

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 638**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/36** (2006.01)

**A01P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2017 PCT/ES2017/070153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17158225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2017 E 17765908 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 3430905**

54 Título: **Uso de ácido (l)-piroglutámico para aumentar la tolerancia de plantas a condiciones de estrés osmótico**

30 Prioridad:

**17.03.2016 ES 201630317**

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

**08.03.2022**

73 Titular/es:

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

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid, ES y**

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JIMÉNEZ ARIAS, DAVID;**

**BORGES RODRÍGUEZ, ANDRÉS;**

**BOTO CASTRO, ALICIA;**

**VALDÉS GONZÁLEZ, FRANCISCO;**

**PÉREZ PÉREZ, JOSÉ ANTONIO y**

**LUIS JORGE, JUAN CRISTO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 898 638 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de ácido (l)-piroglutámico para aumentar la tolerancia de plantas a condiciones de estrés osmótico

5 La presente invención se refiere al uso de ácido (L)-piroglutámico para aumentar la tolerancia de plantas a condiciones de estrés osmótico provocadas por la dificultad para acceder al agua del medio, tales como las provocadas por el estrés salino o el déficit hídrico. En base a lo anterior, esta invención se puede englobar en el área de la aplicación de compuestos y sustancias para favorecer el desarrollo de plantas en las condiciones descritas de estrés osmótico.

10

**ESTADO DE LA TECNICA**

15

La falta de accesibilidad al agua por parte de las plantas es uno de los factores que influyen de manera más determinante en el descenso de productividad de los cultivos agrícolas. Esta falta de accesibilidad al agua puede ser debida tanto a condiciones de sequía meteorológica, agrícola o hidrológica, lo que en suma se refiere a un déficit hídrico en el medio, como a sequía fisiológica.

20

La sequía fisiológica ocurre cuando las sales solubles se encuentran en altas concentraciones en la solución del suelo, limitando la toma de agua por la planta debido al bajo potencial hídrico que se genera.

25

En cualquiera de las situaciones de sequía anteriormente descritas, se produce un estrés osmótico en las plantas, que tiene como consecuencia la generación de una respuesta fisiológica, bioquímica y molecular muy similar que afecta a su desarrollo (Sairam y Tyagi, 2004. *Current Science* 86(3), 407-421).

30

Es conocido que las plantas, y como estrategia de supervivencia ante estas situaciones de estrés, pueden ajustar su potencial osmótico generando un potencial hídrico menor que el de la solución del suelo, para poder acceder al agua presente en la misma (Munns y Tester, 2008. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681).

35

Es también conocido que la adaptación de las plantas a diferentes condiciones de estrés, puede estimularse por medio de compuestos químicos para intentar anular el efecto negativo sobre su desarrollo, así por ejemplo, en la patente ES2332494B1 se reivindica el uso de la menadiona, un derivado de la vitamina K, para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés osmótico producido por salinidad.

40

En relación al uso de aminoácidos para mejorar las condiciones de desarrollo de las plantas, es ampliamente conocido que se han utilizado mezclas de este tipo de moléculas orgánicas procedentes del hidrolizado de proteínas en Europa desde el año 1968 para: fertilizar el terreno, como plaguicidas, como herbicidas, como fungicidas y como reguladores de crecimiento mediante un efecto nutricional de los cultivos.

45

También existen documentos que refieren el uso de aminoácidos para aumentar la tolerancia a situaciones de baja disponibilidad de agua por sequía fisiológica. En este sentido, cabe destacar el trabajo de El-Samad *et al.* (2011. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:24, 5692-5699) que refiere el uso de aminoácidos no cíclicos como la fenilalanina o la prolina; o el documento de solicitud de patente US2009054241A1, en el que se utiliza un derivado de la prolina, concretamente la hidroxiprolina. Sin embargo, en cualquiera de estos casos, la efectividad en relación con el aumento de la tolerancia es todavía limitada.

