

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 687**

51 Int. Cl.:

**A01N 41/10** (2006.01)

**A01N 65/08** (2009.01)

**A01N 65/00** (2009.01)

**A01N 65/34** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2015 PCT/FR2015/050561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2015 E 15714585 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3116319**

54 Título: **Procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para la industria fitofarmacéutica**

30 Prioridad:

**13.03.2014 FR 1452112**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**AGRO INNOVATION INTERNATIONAL (100.0%)  
18 Avenue Franklin Roosevelt  
35400 Saint-Malo, FR**

72 Inventor/es:

**GOUPIL, PASCALE;  
RICHARD, CLAIRE y  
TER HALLE, ALEXANDRA**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María**

ES 2 770 687 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**

Procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para la industria fitofarmacéutica

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para la industria fitofarmacéutica.

10

**Contexto de la invención**

Casi el 10 % de la superficie del planeta está cubierta por plantas leñosas de tipo arborescente. Una planta leñosa de tipo arborescente produce, por término medio, casi 300 kg de hojas por año. Esta biomasa es a la vez abundante y fácilmente accesible, pero poco utilizada. De hecho, después de la abscisión, las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente se recogen en muy raras ocasiones y terminan pudriéndose. Las que se recogen se transforman en compost, se incineran o se entierran. En todos los casos, esta abundante biomasa constituye el origen de una importante liberación de gases de efecto invernadero tales como el dióxido de carbono y el metano.

15

20

El documento US 2010/0016161 se refiere a formulaciones fitosanitarias que comprenden al menos un principio activo y al menos un extracto alcohólico, hidroalcohólico o acuoso de al menos una planta tintórea. Estas formulaciones fitosanitarias se pueden utilizar en el campo de la agricultura y la horticultura, en particular.

25

Por lo tanto, sería útil desarrollar un procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente que permita reciclarlas y limitar su impacto sobre el medio ambiente.

30

De manera sorprendente, el solicitante ha descubierto una manera de reciclar esta abundante biomasa que no se utiliza en la actualidad y de reutilizarla mejorando de forma natural la salud de otras plantas, estableciendo así un círculo virtuoso. En efecto, ha descubierto que un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente presentaba propiedades tales que podía utilizarse, solo o mezclado con un producto fitosanitario, para una aplicación fitosanitaria.

35

A los efectos de la presente invención, un producto fitosanitario se define como un producto destinado a proteger las plantas contra todos los organismos nocivos o a impedir la acción de estos últimos. Por ejemplo, los pesticidas, herbicidas, fungicidas, insecticidas, molusquicidas son productos fitosanitarios en el sentido de la presente invención.

40

De este modo, la invención tiene por objeto, de acuerdo con un primer aspecto, un procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente que comprende las etapas de:

45

- a) recogida de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente, seleccionándose dicha planta leñosa de tipo arborescente del grupo que consiste en acacia, abedul, carpe, castaño, roble, arce, fresno, haya, castaño de Indias, plátano, prunus, sauce, sophora y álamo,
- b) reducción a extracto de dichas hojas con un disolvente acuoso que consiste en agua bisulfitada, cuyo contenido de bisulfito está comprendido entre 0,5 g/l y 2 g/l, o un disolvente hidroalcohólico que comprende más del 25 % (v/v) de etanol, pudiendo contener también dicho disolvente un ácido en un contenido inferior al 2,5 % (v/v), y
- c) uso de dicho extracto para una aplicación fitosanitaria que consiste en la obtención de una planta o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.

50

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención también se refiere al uso de un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para una aplicación fitosanitaria.

55

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento fitosanitario, que comprende la aplicación a un planta de una composición que comprende un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente.

**Descripción detallada de la invención**

60

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente que generalmente comprende las etapas de:

65

- a) recogida de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente,
- b) reducción a extracto de dichas hojas con un disolvente, y
- c) utilización de dicho extracto para una aplicación fitosanitaria.

Una planta leñosa de tipo arborescente es una planta perenne que produce tejidos secundarios duros llamados xilema II o MADERA y que adopta la forma de un árbol. La amplia distribución geográfica de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente las convierte en una materia prima abundante, fácilmente disponible y de fácil acceso, especialmente en otoño.

5 De acuerdo con la invención, la planta leñosa de tipo arborescente se selecciona del grupo que consiste en acacia, abedul, carpe, castaño, roble, arce, fresno, haya, castaño de Indias, plátano, prunus, sauce, sophora, álamo y sus mezclas y, más preferiblemente, se selecciona del grupo que consiste en arce, prunus, plátano, roble y sus mezclas.

10 De manera ventajosa, el procedimiento de acuerdo con la invención permite reciclar y reutilizar la abundante biomasa representada por las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente. El procedimiento de acuerdo con la invención también permite reducir la producción de gases de efecto invernadero por esta abundante biomasa no utilizada. De manera ventajosa, el procedimiento de acuerdo con la invención, por lo tanto, limita el impacto ambiental de esta abundante biomasa no utilizada.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención comprende, antes de la etapa de reducción a extracto, una etapa de recogida de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente. Esta etapa de recogida se puede disociar en el espacio y en el tiempo de las demás etapas del procedimiento. La etapa de recogida puede llevarse a cabo antes o después de la abscisión.

