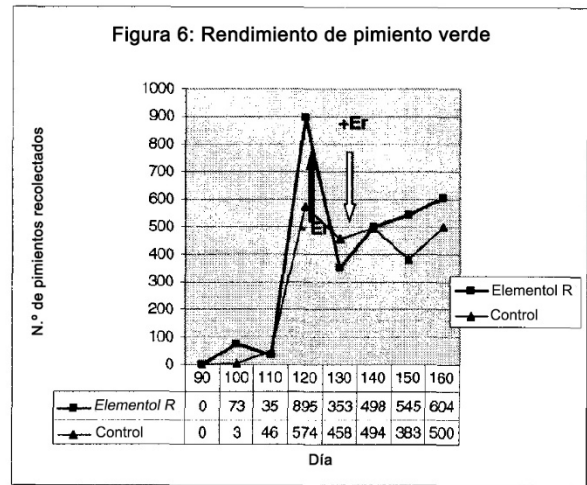


FIGURA 6

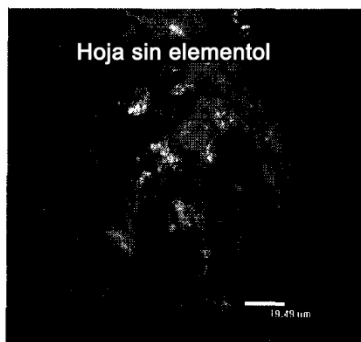


FIGURA 7

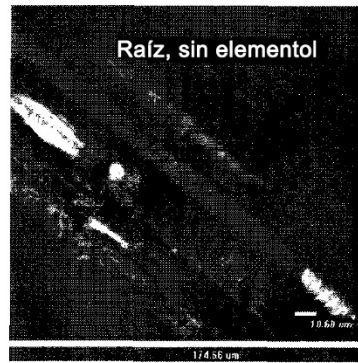


FIGURA 8

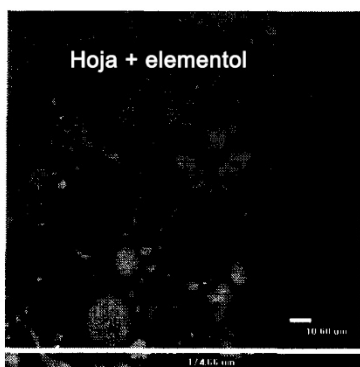


FIGURA 9

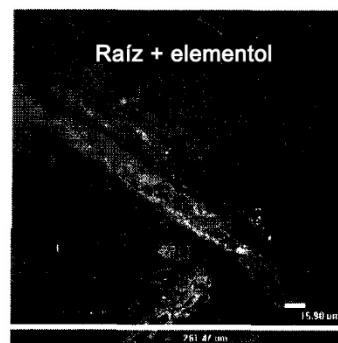


FIGURA 10