50

El documento WO 2007/056409 A2 describe el uso de ácido piroglutámico para aumentar el rendimiento de una planta objetivo mediante aplicación foliar o radicular y el uso de una mezcla de ácido (D) y (L) - piroglutámico promueve la resistencia de las plantas al estrés.

55

P. V. Devi Prasad y col. (1996. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 32, 47-50) describe el uso de hidroxiprolina para aumentar la tolerancia de las plantas de papa contra el estrés salino, mientras que el suministro exógeno de prolina o hidroxiprolina a una planta causa algún tipo de estrés por en sí, ambos compuestos alivian el estrés salino.

60

El documento WO 2007/104489 A1 describe el uso de 4-hidroxiprolina para aumentar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico que incluyen sequía y salinidad del suelo.

En base a lo anterior, se considera de interés la búsqueda de nuevos aminoácidos, que al ser aplicados a las plantas, sean capaces de estimular sus mecanismos naturales para aumentar la tolerancia a condiciones de estrés osmótico.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

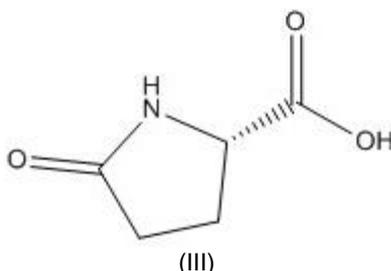
5 Se considera que el problema que resuelve la invención es la selección de moléculas orgánicas, concretamente aminoácidos, que al ser aplicados a plantas, permitan aumentar su tolerancia a las condiciones de estrés osmótico o hídrico y por ende no vean mermada su productividad en relación con plantas no sometidas a dicho estrés.

10 Los inventores han observado que algunos aminoácidos, concretamente los aminoácidos cíclicos no prolínicos de fórmula general (III), son capaces de estimular los mecanismos naturales de las plantas que les permiten superar condiciones de estrés osmótico, aumentando de forma significativa su producción de biomasa en estas condiciones adversas y acercándola a los valores de plantas control no sometidas a dicho estrés (ver ejemplo 2). También han observado el efecto del estímulo de dichos aminoácidos en el uso del agua de las plantas tratadas con ellos en situación de estrés osmótico provocado por déficit hídrico (ver ejemplo 5). Los inventores también han comprobado que el uso de otros aminoácidos distintos, utilizados en las mismas condiciones de experimentación, no consiguen una recuperación de la producción de biomasa con respecto a un control o si lo consiguen es en menor medida (ver ejemplos 1 a 5).

20 Las ventajas del uso de los aminoácidos cíclicos no prolínicos de fórmula general (III) que se incluyen en el ámbito de la presente invención son:

- tienen un efecto claramente superior al que han mostrado otros aminoácidos descritos en el estado de la técnica, como por ejemplo la alanina o la hidroxiprolina, en la mejora de la tolerancia a condiciones de estrés osmótico;
- 25 -se trata de aminoácidos naturales o derivados biodegradables que minimizan el impacto ambiental; y
- posibilitan un manejo seguro por parte de los operarios durante la aplicación.

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (III).



30 El compuesto de fórmula (III) presenta un centro quiral que da lugar a estereoisómeros. La presente invención describe cada uno de esos estereoisómeros y sus mezclas.

35 En el ámbito de la invención también se incluyen los derivados hidrosolubles del aminoácido de la invención.

40 Las "condiciones de estrés osmótico" están provocadas por una dificultad en el acceso al agua disponible en el medio que alberga una planta y que el experto en el estado de la técnica conoce como un elemento común a circunstancias de sequía meteorológica, agrícola, hidrológica (situaciones de déficit hídrico) o fisiológica (situaciones de salinidad), y que tiene efectos similares sobre la activación de mecanismos de defensa de la planta y sobre el descenso de su desarrollo (Sairam y Tyagi, 2004. *Current Science* 86(3), 407-421).