20 Después de la recogida, las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente pueden someterse a un pretratamiento físico, por ejemplo, corte, trituración, pulverización. De manera ventajosa, este pretratamiento físico permite aumentar el rendimiento de la etapa a) de reducción a extracto del procedimiento de reutilización de acuerdo con la invención. No se someten a fermentación ni a compostaje.

25 De acuerdo con una realización, las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente no se someten a decocción, maceración ni infusión.

30 De acuerdo con la invención, la etapa b) de reducción a extracto se lleva a cabo utilizando un disolvente que puede ser:

35 - un disolvente acuoso que consiste en agua bisulfitada cuyo contenido de bisulfito puede estar comprendido entre 0,5 g/l y 2 g/l, de preferencia entre 0,75 g/l y 1,5 g/l, y más preferiblemente es de aproximadamente 1 g/l. El bisulfito mejora la solubilización del extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente y evita su oxidación.

- un disolvente hidroalcohólico que comprende agua y etanol en una cantidad de más del 25 % (v/v), preferiblemente más del 50 % (v/v), incluso más preferiblemente más del 75 % (v/v).

40 El disolvente también puede acidificarse ligeramente añadiendo un ácido. De manera ventajosa, un disolvente ligeramente acidificado estabiliza el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente. El contenido de ácido en el disolvente es entonces inferior al 2,5 % (v/v) de ácido, preferiblemente inferior al 1 % (v/v) de ácido. De manera ventajosa, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético y sus mezclas.

45 De acuerdo con una realización preferida, el disolvente hidroalcohólico comprende 80 % (v/v) de etanol y 0,5 % (v/v) de ácido clorhídrico 0,1N.

50 De acuerdo con una realización, la etapa b) de reducción a extracto se lleva a cabo a temperatura ambiente, es decir, desde aproximadamente 18 °C hasta aproximadamente 25 °C.

De acuerdo con una realización, la etapa b) de reducción a extracto se lleva a cabo solo una vez.

55 De acuerdo con una realización, la etapa b) de reducción a extracto se lleva a cabo varias veces reciclando el disolvente y/o las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para mejorar el rendimiento de la etapa a) de reducción a extracto.

60 El extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente obtenido en la etapa b) presenta una actividad inductora. Por lo tanto, estimula las defensas naturales de una planta a la que se ha aplicado previamente. El extracto también presenta una actividad biocida que le permite tratar, de forma preventiva o curativa, una planta a la que se le ha aplicado previamente contra un patógeno. Finalmente, el extracto se puede utilizar con un producto fitosanitario para mejorar su rendimiento. El extracto permite así reducir la cantidad de producto fitosanitario utilizado y limitar su acumulación en las plantas y, por lo tanto, el peligro que puede presentar para el medio ambiente, los seres humanos y los animales. Teniendo en cuenta las propiedades del extracto de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente descrito anteriormente, la aplicación fitosanitaria consiste en la obtención de una planta o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.

5 El extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente comprende compuestos fáciles de extraer y solubles en agua, por lo tanto, son fáciles de emplear (dilución fácil en una composición, por ejemplo). Los compuestos, sintetizados por una planta leñosa de tipo arborescente son naturales, lo que permite la utilización del extracto en la agricultura ecológica. Estos compuestos son en particular polifenoles y antocianinas.

10 De acuerdo con una realización, el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente comprende menos del 45 % en peso de polifenoles en relación con el peso seco del extracto. Preferiblemente, el extracto comprende entre 5 % en peso y 40 % en peso de polifenoles en relación con el peso seco del extracto.

15 El extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente también puede comprender menos del 2 % en peso de antocianinas en relación con el peso seco del extracto. Preferiblemente, el extracto comprende menos del 1,1 % en peso de antocianinas con respecto al peso seco del extracto.

20 El procedimiento de reutilización de acuerdo con la invención resulta completamente adecuado para la aplicación fitosanitaria en plantas seleccionadas del grupo que consiste en plantas agronómicamente útiles, plantas aromáticas y plantas ornamentales. Las plantas agronómicamente útiles y las plantas aromáticas se seleccionan del grupo que consiste en angiospermas que incluyen Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Polygonaceae, Rosaceae, Solanaceae, Poaceae, Vitaceae.

25 Una sola aplicación del extracto antes del ataque de un agente patógeno puede ser suficiente para obtener la aplicación fitosanitaria deseada. Sin embargo, los procedimientos de aplicación obviamente dependen de las especies de plantas que se van a tratar y de su etapa de desarrollo, por lo que a veces puede resultar necesario aplicar el extracto al menos una vez más varios días o varias semanas después de la primera realización.

30 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente para una aplicación fitosanitaria.

35 El extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente se obtiene, de manera ventajosa, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

40 De acuerdo con la invención, la aplicación fitosanitaria consiste en la obtención de una planta, o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.

45 El uso de acuerdo con la invención puede implementarse en plantas agronómicamente útiles y plantas ornamentales. Dichas plantas son las mencionadas anteriormente en relación con el procedimiento de reutilización.