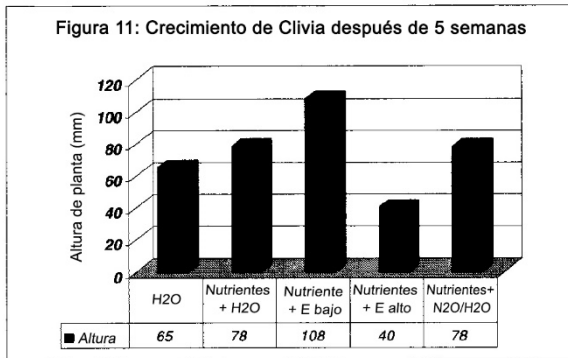


FIGURA 11

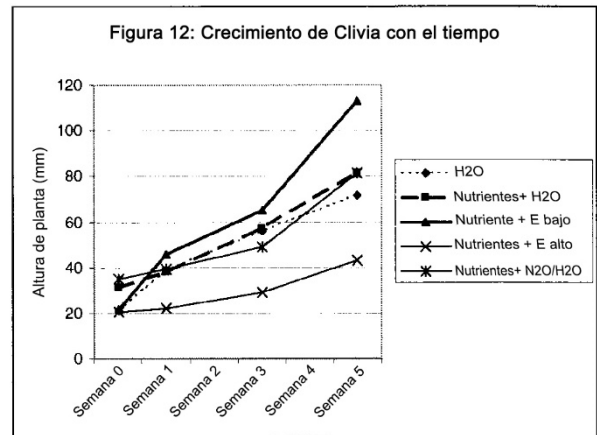


FIGURA 12

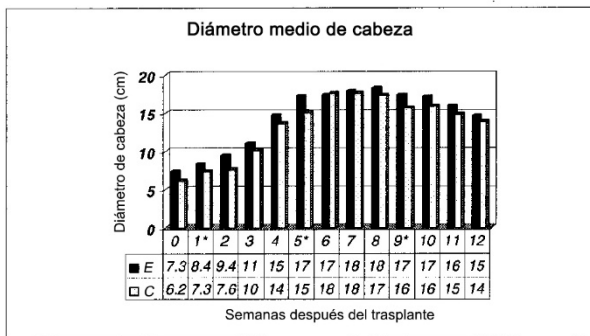


FIGURA 13

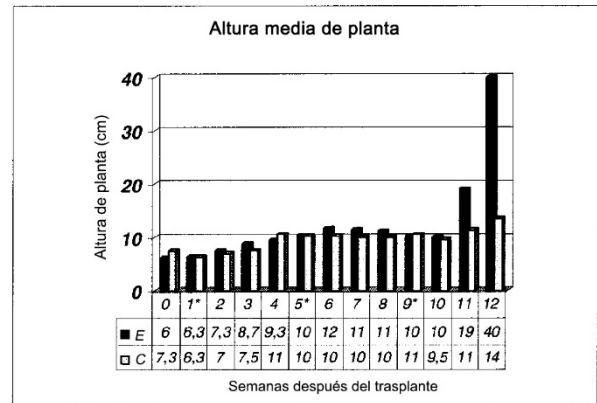


FIGURA 14

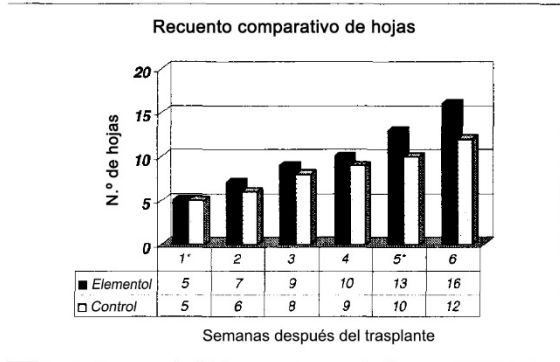


FIGURA 15

