

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 454**

21 Número de solicitud: 201830674

51 Int. Cl.:

A01H 1/06 (2006.01)

A01G 7/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.01.2020

71 Solicitantes:

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

C/ Serrano, 117

28006 Madrid ES y

SAKATA SEED IBERICA, S.L.U. (50.0%)

72 Inventor/es:

CARVAJAL ALCARAZ, Micaela;

MORENO FERNANDEZ, Diego A.;

RIOS RUIZ, Juan Jose;

BERNABEU DURÁ, Javier y

AGUDELO SANCHEZ, Agatha

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPOSICIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE
GLUCOSINOLATOS EN PLANTAS ADULTAS DEL GÉNERO BRASSICA**

57 Resumen:

Composición y procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género Brassica.

La presente invención se refiere a una composición que comprende metil jasmonato y un polieter polisiloxano para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género Brassica, por ejemplo, el brócoli. Mediante aplicaciones foliares de dicha composición en plantas adultas que presentan una cutícula desarrollada, se consigue un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos (principalmente glucorrafanina y neoglucobrasicina), en el florete de las plantas, sin que se produzca una degradación de sus características organolépticas.

ES 2 737 454 A1

DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica*

5

La presente invención se refiere a una composición y a un procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica*, preferiblemente aquellas que se utilizan en alimentación humana, como por ejemplo el brócoli, mediante aplicación foliar una vez alcanzada la fase vegetativa reproductiva de la planta, sin que se produzca ninguna degradación de las características organolépticas de las partes de la planta destinadas a alimentación humana.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

El brócoli, planta del orden *Brassicales*, es una fuente rica de compuestos bioactivos entre los que destacan los glucosinolatos, compuestos del metabolismo secundario con nitrógeno y azufre en su molécula, que están recibiendo una gran atención científica por sus implicaciones en la fisiología de los vegetales (defensa vegetal) y en la calidad y bioactividad de los alimentos (calidad organoléptica y funcionalidad). Estos compuestos se encuentran casi exclusivamente en las crucíferas (Orden *Capparales*) y se hidrolizan cuando entran en contacto con la enzima mirosinasa (glucosidasa vegetal) así como por la acción de glucosidasas de la microbiota intestinal, dando lugar a los isotiocianatos, compuestos bioactivos, que están implicados en los mecanismos detoxificadores de las células a través de diferentes mecanismos de estimulación e inhibición de ciertas enzimas. Dos de los glucosinolatos que se pueden encontrar en variedades de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) son la glucorrafanina y la neoglucobrasicina. Los derivados hidrolizados de estos glucosinolatos dan lugar al isotiocianato sulforrafano (proveniente de la glucorrafanina) y el indol-3-carbinol (proveniente de la glucobrasicina y sus compuestos relacionados).

20

25

30

35

Ambos han atraído la atención de muy diversos grupos de investigación a nivel mundial por estar implicados en las propiedades antitumorales antioxidantes, y protectoras frente radicales libres derivadas del consumo de brócoli (Moreno, D.A. et al. (2008) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1472-1481). Por lo tanto, o bien en fresco o como ingredientes derivados, el brócoli ofrece la posibilidad de desarrollar alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos que ayuden a reducir la

incidencia de enfermedades, con la consiguiente importancia en la industria agroalimentaria (Dominguez-Perles, R. et al. (2012) *Acta Horticulturae*, 939, 159-163). De hecho, se la reconoce como “la hortaliza con mayor valor nutritivo” en relación con el peso de la parte comestible.

5

Los mencionados glucosinolatos, también llamados “tioglucósidos”, son metabolitos secundarios aniónicos nitrógeno-sulfurados que se encuentran exclusivamente en la familia *Brassicaceae* (Verkerk, R. et al. (2010) *Acta Horticulturae* vol. 856, pp. 63-69). El esqueleto básico de los glucosinolatos (β -D-tioglucósido-N-hidroxisulfato) consiste en un grupo β -D-tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral derivada de los aminoácidos metionina, fenilalanina, o triptófano (Figura 1). La estructura química de los glucosinolatos puede variar entre especies y entre variedades dentro de la misma especie (Dominguez-Perles, R. et al. (2010) *Journal of Food Chemistry* 75, 383-392). De acuerdo con la cadena lateral, los glucosinolatos pueden clasificarse ampliamente en: alifáticos, aromáticos, benzoicos, glicosilados múltiples, con azufre en su cadena lateral y heterocíclicos o indólicos (Halkier, B. A. et al. (2006). *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 303-333). En el caso del brócoli los más representativos son los alifáticos, aromáticos e indólicos (A).

10

15

20 Tabla A. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura.

ESTRUCTURA	GLUCOSINOLATO
Alifáticos	Glucoiberina (GI)
	Glucorafanina (GR)
	Glucoerucina (GE)
Aromáticos	Gluconasturtina (GN)
Indólicos	Glucobrascicina (GB)
	Neoglucobrascicina (NGB)

25

Los glucosinolatos presentan diversas e importantes propiedades fisiológicas y constituyen un mecanismo de defensa para la planta contra herbívoros y patógenos, que a altas concentraciones producen estrés metabólico en herbívoros invertebrados, afectando a su crecimiento.

Tienen propiedades biológicas de interés para la prevención de algunas enfermedades en los humanos que los consumen (Jeffery, E. H. et al. (2009). *Phytochemistry Reviews*, vol. 8, 283–298). Además, contribuyen al mantenimiento de los tejidos corporales, aumentan la resistencia a las infecciones, regulan el correcto desarrollo del sistema nervioso e intervienen en el crecimiento, y resultan beneficiosos para la elaboración de enzimas en el hígado (Moreno, D.A. et al. (2008). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88, 1472-1481; Jeffery, E. H. et al. (2009). *Phytochemistry Reviews*, vol. 8, 283–298).