50 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento fitosanitario de una planta, que comprende la aplicación de una composición que comprende un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente sobre dicha planta.

55 La composición utilizada en el procedimiento de tratamiento fitosanitario de acuerdo con la invención comprende, como producto activo, un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente. El extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente se obtiene, de manera ventajosa, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

60 La composición utilizada en el procedimiento de tratamiento fitosanitario de acuerdo con la invención puede presentarse en forma líquida o en forma de polvo.

65 Cuando la composición está en forma de polvo, carece de cualquier otro agente activo.

Antes de su adición a la composición, el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente puede estar en forma líquida o en polvo.

70 Cuando el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente está en forma líquida, puede ser acuoso, alcohólico o hidroalcohólico, preferiblemente el extracto es hidroalcohólico.

75 Cuando el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente está en forma de polvo, éste se obtiene siguiendo una etapa de separación del disolvente descrito anteriormente en relación con la etapa a) del procedimiento de reutilización. De manera ventajosa, la separación no degrada los compuestos presentes en el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente y no modifica su contenido. Esta separación se lleva a cabo mediante un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en secado, liofilización, atomización, evaporación, preferiblemente liofilización.

80 De acuerdo con una realización del procedimiento de tratamiento de acuerdo con la invención, la composición está

en forma líquida y se aplica por infiltración o por pulverización foliar.

5 La concentración del extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en la composición utilizada en el procedimiento fitosanitario de acuerdo con la invención está comprendida entre 0,001 y 5 %, de preferencia entre 0,005 y 2,5 %, y más preferiblemente aún entre 0,01 % y 1,25 %, en relación con el peso seco del extracto.

10 Para una aplicación por infiltración, la concentración del extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en una composición utilizada en el procedimiento fitosanitario de acuerdo con la invención está comprendida entre 0,1 y 5 %, de preferencia entre 0,25 y 2,5 %, y más preferiblemente aún entre 0,75 % y 1,25 %, en relación con el peso seco del extracto. Esta composición resulta particularmente útil para la obtención de una planta y el tratamiento, curativo o preventivo, de una planta contra un patógeno.

15 Para una aplicación por pulverización foliar, la concentración del extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en una composición utilizada en el procedimiento fitosanitario de acuerdo con la invención está comprendida entre 0,001 y 2 %, de preferencia entre 0,005 y 1 %, y más preferiblemente aún entre 0,01 % y 0,05 %, en relación con el peso seco del extracto para aplicación por pulverización foliar.

20 Una sola aplicación de la composición antes del ataque de un agente patógeno puede ser suficiente. Sin embargo, a veces puede resultar necesario realizar al menos una nueva aplicación varios días o varias semanas después de la primera.

La composición se aplica a una velocidad de 0,1 kg/ha a 2 kg/ha, preferiblemente de 0,3 kg/ha a 1,5 kg/ha de plantas que se van a tratar.

25 Las dosis de aplicación y los procedimientos de aplicación, obviamente, dependen de las especies de plantas que se van a tratar y de su etapa de desarrollo.

30 El procedimiento de tratamiento fitosanitario de acuerdo con la invención puede implementarse en plantas agronómicamente útiles, plantas aromáticas y plantas ornamentales. Dichas plantas son las mencionadas anteriormente en relación con el procedimiento de reutilización.

35 La infiltración de un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en hojas de tabaco y hojas de tomate, induce una respuesta de hipersensibilidad (local) acompañada de una respuesta de resistencia sistémica (resistencia sistémica adquirida, SAR por sus siglas en inglés), que refleja el efecto inductor del extracto, efecto característico de la inducción de inmunidad contra los patógenos. El efecto inductor sobre las hojas de tabaco se ha demostrado a nivel molecular mediante el análisis de la expresión de genes que marcan la respuesta SAR, es decir, genes que codifican las proteínas de la patogénesis (proteínas PR) con PR1 (antimicrobiano), PR2 (glucanasa), PR3 (quitinasa) y el gen PAL (fenilalanina amoniaco liasa) que codifica una enzima implicada en la síntesis de fenilpropanoides (compuestos fenólicos).

40 La infiltración de una composición que comprende un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en las hojas de tabaco permite reducir las infecciones causadas por agentes patógenos en estas mismas hojas de tabaco.

45 La pulverización de composiciones que comprenden un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente mezclado con un pesticida permite reducir la cinética de la fotodegradación de dicho pesticida por radiación solar.

50 La invención se describirá con más detalle a continuación utilizando los siguientes ejemplos que se proporcionan solo a modo de ilustración.

### Ejemplos

55 Los ejemplos se ilustran en las Figuras 1 a 5.

La Figura 1 representa dos fotografías de una hoja de tabaco bajo luz blanca (a la izquierda) y ultravioleta (longitud de onda de 312 nm) (a la derecha), justo después de la infiltración de composiciones que comprenden diversos extractos preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 (extractos 2, 4 y 9), agua ultrapura (EAU) y ácido salicílico (AS).

60 La Figura 2 representa dos fotografías de una hoja de tabaco bajo luz blanca (a la izquierda) y ultravioleta (longitud de onda de 312 nm) (a la derecha), 4 días después de la infiltración de las composiciones que comprenden diferentes extractos preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 (extractos 2, 4 y 9), agua ultrapura (EAU) y ácido salicílico (AS).