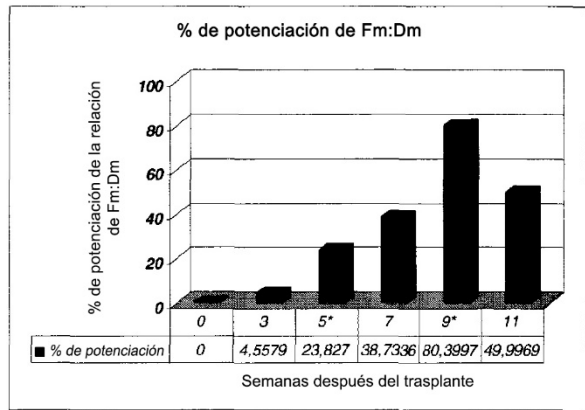


FIGURA 16

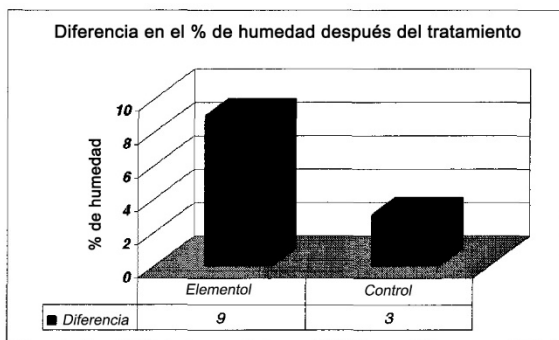


FIGURA 17

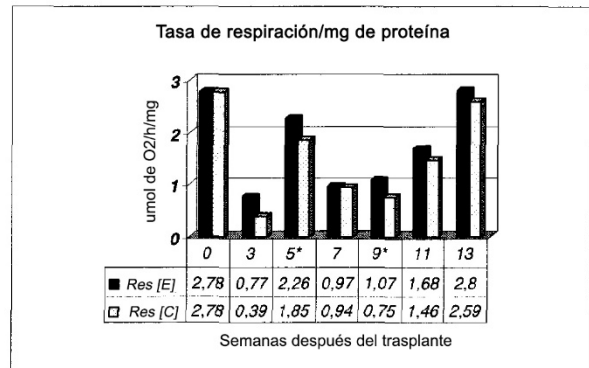


FIGURA 18

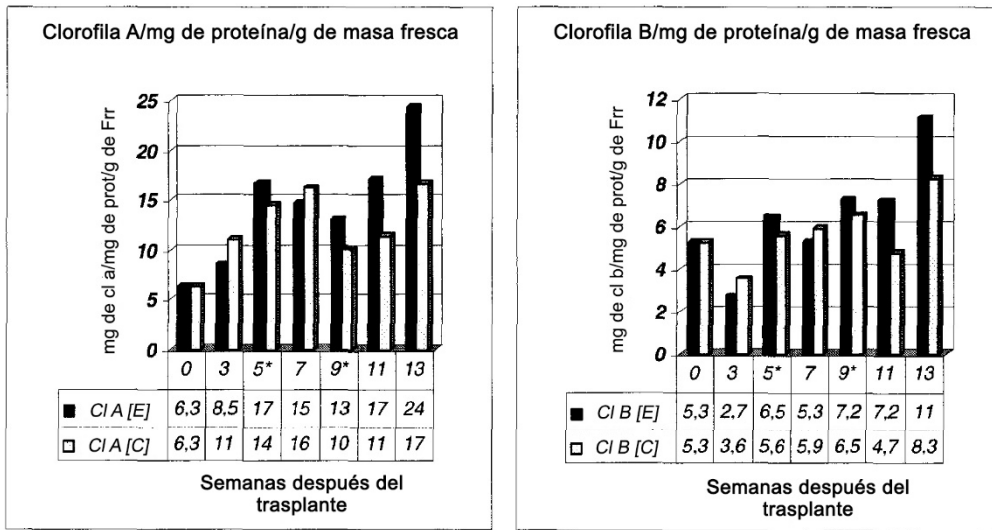


FIGURA 19

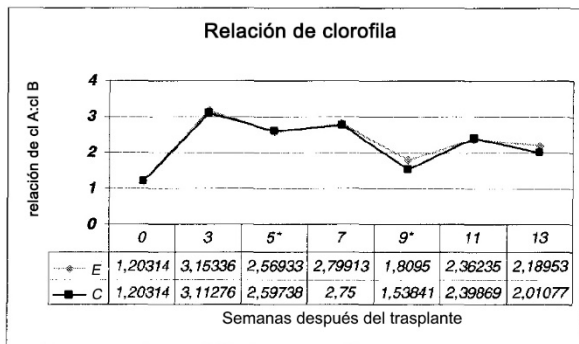


FIGURA 20