Los elicitadores o bioestimuladores son sustancias naturales que inducen cambios fisiológicos en la planta, activando sus mecanismos de defensa. Las plantas responden a estos factores mediante la activación de una serie de mecanismos, similares a las respuestas de defensa a las infecciones de patógenos o estímulos ambientales, que afectan al metabolismo de las plantas y mejoran la síntesis de fitoquímicos o metabolitos secundarios. Los primeros elicitadores bióticos se describieron a principios de la década de 1970 (Keen, N.T. (1975) *Science* 187, 74–75). Desde entonces, numerosas publicaciones han acumulado evidencias de aplicación de compuestos que inducen respuestas de defensa en plantas intactas como el brócoli (Ku KM et al. (2016) *Int J Mol Sci*. 15, 17(7), 1135). El uso de elicitadores se realiza también como herramienta para mejorar el contenido fitoquímico en plantas con fines de mejora alimentaria, aplicados solos o en combinaciones en puntos de tiempo seleccionados del crecimiento vegetal (para revisión ver: Baenas, N. et al. (2014). *Molecules*, 19(9), 13541-13563). Los elicitadores pueden clasificarse como compuestos bióticos y abióticos, y las hormonas vegetales (ácido salicílico, jasmonatos, etc.) pueden considerarse también elicitadores.

La elicitación puede usarse como tratamiento precosecha o postcosecha. Entre los tratamientos de precosecha se considera también la preparación de semillas (“priming”), consistente en hidratar las semillas en una disolución con el elicitador para inducir la respuesta de defensa de las células. Así, por ejemplo, se ha observado que las semillas de perejil tratadas con jasmonato mostraron un incremento de los sistemas antioxidantes y la inducción de los sistemas de defensa por medio de la síntesis de fenilpropanoides (Conrath, U. et al. (2015) *Annual Review of Phytopathology* 53, 97-119). Los elicitadores también pueden aplicarse como un gas en un entorno cerrado (como MeJA), en forma líquida a una disolución hidropónica o

por aerosoles exógenos.

El ácido jasmónico (JA) y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), son ampliamente conocidos por suscitar una amplia gama de compuestos al inducir la expresión de genes vegetales para diversas rutas biosintéticas. Estas pequeñas moléculas de señalización también definidas como "hormonas", se inducen en las células en respuesta a heridas o ataque de patógenos en las plantas, y pueden, a su vez, inducir respuestas celulares a bajas concentraciones distantes de su sitio de síntesis.

En las prácticas de postcosecha, se han utilizado tratamientos con elicitadores específicos para mejorar el contenido fitoquímico y la calidad de alimentos como el brócoli (Villarreal-García D. et al (2016) *Front Plant Sci.* 10;7:45). Los resultados concluyeron que un tratamiento simple y efectivo con MeJA mejoraba el contenido de glucosinolatos individuales y de componentes fenólicos en el brócoli durante el almacenamiento, protegiéndolo de las contaminaciones en heridas.

Las investigaciones de los últimos años han demostrado el potencial de la aplicación de JA y MeJA en *Brassicas* para incrementar la concentración de compuestos bioactivos como los glucosinolatos. Casi todos los artículos están centrados en aplicaciones y determinaciones en germinados (Baenas, N. et al. (2014) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1881-1889) y en hojas de plantas jóvenes (Yi, GE et al. (2016) *Molecules* 24, 21(10)), esto es, en plantas sin cutícula desarrollada, aunque también aparecen algunas investigaciones con aplicación en inflorescencia (Kim, H.S. et al. (2001) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 136(4):239–246).

Por otra parte, los surfactantes, también conocidos como tensoactivos son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases y que pueden, por ejemplo, facilitar la penetración de moléculas (biocidas, fertilizantes, elicitadores, etc...) en las plantas. El número de surfactantes conocidos en el estado de la técnica es muy elevado, y su actividad y efecto dependen de muchos factores, como por ejemplo la especie vegetal, su estado fisiológico (presencia de cutícula o no) o las condiciones ambientales. Pudiendo incluso ocasionar efectos negativos en la coloración o en la forma de las partes comestibles de la planta, incluyendo la parte comestible del Broccoli (*Brassica oleracea ssp. italica*) cuando se combina con metil jasmonato (J Sci Food Agric 2014; 94: 2090–2096), aspecto este

que supone una depreciación o merma de la producción muy negativa para el productor.

5 El objeto de la presente invención es una composición que se fundamenta en la combinación de un elicitador como el metil jasmonato y de un surfactante como el polietileno polisiloxano, que puede ser utilizado mediante aplicaciones foliares en plantas adultas del género *Brassica* que presentan una cutícula desarrollada, preferiblemente en las que se utilizan en alimentación humana y más preferiblemente en el brócoli, consiguiendo un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos
10 (principalmente glucorafanina y neoglucobrasicina) en los floretes, sin que se produzca una degradación de sus características organolépticas. Además, su aplicación permite la aparición de un metabolito secundario que se identifican por primera vez en plantas del orden *Brassicales*, concretamente un feruloil-indol-glucosinolato (en adelante, feruloil-GLS).

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición caracterizada porque comprende jasmonato de metilo (MeJA), un polietileno polisiloxano,
20 agua y un alcohol C2-C4, preferiblemente etanol.

En una realización preferida, el alcohol C2-C4 es etanol.

En una realización más preferida la composición de la invención consiste en jasmonato de metilo (MeJA), un polietileno polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4,
25 preferiblemente etanol.