65 La Figura 3 representa dos fotografías de una hoja de tabaco bajo luz blanca, 4 días después de la infiltración de

las composiciones que comprenden diferentes extractos preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 (extractos 1, 3, 5, 6, 7 y 8).

5 La Figura 4 es un gráfico que muestra la acumulación de transcripciones que codifican los genes vinculados a las reacciones de defensa de la planta (PAL, PR1, PR2 y PR3), 4 días después de la infiltración de las composiciones que comprenden diversos extractos preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 (extractos 1, 2, 3, 4 y 9), ácido salicílico (AS) y agua ultrapura (control).

10 La Figura 5 representa cuatro fotografías de hojas de tabaco bajo luz blanca (A y C) y luz ultravioleta (longitud de onda de 312 nm (B y D)), 4 días después de la infiltración de las composiciones que comprenden extractos obtenidos con agua bisulfitada (A y B) o etanol al 30 % (C y D) y que presenta diferentes contenidos de polifenoles.

15 La Figura 6 representa cinco fotografías de hojas de tomate bajo luz blanca, 4 días después de la infiltración de las composiciones que comprenden diferentes extractos (extractos 1, 8 y 9), agua ultrapura (CONTROL AGUA) y ácido salicílico (AS).

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de extractos de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente

20 Recogida

Se utilizaron cuatro plantas leñosas de tipo arborescente como fuentes de hojas caducas para obtener nueve extractos diferentes. Las hojas caducas se recogieron en agosto o noviembre, antes o después de la abscisión. Las recogidas en agosto no muestran síntomas de senescencia de las hojas, mientras que las recogidas en noviembre muestran estos síntomas con los colores del otoño. La Tabla 1 enumera las procedencias de las hojas caducas utilizadas.

Tabla 1: Procedencias de las hojas caducas utilizadas

Extracto n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Planta leñosa de tipo arborescente	Arce rojo		Prunus		Plátano		Roble rojo		Mezcla de hojas senescentes
Periodo de recogida	agosto ant. abs.	nov. ant. abs.	agosto ant. abs.	nov. ant. abs.	nov. ant. abs.	nov. desp. abs.	nov. ant. abs.	nov. desp. abs.	nov. desp. abs.
nov.: noviembre; ant. abs.: antes de la abscisión; desp. abs.: después de la abscisión									

30 Obtención de un extracto

Después de ser recogidas, las hojas se rocían en nitrógeno líquido. La reducción a extracto se lleva a cabo en 5 g de hojas rociadas con 25 ml de disolvente hidroalcohólico ligeramente acidificado (80 % de etanol y 0,5 % de HCl 0,1N). Una vez realizada la reducción a extracto, el homogenado se almacena a -20 °C durante 1 hora y el sobrenadante se recupera por centrifugación a 500 xg a 4 °C. Después de 2 extracciones consecutivas, el extracto se liofiliza para eliminar el disolvente.

Determinación del contenido de polifenoles y antocianinas de los extractos

40 El contenido total de polifenoles se determinó por colorimetría utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu y el procedimiento descrito por Emmons y Peterson (Crop. Sci., 2001, 41:1676-1681). El contenido total de antocianinas se determinó mediante el procedimiento de pH diferencial descrito por Muñoz-Espada y col. (J. Agr. Food. Chem., 2004, 52: 6779-6786). El contenido total de polifenoles y antocianinas se indica en la Tabla 2.

45 Tabla 2: Contenido de polifenoles y antocianinas en los extractos

Extracto n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Contenido total de polifenoles (%*)	33	23,6	16,5	21,3	11,4	17,2	20,8	14,8	36
Contenido total de antocianinas (%**)	0,06	0,23	1,08	0,01	0,01	0,01	0,14	0	0,16
* en peso de polifenoles en relación con el peso seco del extracto. ** en peso de antocianinas en relación con el peso seco del extracto.									

Los resultados indican que los extractos presentan contenidos totales de polifenoles entre 10 y 40 % en relación con

el peso seco del extracto y contenidos totales de antocianinas inferiores al 1,1 % en peso de antocianinas en relación con el peso extracto seco.

Ejemplo 2: Efecto inductor sobre hojas de tabaco

5 Los experimentos se llevan a cabo en hojas de tabaco de plantas de tabaco, en la etapa de 10-12 hojas (3 meses), cultivadas en un invernadero bajo condiciones controladas ( $22 \pm 5$  °C con un fotoperíodo de 16 h de luz).

10 Se estudia la actividad inductora de los nueve extractos obtenidos en el Ejemplo 1. Nueve composiciones que comprenden 1 % de extracto con relación al peso seco del extracto se obtienen disolviendo los nueve extractos en agua ultrapura. Cada composición se almacena a 4 °C antes de su uso.

Síntomas macroscópicos

15 Se infiltran 50 µl de las composiciones anteriores en las hojas de tabaco hasta que la composición se extiende sobre un área de 1 a 2 cm<sup>2</sup>. Se lleva a cabo un control positivo con ácido salicílico (2 mM), que es un inductor conocido. Se realiza un control negativo con agua ultrapura.