45 Los resultados incluidos en este documento (ver ejemplo 2), han demostrado que el aminoácido de la invención es efectivo para aumentar la tolerancia en condiciones de estrés osmótico, como las que por ejemplo se provocan en condiciones de salinidad, y, también, en condiciones de estrés osmótico provocado por déficit hídrico (ver ejemplo 5).

50 En otra realización la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (III) tal y como se ha definido anteriormente para aumentar la tolerancia al estrés osmótico producido por un déficit hídrico.

55 En otra realización la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (III) tal y como se ha definido anteriormente para aumentar la tolerancia al estrés osmótico producido por salinidad.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los compuestos de la presente invención pueden existir como varios diastereoisómeros y/o varios isómeros ópticos. Los diastereoisómeros se pueden separar por

5 técnicas convencionales tales como cromatografía o cristalización fraccionada. Los isómeros ópticos pueden ser resueltos por técnicas convencionales de resolución óptica para dar isómeros ópticamente puros. Esta resolución puede llevarse a cabo en cualquiera de los productos intermedios de un compuesto de fórmula (III). Los isómeros ópticamente puros también se pueden obtener individualmente utilizando síntesis enantioselectiva. La presente invención cubre todos los isómeros individuales así como las mezclas de los mismos (por ejemplo mezclas racémicas o mezclas de diastereoisómeros), tanto obtenido por síntesis como por mezcla física de los mismos.

10 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para mejorar la tolerancia a condiciones de estrés osmótico, en adelante método de la invención, que comprende administrar a la planta una dosis eficaz de al menos un compuesto de fórmula (III) tal y como se ha definido anteriormente.

15 Aunque el experto en el estado de la técnica conocerá que es posible utilizar el aminoácido de la invención en cualquier soporte que favorezca su penetrabilidad en el material vegetal, preferentemente, el método de la invención comprende utilizar el compuesto de fórmula (III) en solución acuosa.

El método de la invención, también comprende utilizar el aminoácido de la invención junto con diversos vehículos y agentes que faciliten su conservación, manejo y aplicación.

20 En otra realización la invención se refiere al método definido anteriormente donde el compuesto de fórmula (III) se puede utilizar conjuntamente con otro ingrediente activo. Ejemplos de ingrediente activo adicional son, a título indicativo y no limitativo, nematocidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, reguladores del crecimiento, fertilizantes, sinérgicos, fertilizantes y acondicionadores del suelo, y preferiblemente donde el ingrediente activo adicional se selecciona de nematocida, insecticida, acaricida, fungicida, bactericida y herbicida.

25 Tal y como se ha explicado con anterioridad, en la descripción del uso del aminoácido de la invención (compuesto de fórmula (III)), y de forma coherente, el método de la invención es de aplicación para aumentar la tolerancia al estrés osmótico provocado por un déficit hídrico o por salinidad.

30 La eficacia del método de la invención queda de manifiesto al comprobarse la reducción de los efectos negativos que ocasiona el estrés osmótico, tras la aplicación del aminoácido de la invención en plantas tratadas con dosis moderadas de NaCl (50 mM) (Attia *et al.*, 2008. *Physiologia Plantarum* 132: 293–305), que aumenta de forma evidente la producción de biomasa hasta valores cercanos a los obtenidos por plantas control sin estrés osmótico. Se comprueba además que la aplicación del aminoácido de la invención, ocasiona una respuesta de naturaleza sistémica y en consecuencia, sus efectos se extienden al resto de la planta desde las raíces.

35 En las definiciones anteriores, el término C<sub>1-4</sub>alquilo, como grupo o parte de un grupo, significa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de C; e incluye los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *tert*-butilo.