El poliéter polisiloxano es un copolímero de polisiloxano modificado con poliéter, preferiblemente con actividad surfactante. En la presente invención el poliéter polisiloxano también se denominará poliéter polisiloxano modificado (PPM).
30

Poliéter-polisiloxanos adecuados para su uso en la presente invención se conocen en el estado de la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, poliéter-polisiloxanos modificados están disponibles bajo la marca Break-Thru 9902™, Break-Thru 9903™, Break-Thru 5503™, Break-Thru 9907™ y Break-Thru 9908™.
35

Más preferiblemente, el polieter polisiloxano es un trisiloxano no iónico, por ejemplo, el disponible bajo la marca BREAK-THRU® S 233.

5 La concentración de jasmonato de metilo en la composición final está entre 50 y 500 μ molar, más preferiblemente la concentración de jasmonato de metilo en la composición es de 100 μ molar.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende

- jasmonato de metilo entre el 0,0015% y el 0,0028 % en volumen,
- 10 - polieter polisiloxano entre el 0,068% y el 0,1272% en volumen,
- alcohol C2-C4 entre 0,15 y el 0,28% en volumen, y
- agua hasta completar el 100% del volumen (esto es: agua entre 99,7805 y 99,59% en volumen).

15 Una realización más preferida de la composición de la invención consiste en: 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.

20 El uso de MeJA como elicitador en combinación con un polieter polisiloxano da lugar a un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos y la generación de un metabolito feruloil-GLS en las plantas a las que se aplica, incluso utilizando mínimas cantidades del elicitador MeJA.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en planta adulta del género *Brassica* que comprende las siguientes etapas:

- a) realizar una primera aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención en el momento de aparición del botón floral en la planta;
- 30 b) realizar una segunda aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención cinco días después de la primera aplicación;
- c) realizar una tercera aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención cinco días después de la segunda aplicación.

35 Mediante este procedimiento se producen incrementos del contenido en glucosinolatos

tanto en la inflorescencia como en las hojas sin que se produzca ninguna merma en las propiedades organolépticas o comerciales, preferentemente, producción, color, compactación, forma y sabor de la primera.

5 En la presente invención, los glucosinolatos se seleccionan preferiblemente entre glucorafanina, glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y combinaciones de ellos, más preferiblemente, neoglucobrasicina.

Adicionalmente, y de forma sorprendente, mediante este el procedimiento también se
10 obtiene al menos un compuesto (metabolito secundario), preferentemente un feruloil-indol-glucosinolato, en el que se unen un ácido fenólico y un glucosinolato indólico (tentativamente, neoglucobrasicina, NGB).

Hasta donde se conoce, es la primera vez que se describe este metabolito secundario
15 en plantas del orden *Brassicales*, derivado de glucosinolato y compuesto fenólico, que puede ser un compuesto para movilización de glucosinolatos entre órganos de la planta. Adicionalmente, y dado que los componentes del metabolito secundario presentan por separado efectos beneficiosos sobre la salud del que los ingiere, es de esperar que la combinación de ambos también conserve dicho efecto.

20

La magnitud del incremento de la concentración de glucosinolatos que se obtiene con la aplicación de la composición de la invención, utilizando una muy baja concentración del elicitador MeJA (preferiblemente no superior a 100 μ molar), necesita en otros ensayos realizados con el mismo elicitador y recogidos en el estado de la técnica, de
25 concentraciones muy superiores para alcanzar igual magnitud (ver ejemplos de la presente invención).

En una realización preferida de la invención, la planta del género *Brassica* se selecciona de la lista que comprende brócoli, coliflor, repollo, grelo, coles de Bruselas,
30 colinabo, nabo, colirrábano, kale y colza. Aún más preferiblemente, la planta es el brócoli.

En una realización preferida de la invención, se aplica una cantidad entre 100 y 150 ml de la composición en cada una de las aplicaciones foliares por planta cada planta.

35

Preferiblemente, la aplicación foliar de la composición es mediante spray.

En una realización más preferida del procedimiento de la invención:

5 - la aplicación foliar de la composición es mediante spray aplicando una cantidad entre 100 y 150 ml de la composición por planta de brócoli en cada aplicación.

- la composición comprende un 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de poliéter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.

10 El procedimiento de la invención permite obtener alimentos funcionales que, además de sus efectos nutricionales habituales, tienen compuestos biológicos con efecto selectivo positivo añadido sobre una o varias funciones del organismo y que presentan efectos beneficiosos para la salud, mejorándola o reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades. Todo ello debido a que se incrementa en gran medida la síntesis y el
15 contenido de glucosinatos y de al menos un metabolito secundario derivado de glucosinolato y compuesto fenólico (feruloil-GLS) en los distintos tejidos de las plantas, incluidos sus floretes, utilizando muy bajas concentraciones de metil jasmonato cuando las plantas han desarrollado su cutícula, sin que se produzcan daños en los mismos.

20

Un último aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición para mejorar los mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos en una planta del orden *Brassicales*.

25 Hasta ahora, en el estado de la técnica, se ha descrito la posibilidad de incrementar los glucosinolatos de plantas del género *Brassica*, como por ejemplo el brócoli por medio de metil jasmonato, solo o combinado con un surfactante, tanto en germinados como en hoja y en inflorescencia. En la presente invención el metil jasmonato en combinación con un poliéter polisiloxano se aplica en una concentración reducida en
30 hojas y consigue un incremento de los glucosinolatos en hojas y en florete, así como la generación de al menos un metabolito secundario derivado de glucosinolato y compuesto fenólico, un feruloil-GLS, con sólo tres aplicaciones. Este incremento se observa, además, en diferentes variedades de brócoli. Adicionalmente, la composición de la invención no provoca una reducción de las propiedades organolépticas tal y
35 como se describe en las publicaciones incluidas en el estado de la técnica y se

demuestra en los resultados incluidos en la tabla 4 de la presente invención, utilizando una combinación de metil jasmonato y un surfactante de diferente naturaleza.