Resultados

20 Se observa en las fotografías de las Figuras 1, 2 y 3 que la infiltración induce clorosis (área clara desprovista de clorofila) del tejido infiltrado con la aparición de necrosis (área marrón seca). También induce una acumulación local de compuestos fluorescentes, lo que sugiere una acumulación de compuestos fenólicos antimicrobianos, característicos de la "resistencia local adquirida" (LAR, por sus siglas en inglés) involucrada en las reacciones de  
25 defensa de las plantas.

Expresión de genes vinculados a reacciones de defensa de la planta.

30 La actividad inductora de los extractos se ha demostrado a nivel molecular mediante el análisis de la expresión de genes vinculados a las reacciones de defensa de las plantas PAL, PR1, PR2 y PR3.

35 El análisis molecular consistió en extraer el ARN total de las hojas de tabaco, infiltradas durante cuatro días, utilizando el kit de extracción Tri-reactivo (Euromedex) y respetando las instrucciones del fabricante. La transcriptasa inversa se realizó en 1 µg de ARN total utilizando (RT) Euroscript (Eurogentec) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Los fragmentos de RT-PCR específicos para PAL, PR1, PR2 y PR3 se cuantifican utilizando el software iQv3 (BIO-RAD). La abundancia de transcripciones PAL, PR1, PR2 y PR3 se normaliza (cantidad relativa) a las de un gen de expresión constitutiva, que codifica la actina o el factor de alargamiento alfa.

Resultados

45 La Figura 4 muestra que la acumulación de genes es mucho mayor en las hojas infiltradas con las composiciones que comprenden los extractos 1, 2, 3, 4 y 9 que con agua ultrapura. Todas las composiciones probadas inducen una gran acumulación de transcripciones que codifican los genes de defensa. La acumulación de genes de defensa en las hojas infiltradas con la composición que comprende el extracto 3 es del mismo orden de magnitud que para las hojas infiltradas con ácido salicílico, que se conoce como inductor.

50 Estos datos demuestran el efecto inductor de los extractos que fomentan una acumulación de genes vinculados a las reacciones de defensa de las plantas.

Ejemplo 3: Impacto del disolvente sobre el efecto inductor en las hojas de tabaco: síntomas macroscópicos

55 Los extractos probados se obtienen de las hojas de arce rojo recogidas en noviembre antes de la abscisión.

El procedimiento de reducción a extracto es idéntico al del Ejemplo 1, pero el disolvente utilizado es agua bisulfitada o etanol al 30 %.

60 La prueba realizada para el estudio de los síntomas macroscópicos es idéntica a la del Ejemplo 2.

La infiltración de extractos de arce rojo de la reducción a extracto con agua bisulfitada (fotografías A y B de la Figura 5) o con etanol al 30 % (fotografías C y D de la Figura 5) que comprende 0,19 % de polifenoles (1), diluida dos veces (2), cuatro veces (3), ocho veces (4) y dieciséis veces (5) conduce a la formación de clorosas tal como se muestra en las fotografías A y C de la Figura 5.

65 Las fotografías B y D de la Figura 5 muestran que la formación de clorosas está acompañada por la formación de

compuestos fluorescentes. Estos fenómenos dan testimonio del establecimiento de reacciones de defensa.

Los dos disolventes utilizados para la extracción de polifenoles resultan, por lo tanto, adecuados para extraer las biomoléculas activas que desencadenan la respuesta de tipo HR (hipersensible).

Ejemplo 4: Efecto inductor en hojas de tomate

Los experimentos se llevan a cabo en hojas de tomate de plantas de tomate de 6 semanas de edad, en la etapa de 5-6 hojas, cultivadas en un invernadero bajo condiciones controladas ( $22 \pm 5$  °C con un fotoperiodo de 16 h de luz).

Se estudia la actividad inductora de los extractos obtenidos en el Ejemplo 1. Se obtienen tres composiciones que comprenden 0,25 % de extracto en relación con el peso seco del extracto disolviendo los extractos en agua ultrapura. Cada composición se almacena a 4 °C antes de su uso.

Síntomas macroscópicos

50 µl de las composiciones que comprenden los extractos 1, 8 y 9 se infiltran en las hojas de tomate hasta que la composición se extiende sobre un área de 1 a 2 cm<sup>2</sup>. Se lleva a cabo un control positivo con ácido salicílico (2 mM), que es un inductor conocido. Se realiza un control negativo con agua ultrapura.

Resultados

Se observa en las fotografías de la Figura 6 que la infiltración induce clorosis (área clara desprovista de clorofila) de los tejidos infiltrados con la aparición de necrosis (área marrón seca) lo que sugiere una respuesta de tipo hipersensible característica de LAR "resistencia local adquirida" involucrada en las reacciones de defensa de la planta.

Ejemplo 5: Tratamiento curativo contra un patógeno de hojas de tabaco con extractos de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente

Se utilizan composiciones idénticas y hojas de las mismas plantas de tabaco que en el Ejemplo 2. Se cortan dos discos (10 cm de diámetro) de la misma hoja, luego se colocan en una placa de Petri que contiene una capa de gel de agarosa al 2 %.