40 En el presente documento por “planta” se entiende indistintamente tanto a un individuo como a una pluralidad de los mismos, ya sea considerada en su totalidad, es decir, incluyendo parte aérea y parte radical con independencia de su estadio de desarrollo, o considerada parcialmente, es decir, cualquier porción de la misma que pueda utilizarse como material vegetal de reproducción o multiplicación. Por “material vegetal de reproducción” se entiende tanto la semilla, como el fruto que la comprende.

45 Por “material vegetal de multiplicación” se entiende cualquier fragmento de una planta a partir del cual se pueda obtener al menos un nuevo ejemplar y que se utiliza normalmente como base en técnicas de propagación, como por ejemplo, propagación por acodos, esquejes, estacas, estolones, yemas, rizomas, tubérculos, bulbos o cormos; propagación por injertos; micropropagación; o propagación por cultivo *in-vitro*.

50 Como el experto en el estado de la técnica conoce, en función del estadio de desarrollo de la planta o del tipo de material vegetal, son posibles diferentes técnicas de aplicación de productos fitosanitarios. Así por ejemplo, para plantas ya establecidas en campo, para aplicación en la parte aérea las técnicas más adecuadas pueden comprender la pulverización del aminoácido de la invención sobre las hojas, o la inyección en el tallo, mientras que para la parte radicular, la aplicación puede hacerse por incorporación al agua de riego o al sustrato que alberga la planta.

55 Sin embargo, para material vegetal en estadios previos a su puesta en campo, adicionalmente a las técnicas anteriores, también es posible la inmersión de la parte radical en una solución que comprende el aminoácido de la invención o la inmersión total del material vegetal, ya sea de reproducción o multiplicación. Preferentemente, la aplicación es por inmersión de la parte radical.

60

Ejemplos de cultivo en los que se puede aplicar el método de la invención, son cualquier cultivo de monocotiledóneas o dicotiledóneas, a título indicativo y no limitativo, cultivos de cereales, de frutales, de legumbres, de hortalizas o de plantas ornamentales. En particular, un ejemplo de cultivo es el tomate.

5 En otra realización la invención se refiere al método tal y como se ha definido anteriormente, que comprende la aplicación en solución acuosa del compuesto de fórmula (III) por inmersión del sistema radicular.

10 En otra realización la invención se refiere al método tal y como se ha definido anteriormente, que comprende la aplicación en solución acuosa del compuesto de fórmula (III) por inmersión de las semillas.

15 La “dosis eficaz” puede aumentar o disminuir opcionalmente según el aminoácido de la invención seleccionado, del material vegetal, de su estadio de desarrollo, del tipo de formulación, del tiempo, del lugar, de la frecuencia de aplicación y del grado de estrés osmótico.

En una realización particular del método de la invención, el aminoácido de la invención se utiliza en un rango de concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$  a 3 M.

20 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, 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 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Representa un esquema donde se muestran las condiciones de cultivo durante el ensayo.

30 **Fig. 2.** Representa el peso de plantas de tomate tras 7 días de crecimiento en las diferentes soluciones. \* Diferencias significativas con respecto al grupo testigo con el mismo tratamiento con un  $p$  valor  $<0,05$ ; \*\* Diferencias significativas con respecto al grupo testigo con el mismo tratamiento con un  $p$  valor  $<0,01$ .

35 **Fig. 3.** Representa el contenido hídrico relativo de los diferentes tratamientos tras 10 días de ensayo. \*\* Diferencias significativas con respecto a su control con un  $p$  valor  $<0,01$ .