5 En la presente invención, el término “planta adulta” se refiere a una planta que ha terminado su periodo vegetativo pasa al período reproductivo. Las plantas adultas presentan una cutícula con mayor espesor que aquellas que se encuentran en los estadios iniciales del período vegetativo. De hecho, en la fase reproductiva del desarrollo de la planta, la cutícula de la hoja alcanza su máximo espesor. La cutícula es una capa de polímeros lipídicos impregnado con ceras que está presente en las superficies externas de los órganos primarios de todas las plantas terrestres vasculares. La cutícula forma una cobertura externa homogénea cuya función es evitar la permeabilidad del agua para prevenir la evaporación desde las células de la epidermis.

15 El término “botón floral” se refiere al primordio de la inflorescencia que parte de la yema apical del tallo principal. Estadío en el cual se inicia el desarrollo de la inflorescencia recubierta por unas pequeñas hojas para su protección.

20 El término “florete”, “florete” o “pella” se refiere a la inflorescencia inmadura o en desarrollo. Se trata del principal órgano de consumo alimentario con forma de corimbo compuesto, desarrollado a partir del botón floral. Está constituido por numerosos primordios florales sostenidos en tallos florales o pedicelos, que a su vez se disponen sobre pedúnculos suculentos.

25 El término “propiedades organolépticas” se refiere a las propiedades que se miden a través de los sentidos. Este análisis sensorial se basa en los parámetros básicos de color, forma, tamaño, aroma, textura, sabor y temperatura. En la presente invención, preferentemente se refieren a color, compactación, redondez y sabor.

30 El término “alcohol C2-C4” se refiere a un alcohol orgánico con un número de carbonos que va de dos a cuatro. Por ejemplo: etanol, propanol, butanol, tect-butanol, isobutanol.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus

variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
5 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 FIG. 1: Estructura básica de un glucosinolato.

FIG. 2: Estructura química de un feruloil-indol-glucosinolato, en el que el glucosinolato indólico es la neoglucobrasicina.

15 FIG. 3: Fotografía que muestra la dispersión de una gota cuando el metil jasmonato se añade con agua, Triton X-100 y PPM (polieter polisiloxano modificado).

Fig. 4. Espectro de absorción (UV-Vis), con los picos máximos de absorción coincidentes con un feruloil-GLS, las flechas indican los picos de máxima absorción a
20 227±3 nm (GLS) y 320±16 nm (ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico).

EJEMPLOS

A continuación se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la composición y procedimiento
25 de la invención.

Material y métodos

30 *Ensayo en campo*

Se utilizaron plántulas de tres variedades de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) obtenidas de un semillero donde las semillas crecieron durante 30 días. Concretamente las variedades fueron *Ares*, *Parthenon* y *Marathon*, todas ellas de la compañía SAKATA. El experimento se llevó a cabo durante el período de
35 otoño/invierno en una finca Experimental en el campo del Mirador en el término municipal de San Javier, (Murcia) bajo un clima mediterráneo semiárido. La media

diaria de temperatura y la humedad relativa se calcularon a partir de las mediciones realizadas cada 10 minutos utilizando un registrador de datos. La humedad alcanzada en la parcela fue del 50/80% (día / noche) y la temperatura del aire osciló entre los 24/8 °C de día y de noche respectivamente.

5

Se plantaron un total de 40 plantas por cultivar, 20 por cada tratamiento. Todas las plántulas se plantaron el mismo día, en las mismas condiciones y se regaron con fertirrigación [2 dS m⁻¹ conductividad eléctrica (CE)] dos veces al día durante 10 minutos durante los primeros 45 días, pasando a 15 minutos durante los siguientes 45 días.

10

Una vez alcanzada la fase reproductiva, esto es cuando aparece el botón floral (aproximadamente tras 120 días desde la siembra de las semillas en semillero) se aplicaron los tratamientos utilizando la Composición 1 y la Composición Control que se realizaron en tres ocasiones sobre la hoja. Una en el momento de la aparición del botón floral y las siguientes a 5 y 10 días respectivamente tras la primera aplicación. Cada aplicación se realizó mediante spray, aplicando 100-150 ml por planta. Las hojas y las inflorescencias fueron recogidas para su análisis una vez que alcanzaron su tamaño comercial (aproximadamente 18 días después de la aparición del botón floral) y se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron inmediatamente para evitar la degradación de los compuestos de interés hasta el momento de la determinación de glucosinolatos y otros metabolitos.

15

20

25

Durante la aplicación de los tratamientos se prolongó el riego por fertirrigación en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo con anterioridad a la aplicación de los tratamientos.

30

Composición 1: Se preparó una disolución que contenía 0,0022 % en volumen de MeJA (para una concentración final 100 micromolar en la composición), 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano (Break-Thru S 233 ®) y 99,6978% en volumen de agua.

35

Composición Control: El tratamiento control consistió en la aplicación de una disolución que contenía un 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y 99,9% en volumen de agua.