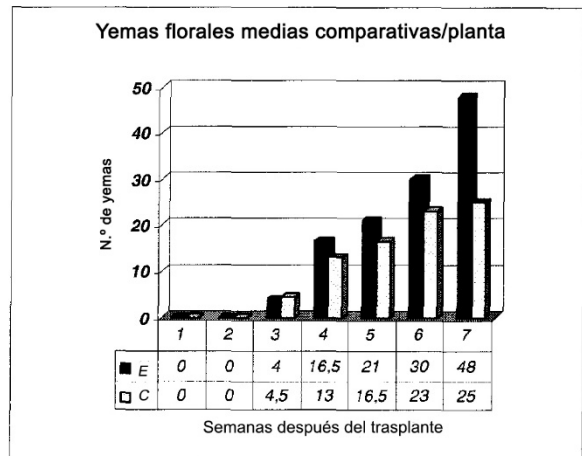


FIGURA 21

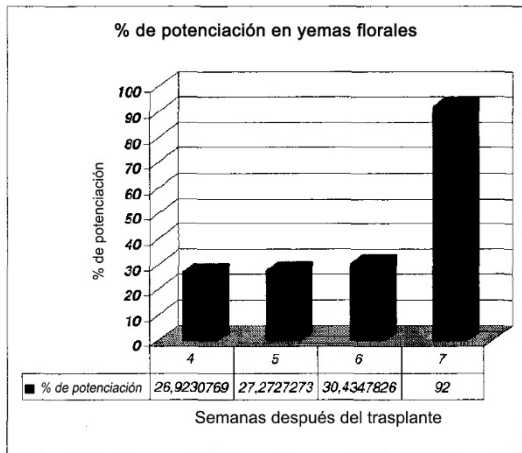


FIGURA 22

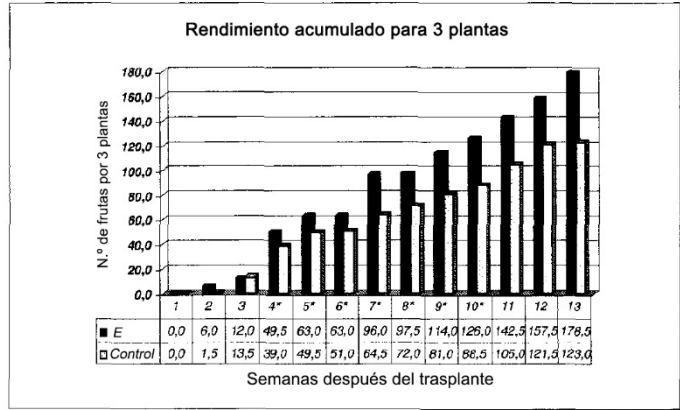


FIGURA 23

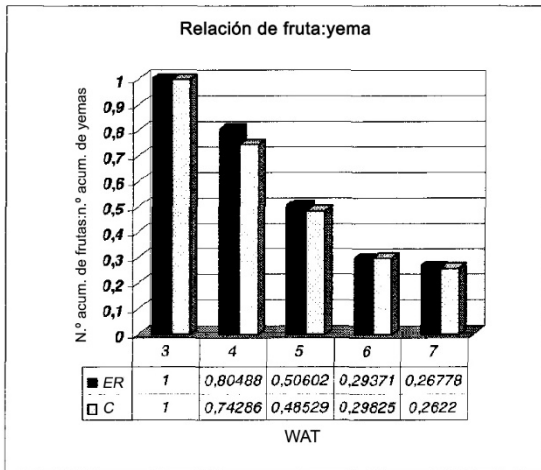


FIGURA 24

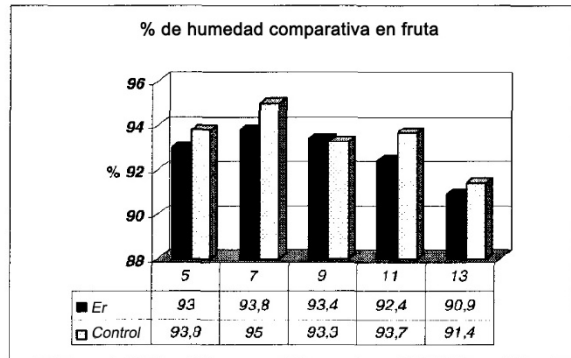


FIGURA 25