**Fig. 4.** Representa las medidas de fotosíntesis neta. \*\* Diferencias significativas con respecto al testigo sequía con un  $p$  valor  $<0,01$

40 **Fig. 5.** Representa la eficiencia en el uso del agua (Evapotranspiración/Fotosíntesis neta. Evapotranspiración =  $\mu\text{mol H}_2\text{O s}^{-1}$ ; Fotosíntesis neta =  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . \*\* Diferencias significativas con respecto al testigo sequía con un  $p$  valor  $<0,01$

## EJEMPLOS

45 Las condiciones que se describen a continuación se utilizaron como base para todos los ejemplos que se incluyen a continuación. Las condiciones de cultivo, tales como la solución nutritiva y el sustrato empleado han sido optimizadas para la realización de este tipo de experimentos. Del mismo modo la dosis de NaCl utilizada, ha sido optimizada para este tipo de experimentos puesto que 50 mM permite evaluar si un tratamiento es capaz de aumentar la tolerancia a la salinidad (Jiménez-Arias *et al.*, 2015. *Environmental and*  
50 *Experimental Botany* 120,23-30).

55 Para el cultivo de las plantas de *Arabidopsis thaliana* necesarias para los ensayos se empleó un sistema de cultivo hidropónico. Este sistema se estableció en cubetas de hidroponía con 1,9 L de capacidad (Araponics®) donde se hicieron crecer 18 plantas por recipiente. Una mezcla de arena de río de dos granulometrías distintas fue usada como sustrato físico. Las semillas fueron sembradas en contenedores de semillas (*seed-holders*), que se depositaron durante una semana en un pequeño invernadero, consistente en una bandeja de polietileno de alta densidad con arena de río (arena silíceo lavada, con granulometría media) con agua destilada estéril cubierta con una lámina plástica transparente, que fue depositado en una cámara de cultivo a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 horas de luz ( $100\text{-}110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR) y con un 100% de humedad relativa. Tras una semana, los *seed-holders* con las plántulas fueron transferidas a las cubetas de hidroponía en las mismas condiciones de fotoperiodo e intensidad lumínica, pero con un 60-70% de humedad relativa. Las plántulas se mantuvieron sin aireación durante la primera semana, a partir de ella la solución (Tabla 1) fue generosamente aireada mediante bombas de aireación y fue renovada  
60 cada 7 días.

65

Tabla 1. Solución hidropónica utilizada en los experimentos

Macronutrientes (mM)	Micronutrientes (µM)
KNO <sub>3</sub> (1,25)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (50)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5)	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (10)
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (0,75)	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (2)
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O (0,75)	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O (1,5)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O (0,075)
	Sequestrene® (44,8)

**Ejemplo 1. Efecto de la alanina sobre la respuesta de *A. thaliana* al estrés salino provocado por la adición de NaCl**

5 Para comprobar si la estructura fundamental de los aminoácidos produce efectos protectores frente al estrés salino, se utilizó un aminoácido sencillo como es la alanina.

10 De esta manera, plantas de 21 días fueron tratadas durante 24 horas en solución nutritiva enriquecida con una concentración de 2,5 mM de alanina. Posteriormente las plantas fueron depositadas en solución nutritiva normal durante 24 horas y posteriormente crecieron durante 7 días en solución nutritiva con o sin un aporte de 50 mM de NaCl. Este experimento se repitió dos veces, empleando 12 plantas por experimento, siendo el valor que se muestra en la tabla 2 la media de 24 plantas para cada una de las condiciones.

15 Posteriormente se procedió a determinar el peso húmedo de la parte aérea de las plantas.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los resultados del aminoácido alanina sobre el desarrollo de las plantas.

20 Tabla 2: Efectos de la alanina sobre el crecimiento en condiciones óptimas y salinas.

	Sin tratar	Alanina	Sal	Alanina-sal
Peso Fresco (mg planta)	130±16	142±8	52±8**	36±2**
TCR	0,53	0,58	0,21**	0,11**

25 Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes con 24 plantas en total. Los \*\* muestran diferencias significativas con respecto al grupo control con un p<0.01. TCR: Tasa de crecimiento relativo (T.C.R.= (ln Ps2- ln Ps1) / (T2-T1); siendo ln logaritmo neperiano; Ps peso seco y T tiempo).

Como se puede observar, la estructura representada por el aminoácido alanina no fue capaz de promover el crecimiento, ni de aumentar la tolerancia a la salinidad, es más, parece que perjudicó a las plantas ante una misma dosis de sal.