Ensayo en invernadero

En cámara de cultivo se hicieron germinar semillas de la variedad brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) *Parthenon* que crecieron durante 30 días. Posteriormente se
5 dejaron crecer en invernadero 75 días hasta que las inflorescencias alcanzaron el tamaño comercial. En este caso se realizó una aplicación foliar mediante spray de entre 100 y 150 ml por planta de los tratamientos que se indican a continuación: una en el momento de la aparición del botón floral y las siguientes a 5 y 10 días respectivamente tras la primera aplicación.

10

Composición control: consistente en una disolución que contenía un 0,2% en volumen de etanol y un 99,8% en volumen de agua.

Composición surfactante 1 (Triton X-100): consistente en una disolución que contenía
15 un 0,1% en volumen del surfactante Triton x-100 y un 99,9% en volumen de agua.

Composición surfactante 2 (PPM): consistente en una disolución que contenía un 0,1% en volumen del surfactante poliéter polisiloxano modificado y un 99,9% en volumen de
20 agua.

20

Composición elicitor (MeJA): consistente en una disolución que contenía un 0,0022 % en volumen de MeJA, un 0,2% en volumen de etanol y un 99,7978% en volumen de agua.

Composición 2 (MeJA +Triton x-100): consistente en una disolución que contenía un
25 0,0022 % en volumen de MeJA, un 0,2% en volumen de etanol, un 0,1% en volumen de Triton X-100 y 99,70% en volumen de agua.

Composición 1 (MeJA + PPM): Se preparó una disolución que contenía 0,0022 % en
30 volumen de MeJA (para una concentración final 100 micro molar en la composición), 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y 99,7968% en volumen de agua.

Posteriormente se cosecharon las plantas y las hojas y las inflorescencias se
35 congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron inmediatamente para evitar

degradaciones en los compuestos de interés hasta el momento de la determinación de glucosinolatos y metabolitos de interés.

Determinación de glucosinolatos y de un feruloil-GLS

5

Los análisis se realizaron en hoja e inflorescencia en el momento de recolección del tamaño comercial. El método empleado para la extracción de glucosinolatos se basó en el método desarrollado por el grupo de investigación y de dominio público actualmente: Dominguez-Perles et al. (2010) *Journal of Food Science* 75, 383-392. El análisis cuantitativo se realizó por HPLC-DAD. Las muestras liofilizadas y molidas (100 mg) se extrajeron con 1 ml de MeOH 70% en un baño caliente a 70°C durante 30 minutos agitando cada 5 minutos en vortex, para optimizar la extracción. A continuación se detuvo la reacción en baño de hielo y se centrifugaron las muestras para precipitar el material insoluble, durante 15 minutos, a 10000 g y a 4 °C. El sobrenadante se recogió y el metanol se eliminó en un rotavapor con baño termostático a 38 °C. El residuo seco que se obtuvo se redisolvió en agua ultra pura y se filtró (Ø0,22 µm de PVDF) para su análisis posterior.

Cada muestra (20 µl) se analizó en un cromatógrafo líquido de alta precisión (HPLC) equipado con bomba para reparto de eluyentes binaria, degasificador en línea, automuestreador detector de fotodiodos (DAD). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna C18 de 250x4 mm y 0,4µm de diámetro de poro, en modo de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). La identificación de glucosinolatos se realizó mediante la metodología ya descrita por el grupo de investigación y disponible públicamente de análisis multipropósito de glucosinolatos intactos (Martínez-Sánchez et al. 2006 *Postharvest Biol. Technol.* 42, 86-97; Dominguez-Perles et al. (2010) *Journal of Food Sci.* 75, 383-392), basándose en los tiempos de retención de los respectivos picos analíticos, sus espectros de absorción máximos en el rango UV-Vis y la comparación con estándares externos disponibles comercialmente, sinigrina para glucosinolatos alifáticos y glucobrasicina para glucosinolatos indólicos (Baenas et al. (2012) *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 11409-11420). La detección se realizó a 227 nm y la concentración de glucosinolatos se expresó en µmol/ g peso seco de tejido vegetal.

El espectro tipo del feruloil-GLS (véanse Figuras 2 y 4) en el que se unen un ácido fenólico y un glucosinolato indólico (tentativamente, neoglucobrasicina, NGB) se

determinó por fragmentación HPLC-DAD-ESI-MS/MS, observando el ión parental de 724 (M-H, m/z, 100%) y los fragmentos resultantes de 499 m/z (100%), 259 m/z (10.2%, indicador de glucosinolato) y 193 m/z (100%, indicador de feruloil derivado).

5

Los resultados de la aplicación de los tratamientos en los dos ensayos realizados se muestran a continuación.

Ensayo en campo

10

Tabla 1. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en hojas de distintas variedades de *Brassica oleracea* var. *Italica*) registradas en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos.

Tabla 1:

Variedad	Tratamiento	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgMGB/g PS	mgNGB/g PS	mgF-GSL/g PS	Total GSLs
Ares	Control	0,59 ±0,03	0,42 ±0,07	0,55 ±0,07	1,38 ±0,11	tr	2,94 ±0,15
Ares	Composición 1	0,63 ±0,04	0,56 ±0,05	0,69 ±0,05	1,43 ±0,09	0,01 ±0,001	3,31 ± 0,16
Parthenon	Control	1,03±0,10	1,09±0,11	0,30 ±0,05	1,17 ±0,10	tr	3,59 ± 0,11
Parthenon	Composición 1	1,11 ±0,10	2,25 ±0,15	0,33 ±0,04	2,04 ±0,18	0,01 ±0,001	5,73 ± 0,43
Marathon	Control	0,60±0,10	1,09 ±0,23	0,24 ±0,04	0,28 ±0,05	tr	2,21 ± 0,28
Marathon	Composición 1	0,77 ±0,05	2,61 ±0,14	0,41 ±0,02	1,53 ±0,11	0,01 ±0,002	5,32 ± 0,24

GR: Glucorafanina

GB: Glucobrasicina

MGB: Metoxiglucobrasicina

NGB: Neoglucobrasicina

F-GSL: Feruloil-glucosinolato

Tr: concentración en cantidades traza

PS. Peso seco

Tabla 2. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en inflorescencias de distintas variedades de *Brassica oleracea* var. Italica) registrados en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos.