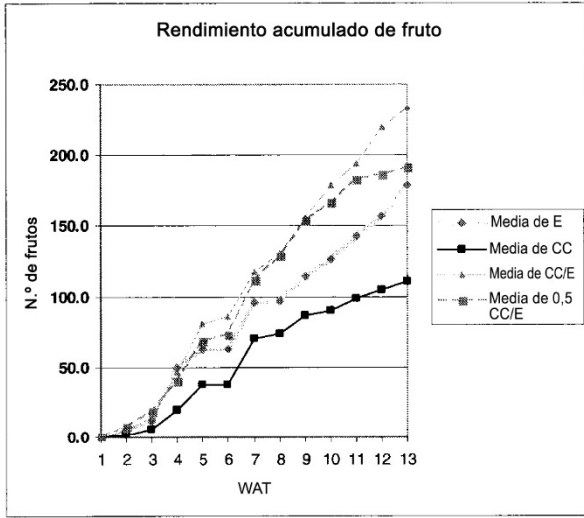


FIGURA 26

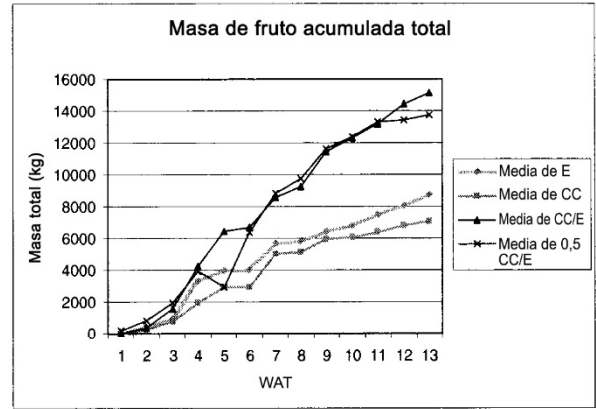


FIGURA 27

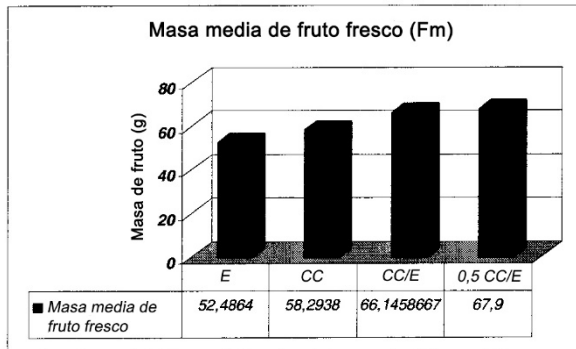


FIGURA 28

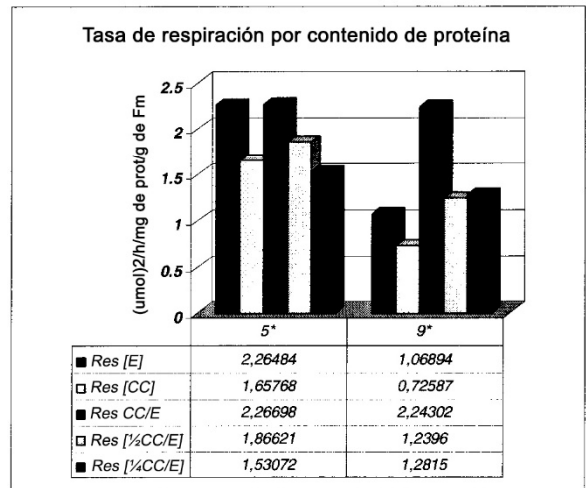


FIGURA 29

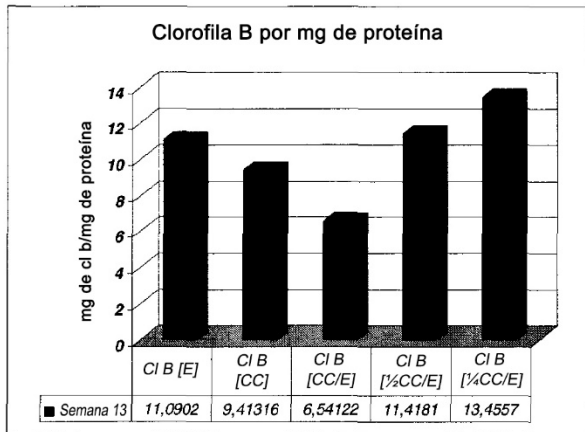


FIGURA 30