30 **Ejemplo 2. Efecto del ácido piroglutámico o del ácido pipercolínico sobre la respuesta de *A. thaliana* al estrés salino provocado por la adición de NaCl**

35 Plantas de 21 días fueron tratadas durante 24 horas en solución nutritiva enriquecida con una concentración de 2,5 mM de ácido piroglutámico o el ácido pipercolínico. Posteriormente las plantas fueron depositadas en solución nutritiva normal durante 24 horas y posteriormente crecieron durante 7 días en solución nutritiva con o sin un aporte de 50 mM de NaCl. Este experimento se repitió dos veces, empleando 12 plantas por experimento, siendo el valor que se muestra en la tabla 2 la media de 24 plantas para cada una de las condiciones.

40 El peso fresco de los ejemplares se muestra en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3: Efectos de ácido piroglutámico y Ac. Pipercolínico sobre el crecimiento en condiciones óptimas y salinas

	Sin tratar	Ácido piroglutámico	Ácido pipercolínico	Sal	Ácido piroglutámico	Ácido pipercolínico-sal
Peso Fresco (mg planta)	158,3±20	183,9±15	145,9±22	90±18**	170,4±15	133,9±21
TCR	0,56	0,56	0,46	0,23	0,49	0,45

45 Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes con 24 plantas en total. Los \*\* muestran diferencias significativas con respecto al grupo control con un p<0.01. TCR: Tasa de crecimiento relativo (T.C.R.= (ln Ps2- ln Ps1) / (T2-T1); siendo ln logaritmo neperiano; Ps peso seco y T tiempo).

5 Como se puede observar, la sal nuevamente disminuyó considerablemente el crecimiento, como muestra el peso fresco y la tasa de crecimiento relativo de la planta, tras una semana de estar sometido a estrés salino. Esto no ocurrió de manera significativa en aquellas plantas que fueron tratadas previamente con 2,5 mM de ácido piroglutámico o con 2,5 mM de ácido pipercolínico, por lo que queda probado su efecto sobre el aumento de tolerancia frente al estrés salino.

**Ejemplo 3. Comparación del efecto del ácido piroglutámico, del ácido pipercolínico o de la hidroxiprolina sobre la respuesta de *A. thaliana* al estrés salino provocado por la adición de NaCl**

10 Con el fin de demostrar que la utilización de estos compuestos es más efectiva que el uso de otros aminoácidos ya descritos, como es el caso de la hidroxiprolina (US20090054241 A1), se comparó el efecto de un tratamiento con dosis de 2,5 mM de ácido piroglutámico o de ácido pipercolínico, o de hidroxiprolina.

15 Las plantas fueron depositadas en solución nutritiva enriquecida con alguno de los compuestos anteriormente señalados durante 24 horas y posteriormente crecieron durante 7 días en solución nutritiva con un aporte de 50 mM de NaCl. Como control se utilizaron las plantas crecidas sobre solución nutritiva y NaCl. Este experimento se repitió dos veces, empleando 12 plantas por experimento, siendo el valor que se muestra en la tabla 2 la media de 24 plantas para cada una de las condiciones.

20 Con el fin de ilustrar la defensa frente al estrés salino se emplean dos medidas. Se muestra primero los valores para el índice de sensibilidad (S.I) descrito por Saadallah *et al.* (2001, *Agronomie* 21, 627–634). Cuanto mayor sea el valor negativo del S.I. mayor es el efecto negativo de la salinidad sobre la planta. La segunda medida, es un porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento relativa de la planta sometida a condiciones de estrés salino.