Tabla 2:

Variedad	Tratamiento	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgMGB/g PS	mgNGB/gPS	mgF-GSL/g PS	Total GSLs
Ares	Control	1,15 ±0,04	1,05 ±0,05	0,48 ±0,03	1,65 ±0,08	tr	4,33 ±0,13
Ares	Composición 1	1,61 ±0,26	0,77 ±0,11	0,58 ±0,05	2,51 ±0,1	0,03 ±0,01	5,50 ±0,19
Parthenon	Control	1,75 ±0,04	2,12 ±0,16	0,50 ±0,05	1,10 ±0,25	tr	5,48 ±0,21
Parthenon	Composición 1	2,02 ±0,11	2,01 ±0,14	0,70 ±0,02	4,48 ±0,06	0,25 ±0,02	9,47 ±0,42
Marathon	Control	1,74 ±0,10	1,77 ±0,07	0,41 ±0,02	1,14 ±0,05	tr	5,06 ±0,53
Marathon	Composición 1	2,01 ±0,16	2,11 ±0,20	0,62 ±0,03	4,65 ±0,18	0,29 ±0,03	9,69 ±0,15

GR: Glucorrafanina

GB: Glucobrasicina

MGB: Metoxiglucobrasicina

NGB: Neoglucobrasicina

F-GSL: feruloi-GLS

Tr: concentración en cantidades traza

PS. Peso seco

- En las tablas 1 y 2 se puede observar que la aplicación foliar de la composición de la invención (Composición 1) en plantas adultas que han alcanzado la fase de reproducción y presentan cutícula desarrollada provoca, para plantas de distintos cultivares de las variedades *Ares*, *Parthenon* y *Marathon* un evidente efecto en el incremento de la concentración de los glucosinolatos individuales (GRA: Glucorafanina, MGB: Metoxiglucobrasicina y NGB: Neoglucobrasicina), tanto en hoja como en inflorescencia, y la aparición de un feruloil-GLS, también en las inflorescencias y en las hojas elicidadas.
- Adicionalmente, no se registró ninguna merma de las propiedades organolépticas de las inflorescencias obtenidas en este ensayo.

Ensayo en invernadero

- Tabla 3. Concentración de los glucosinolatos en hojas e inflorescencias de la variedad *Parthenon* en el ensayo en invernadero utilizando distintos tratamientos

HOJA (mg/ g PS)					
Parthenon	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgNGB/g PS	feruloil-GLS /g PS	GLS total
Control	0,37 ± 0.02	0,73 ± 0,12	0,71 ± 0,12	-	1,81 ± 0,05
Triton x-100	0,35 ± 0.06	0,70 ± 0,14	0,69 ± 0,15	-	1,74 ± 0,05
PPM	0,33 ± 0.04	0,68 ± 0,12	0,68 ± 0,12	-	1,69 ± 0,05
MeJA	0,35 ± 0.06	0,71 ± 0,12	0,69 ± 0,14	-	1,75 ± 0,05
MeJA +Triton x-100	0,29 ± 0.08	1,34 ± 0,11	3,41 ± 0,25	-	5,05 ± 0,06
MeJA +PPM	0,58 ± 0.21	1,36 ± 0,3	5,62 ± 0,38	1,68 ± 0,0,1	9,23 ± 0,18

INFLORESCENCIA (mg/g PS)					
Parthenon	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgNGB/g PS	feruloil-GLS /g PS	GLS total
Control	1,74± 0,06	2,08 ± 0,09	1,12± 0,09	-	4,94 ± 0,10
Triton x-100	1,75 ± 0,06	2,16 ± 0,14	1,19 ± 0,15	-	5,10 ± 0,12
PPM	1,73 ± 0,04	2,08 ± 0,12	1,08 ± 0,12	-	4,98 ± 0,15
MeJA	1,70± 0,10	2,05 ± 0,10	1,22± 0,12	-	4,97 ± 0,25
MeJA+Triton x-100	2,09 ± 0,14	2,31 ± 0,15	2,75 ± 0,19	-	7,15 ± 0,33
MeJA +PPM	2,08 ± 0,16	2,76 ± 0,28	4,83 ± 0,26	1,08 ± 0,10	10,75 ± 0,38

- GR: Glucorafanina
 GB: Glucobrasicina
 MGB: Metoxiglucobrasicina
 NGB: Neoglucobrasicina
 F-GSL: feruloil-GLS

Tr: concentración en cantidades traza
PS. Peso seco

5 Como se puede ver en la tabla 3, la aplicación de la Composición 1 (MeJA +PPM),
consigue incrementos en la concentración de glucosinolatos sustancialmente superior
al resto de tratamientos aplicados en inflorescencias y hojas y, además, es el único
que consigue la aparición de un feruloil-GLS. La Composición 2 (MeJA + Triton x-100)
que también favorece el incremento de los glucosinolatos aunque no de un feruloil-
10 GLS, sin embargo, consigue incremento mucho menor (concretamente con la
composición 1 del 116%, y con la composición 2 del 44%).