El patógeno seleccionado para el estudio es el aislado 329 de *Phytophthora parasitica spp nicotianae* (Ppn). Se cultiva Ppn en agar de malta a 24 °C. Para la producción de zoosporas, el micelio Ppn se cultiva durante una semana en el medio líquido V8 a 24 °C en condiciones de luz continua, se macera y luego se incuba durante cuatro días en agua que contiene 2 % de agar. Las zoosporas se liberan utilizando un choque térmico que consiste en 2 incubaciones, la primera a 4 °C durante 20 min, la segunda a 37 °C durante 30 min después de agregar 10 ml de agua. Se prepara una suspensión de zoosporas en agua (1 zoospora por microlitro) antes de inocularse.

Las composiciones que contienen los extractos (50 µl) se infiltran y las suspensiones de zoosporas (100 µl) se inoculan, en dos zonas separadas, a 1 cm de distancia, del parénquima de la hoja de tabaco. Se llevan a cabo pruebas en las que las composiciones se reemplazan por ácido salicílico (control positivo) o agua ultrapura (control negativo). Tres días después de las infiltraciones, se mide el área de la zona de infección. Las mediciones se realizan con el software Optima y Photoshop para Windows.

Resultados

Los resultados se agrupan en la Tabla 3. En las pruebas con las composiciones que contienen los extractos 7 y 8, el área de la zona de infección es más pequeña que la de la prueba con agua ultrapura, y del mismo orden de magnitud que la prueba con ácido salicílico. Por lo tanto, estos resultados demuestran la capacidad de los extractos para reducir el área de infección del patógeno Ppn en las hojas de tabaco. El nivel de protección medido para los extractos 7 y 8 es, respectivamente, 46 % y 44 % en comparación con el agua ultrapura.

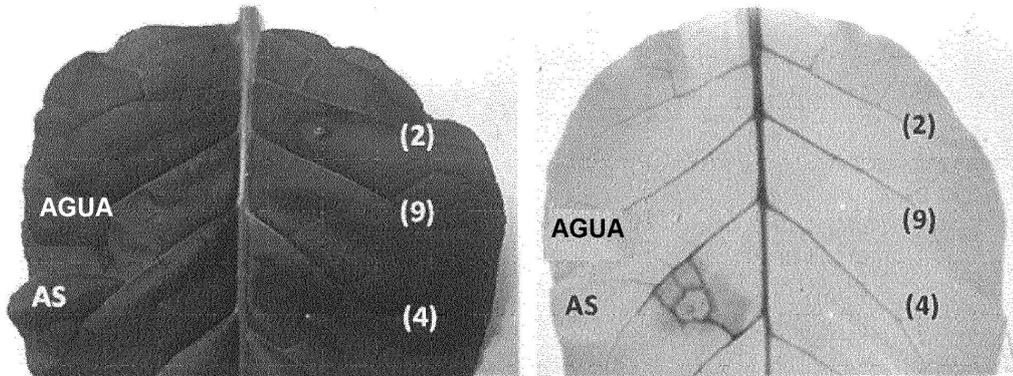
Estos datos demuestran que los extractos de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente pueden utilizarse en el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un patógeno.

Tabla 3

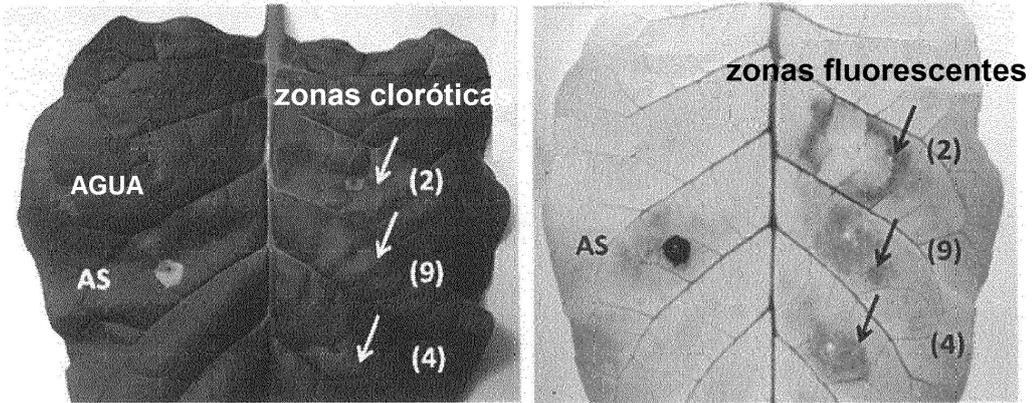
	Agua ultrapura	Ácido salicílico	Extracto 7	Extracto 8
Área de la zona de infección (cm <sup>2</sup> )	18,7±2,6	10,9±2,8	10,1±4	10,4±1,1