25 En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los resultados.

Tabla 4: Efectos de ácido piroglutámico, ácido pipercolínico o la hidroxiprolina sobre el índice de sensibilidad

	Control	Ácido piroglutámico	Ácido pipercolínico	Hidroxiprolina
S.I	-0,70	-0,1**	-0,07**	-0,25**
% reducción TCR	62,00	10,22**	8,12**	24,34**

30 (S.I=PSs-PSc/PSc; siendo Peso seco plantas en condiciones salinas; Peso seco en condiciones control) y el porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento relativo (% Red. T.C.R=(TCRs-TCRc/TCRc)x100; siendo TCRs tasa de crecimiento de plantas crecidas en condiciones salinas; TCRc tasa de crecimiento de plantas crecidas en condiciones control). Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes con 24 plantas en total. Los \*\* muestran diferencias significativas con respecto al grupo control con un  $p < 0.01$ .

40 Como se puede observar, la utilización de cualquiera de los dos compuestos aumentó considerablemente la tolerancia con respecto a la hidroxiprolina, por lo que el empleo de estos compuestos a la misma dosis fue más beneficioso para el cultivo de la planta en condiciones de estrés salino.

**Ejemplo 4. Comparación del efecto del ácido piroglutámico, del ácido pipercolínico o de la hidroxiprolina sobre la respuesta de *Solanum lycopersicum* (tomate) al estrés salino provocado por la adición de NaCl**

45 Este ensayo permite demostrar que la utilización de los compuestos de la invención es más efectiva que el uso de otros aminoácidos ya descritos, como es el caso de la hidroxiprolina antes comentada, para cultivos de plantas comerciales. Como ejemplo se usó tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Pera real. El experimento se inició con tomates de tres semanas de edad, que se colocaron en cubetas de hidroponía, con 4 L de una mezcla de solución nutritiva (Tabla 1) y agua destilada en una proporción de 1:1.

50 Las cubetas fueron colocadas en una cámara de cultivo a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , con una humedad relativa del 60 -70%, utilizando un fotoperiodo de 16 horas de luz ( $100-110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR). Desde el primer día la solución fue generosamente aireada por bombas de aire (30 min al día). Las plantas se mantuvieron durante dos días con esta proporción de solución y agua destilada, y luego se retiraron del medio y se colocaron, bajo las mismas condiciones ambientales, en envases plásticos durante 24 horas con los distintos tratamientos en agua destilada (tabla 5):

Tabla 5: Tratamientos empleados en el ensayo

Tratamiento
Testigo
Piroglutámico 2,5 mM
Pipecolínico 2,5 mM
Hidroxiprolina (OH-Pro) a 2,5 mM
Prolina a 2,5 mM