Tabla 4.- Resultados del porcentaje de inflorescencias comerciales de la variedad
Parthenon en el ensayo en invernadero

Parthenon	% de Pellas comerciales
Control	100
Triton x-100	81,1
PPM	100
MeJA	100
MeJA +Triton x-100	58,4
MeJA+PPM	100

15

Como se puede ver en la tabla 4, la aplicación de la Composición 1 (MeJA +PPM) no
produce ninguna degradación de las inflorescencias, considerando como degradación
la forma irregular o la alteración del color, que sí se produce de forma ostensible
cuando se utiliza otro surfactante.

20

Dispersión de la gota

La dispersión de la gota de las Composiciones 1 y 2 y la de Composición elicitor
(MeJA) y se determinó bajo un binocular (1,6x) (Figura 3). Se puede apreciar que en la
25 gota de MeJA no se observa dispersión alguna, hay más dispersión en la gota de
MeJA que contiene el surfactante Triton x-100 y una dispersión total en la gota que
contiene el surfactante PPM.

El cálculo del área de dispersión de la gota indica que el Triton x-100 se dispersa 4 veces más que el agua y el PPM se dispersa 41 veces más que el agua y 10 veces más que el Triton x-100 (véase Figura 3).

5

REIVINDICACIONES

1. Composición caracterizada porque comprende jasmonato de metilo (MeJA), un políeter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4.
- 5
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que consiste en jasmonato de metilo (MeJA), un políeter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que:
- 10
- el jasmonato de metilo representa entre el 0,0015% y el 0,0028 % de su volumen total;
 - el políeter polisiloxano representa entre el 0,068% y el 0,1272% de su volumen total;
 - 15 - el alcohol C2-C4 representa entre el 0,15% y el 0,28% de su volumen total; y
 - el agua representa el resto del volumen de la composición.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el alcohol C2-C4 es etanol.
- 20
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que consiste en 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de políeter polisiloxano y el resto agua hasta un volumen total del 100%.
- 25
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el políeter polisiloxano, es un trisiloxano no iónico.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la concentración jasmonato de métilo está entre 50 y 500 μ molar.
- 30
8. Composición según la reivindicación 7, donde la concentración de jasmonato de métilo es 100 μ molar.
- 35
9. Procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en una planta

adulta del género *Brassica* que comprende las siguientes etapas:

- 5
- a) realizar una primera aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el momento de aparición del botón foliar en la planta;
 - b) realizar una segunda aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cinco días después de la primera aplicación;
 - c) realizar una tercera aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cinco días después de la segunda aplicación.

10

10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde los glucosinolatos se seleccionan de la lista que comprende glucorafanina, glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y combinaciones de ellos.

15

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, donde la planta del género *Brassica* se selecciona entre brócoli, coliflor, repollo, grelo, coles de Bruselas, colinabo, nabo, colirrabano, kale y colza.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde la planta es el brócoli.

20

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde se aplica una cantidad de entre 100 y 150 ml de la composición en cada una de las aplicaciones.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 donde la aplicación foliar de la composición es mediante spray.

25

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde:

- la composición comprende un 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.

30

16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para mejorar los mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos en una planta del orden *Brassicales*.

35

17. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para obtener un alimento funcional.