**REIVINDICACIONES**

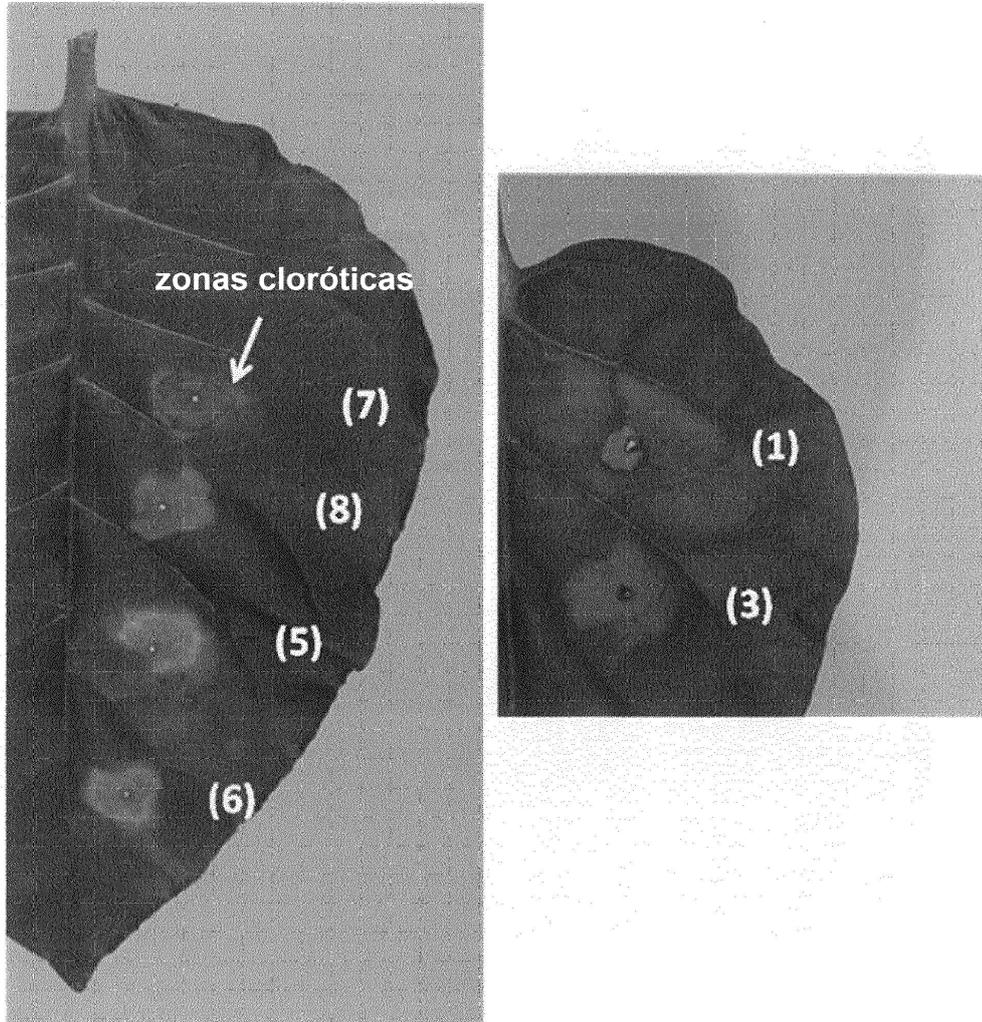
1. Procedimiento de reutilización de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente, que comprende las etapas de:
- 5 a) recogida de las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente, seleccionándose dicha planta leñosa de tipo arborescente del grupo que consiste en acacia, abedul, carpe, castaño, roble, arce, fresno, haya, castaño de Indias, plátano, prunus, sauce, sophora y álamo,
- 10 b) reducción a extracto de dichas hojas por medio de un disolvente acuoso que consiste en agua bisulfitada, cuyo contenido de bisulfito está comprendido entre 0,5 g/l y 2 g/l o un disolvente hidroalcohólico que comprende más del 25 % de etanol (v/v), pudiendo contener también dicho disolvente un ácido en un contenido inferior al 2,5 % (v/v), y
- 15 c) utilización de dicho extracto para una aplicación fitosanitaria que consiste en la obtención de una planta, o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente se recogen antes de la abscisión y/o después de la abscisión.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** el ácido mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético y mezclas de los mismos.
4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la etapa de reducción a extracto b) se lleva a cabo utilizando un disolvente hidroalcohólico que comprende 80 % (v/v) de etanol y 0,5 % (v/v) de ácido clorhídrico 0,1N.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la etapa de reducción a extracto b) se lleva a cabo a una temperatura de 18 °C a 25 °C.
6. Utilización de un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente obtenido mediante la implementación de las etapas a) y b) del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para una aplicación fitosanitaria que consiste en la obtención de una planta, o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.
7. Procedimiento de tratamiento fitosanitario de una planta, que comprende la aplicación de una composición que comprende un extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente obtenidas mediante la implementación de las etapas a) y b) del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, sobre dicha planta, consistiendo dicho tratamiento en la obtención de una planta, o el tratamiento preventivo o curativo de una planta contra un agente patógeno.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la composición es una composición acuosa que se aplica por pulverización foliar o infiltración.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** la concentración de extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente en la composición está comprendida entre 0,001 y 5 %, en relación con el peso seco del extracto.
10. Utilización de acuerdo con la reivindicación 6 o procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 9, **caracterizados por que** el extracto de hojas caducas de planta leñosa de tipo arborescente comprende menos del 45 %, de preferencia entre 5 % y 40 % en peso de polifenoles en relación con el peso seco del extracto.