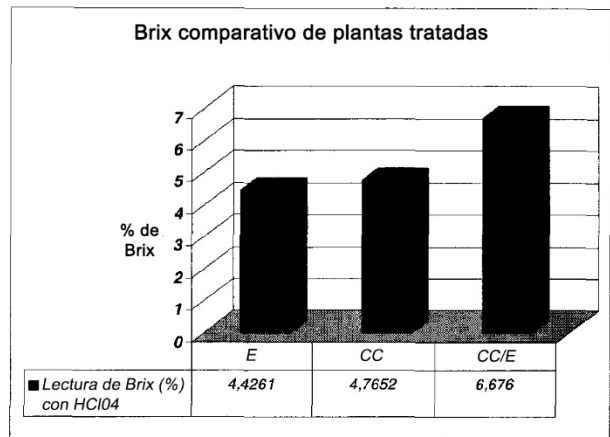


FIGURA 31

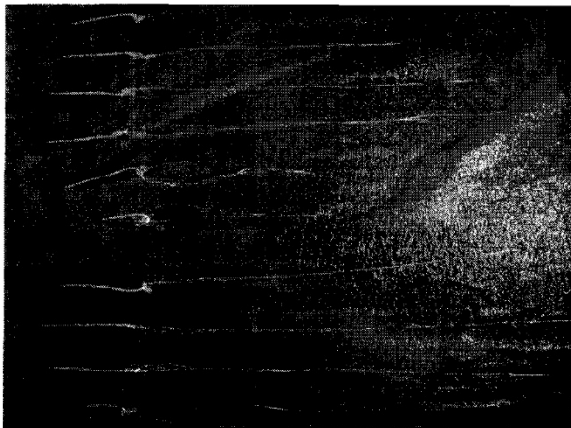


FIGURA 32

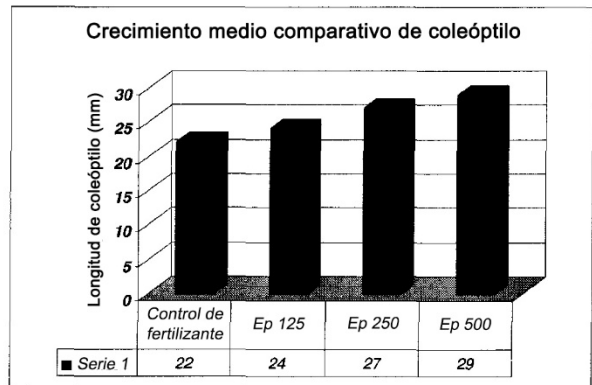


FIGURA 33

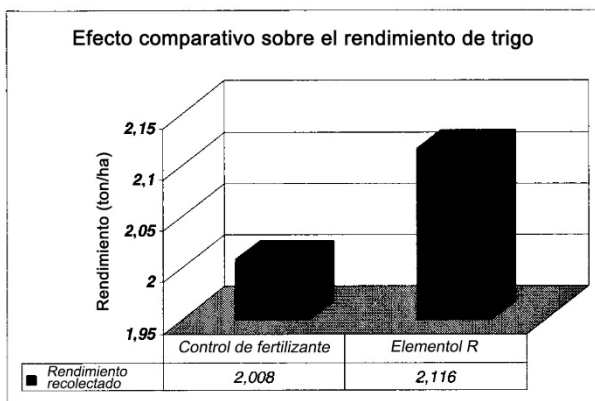


FIGURA 34

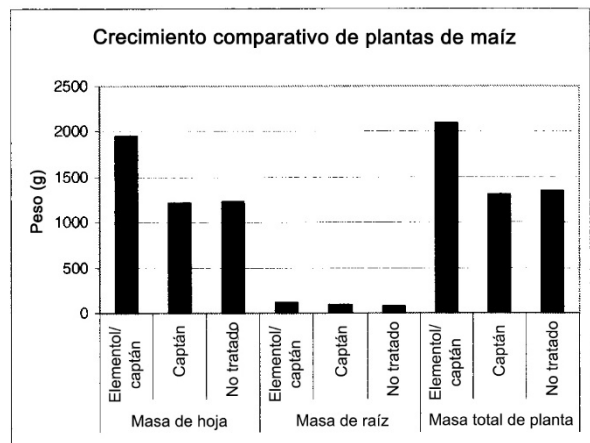


FIGURA 35