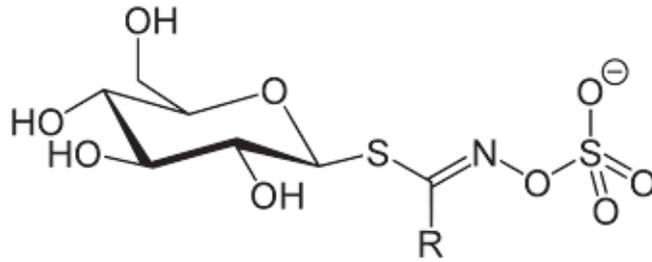


FIG. 1

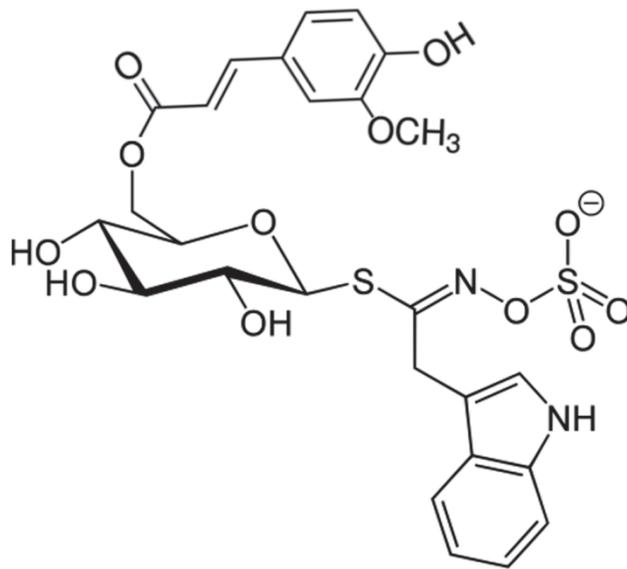


FIG. 2

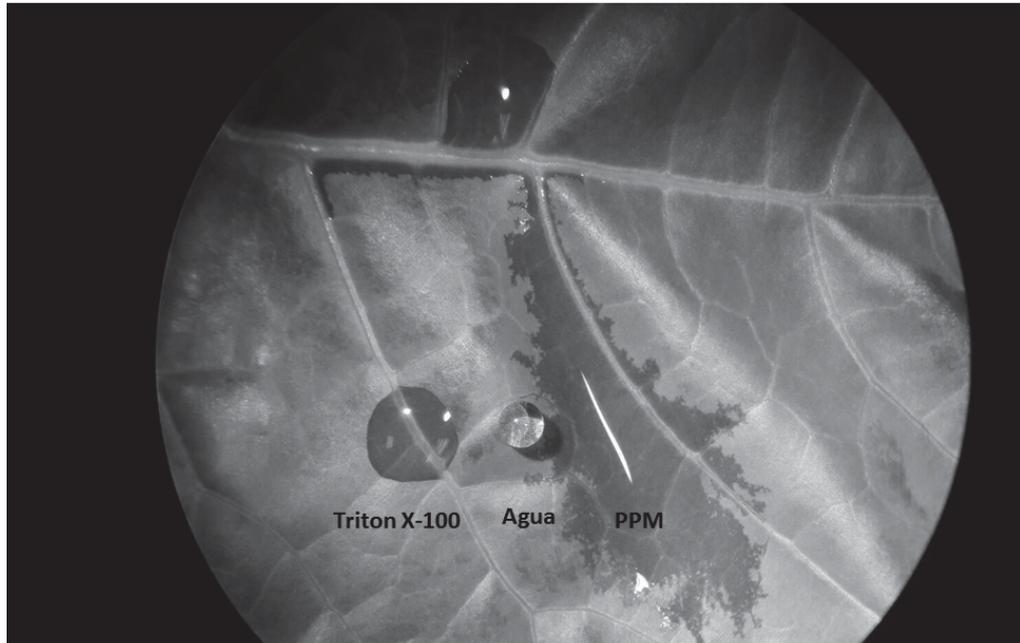


FIG. 3

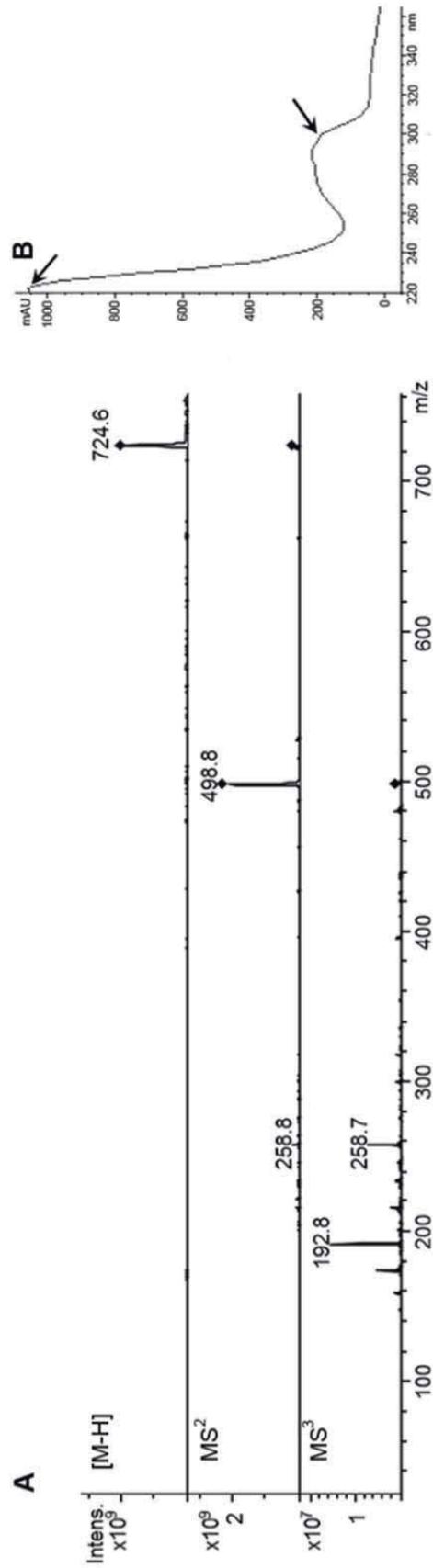


FIG. 4



- ②① N.º solicitud: 201830674
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H1/06** (2006.01)
A01G7/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SRIPONTAN YUWATIDA et al. Jasmonate-induced defense in tomato and cabbage deterred <i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae) growth. JOURNAL OF ASIA PACIFIC ENTOMOLOGY, KOREAN SOCIETY OF APPLIED ENTOMOLOGY, SUWON, KR. Lee Joon-Ho, 15/10/2016, Vol. 19, N° 4, Páginas 1125 - 1129, ISSN 1226-8615, <DOI: doi:10.1016/j.aspen.2016.10.004>, página 1126	1,2,6
X	TAN CHING-WEN et al. Methyl jasmonate induced responses in four plant species and its effect on <i>Spodoptera litura</i> Fab. Performance. Journal of Asia-Pacific Entomology, 31/08/2011, Vol. 14, N° 3, Páginas 263-269, ISSN 1226-8615(print) ISSN 1876-7990(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.aspen.2011.03.006>, página 264	1,2,6
A	LIU ANN G et al. Enhancement of Broccoli Indole Glucosinolates by Methyl Jasmonate Treatment and Effects on Prostate Carcinogenesis. Journal of Medicinal Food 31/10/2014, Vol. 17, N° 11, Páginas 1177-1182, ISSN 1096-620X(print) ISSN 1557-7600(electronic), <DOI: doi:10.1089/jmf.2013.0145>, resumen	1-17
A	KU KANG MO et al. Optimization of methyl jasmonate application to broccoli florets to enhance health-promoting phytochemical content. Journal of the Science of Food and Agriculture, 31/07/2014, Vol. 94, N° 10, Páginas 2090-2096, ISSN 0022-5142(print) ISSN 1097-0010(electronic), <DOI: doi:10.1002/jsfa.6529>, resumen	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 15.02.2019</p>	<p>Examinador I. Rueda Molíns</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

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

A01H, A01G

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, TX, INTERNET