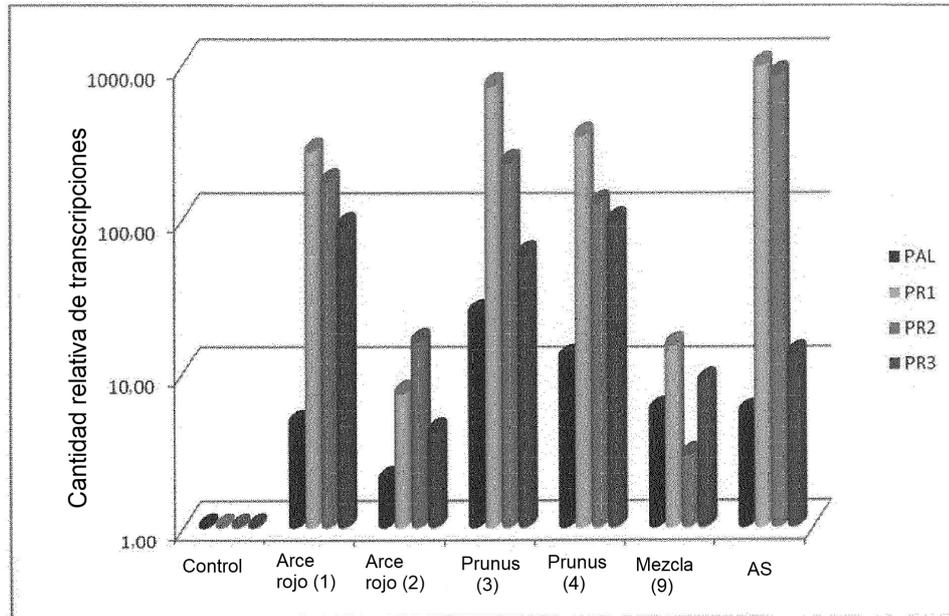
**Figura 1**



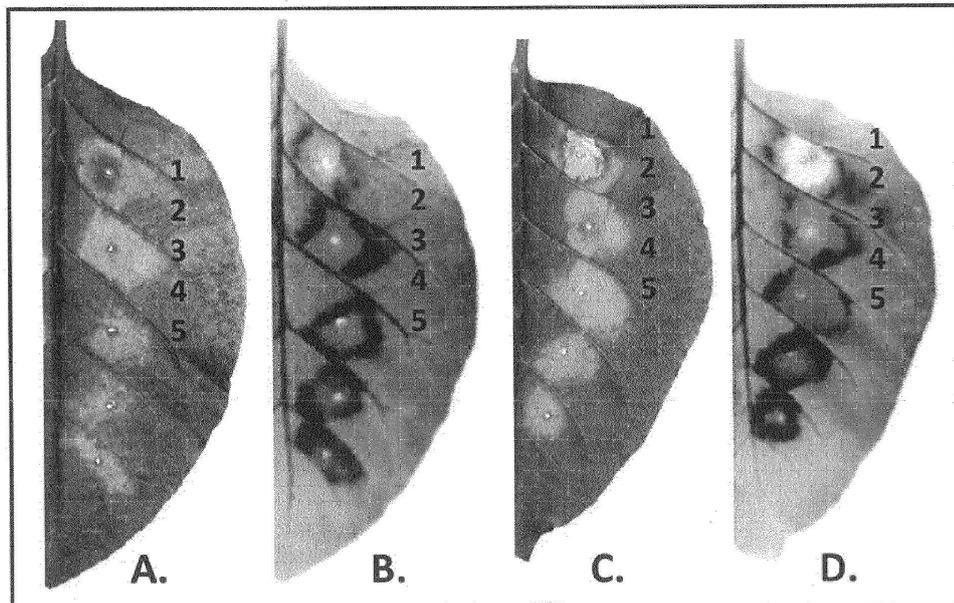
**Figura 2**



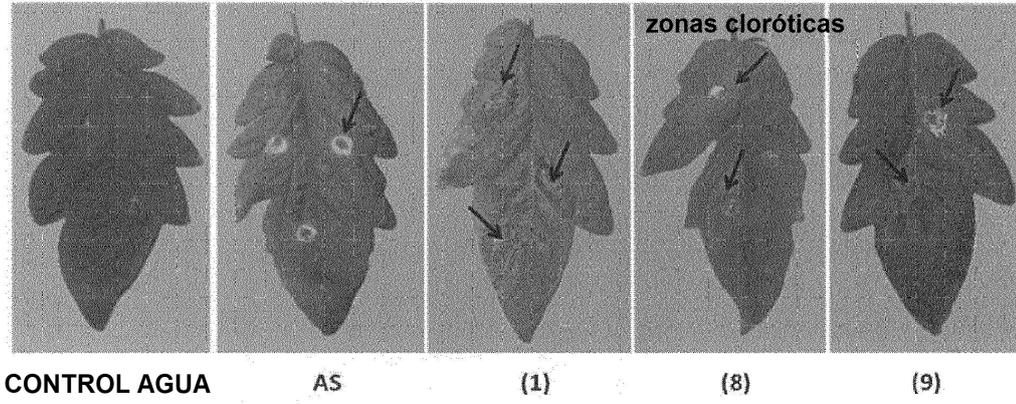
**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**