- 5 Tras 24 horas, las plantas fueron nuevamente introducidas en las cubetas con la misma proporción de agua destilada/solución nutritiva antes mencionada y se mantuvieron así durante 48 horas. Entonces la solución nutritiva fue retirada de todas las cubetas y cambiada por 4 litros de una nueva solución con cada una de las condiciones a estudio (Figura 1) manteniéndose las plantas en estas condiciones durante 7 días (la cantidad de agua de cada una de las cubetas fue controlada cada dos días y en caso de necesitar se corregía con una solución de NaCl en agua destilada con la concentración establecida para la cubeta.
- 10 A continuación se comparó el crecimiento de las plantas tratadas y las no tratadas, en condiciones normales y en condiciones de salinidad. Para el análisis estadístico, los datos recogidos se sometieron a la prueba de normalidad del test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors. Para comprobar la homocedasticidad de los datos se empleó el test de Levene. Como los datos se comportaron siguiendo una distribución normal sus medias se compararon mediante one-way ANOVA y las diferencias significativas fueron calculadas utilizando el test post hoc de Bonferroni. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático SSPS versión 20 para Windows.
- 15
- 20 Como indica la figura 2, bajo condiciones control tan sólo las plantas tratadas con hidroxiprolina muestran un crecimiento significativamente diferente al del testigo. Estas muestran un descenso en su crecimiento (del 35%), por lo que podemos establecer que el tratamiento radicular con hidroxiprolina en nuestras condiciones ha sido perjudicial para la planta.
- 25 En cuanto al crecimiento en condiciones salinas, se puede observar como las plantas del grupo testigo disminuyen su crecimiento un 32%. Esta disminución se incrementa en las plantas tratadas con prolina mediante un tratamiento radicular de 24 horas (42% con respecto al crecimiento en la solución control) aunque no existen diferencias significativas cuando se compara con el testigo en condiciones salinas, por su parte la hidroxiprolina sólo disminuye un 17% su crecimiento. En cuanto a las plantas tratadas con ácido pipecolínico y piroglutámico el crecimiento disminuye tan sólo un 7 y un 9% respectivamente, siendo este valor de peso fresco muy significativo con respecto a su contrapartida en el grupo control. Esto supone un aumento de tolerancia del 72% (piroglutámico) y del 78% (pipecolínico) si comparamos con el control, y si comparamos con el tratamiento de prolina es del 78% (piroglutámico) y del 83% (pipecolínico).
- 30 **Ejemplo 5. Comparación del efecto del ácido piroglutámico, del ácido pipecolínico o de la hidroxiprolina sobre la respuesta de *Solanum lycopersicum* (tomate) a la sequía en condiciones de invernadero (déficit hídrico).**
- 35 El cultivo utilizado fue el tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad "Gransol" capa negra. El experimento fue realizado en un invernadero de cristal con cuatro mesas de 10 metros de largo por 2 de ancho. Se utilizó riego por goteo, suministrado por goteros autocompensados para controlar el flujo de agua en todo momento.
- 40 Se transplantaron plantas de semillero con cinco semanas de edad a macetas de 2 litros de capacidad utilizando una mezcla de turba y arena de río para facilitar el drenaje. En total se utilizaron 120 plantas de tomates. Tras el trasplante, se realizaron cuatro tratamientos (espaciados cada 15 días) a 40 plantas, añadiendo a cada maceta 50 ml de una concentración 2,5 mM de Piroglutámico. Otras 40 plantas fueron tratadas mediante aplicaciones radiculares utilizando 2,5 mM de ácido pipecolínico. El resto de plantas distribuidas aleatoriamente por todo el invernadero, fueron tratadas con agua destilada a modo de control. Al finalizar los cuatro tratamientos comenzó el ensayo de sequía, que se realizó quitando el gotero a 20 plantas elegidas aleatoriamente para cada uno de los tratamientos. Las plantas fueron privadas de agua durante 10 días.
- 45

El contenido hídrico relativo de la hoja se estimó a los 10 días de sequía para cada uno de los tratamientos, en condiciones control y condiciones de sequía, utilizando 15 hojas. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{C.H.R (\%)} = [(P_f - P_s) / (P_t - P_s)] \times 100$$

- 5 Siendo  $P_f$ : peso fresco;  $P_s$ : peso seco;  $P_t$ : peso de turgor. El CHR es la medida más empleada para estimar el posible déficit de agua que tenga una hoja de planta.

- 10 Por otra parte, se estimó la fotosíntesis con el sistema "Lc-pro sd" (ADC Bioscientific). Para ello las hojas de tomate fueron estimuladas con una fuente de luz a  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , siendo esta intensidad de luz previamente estimada para lograr el máximo de fotosíntesis en nuestro cultivo y condiciones. Con ello se determinaron los parámetros de Fotosíntesis neta (A) y evapotranspiración (E), calculándose con ellos la eficiencia en el uso del agua (A/E) tal como describen Lambers *et al.* (2008. *Plant Physiological Ecology. 2nd edition. Springer, New York*). Las medidas fueron tomadas a los 10 días de ensayo de seis plantas para cada uno de los tratamientos.

- 15 Los datos de las diferentes variables fueron sometidos a la prueba de normalidad usando el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors. Para comprobar la homocedasticidad de los datos se empleó el test de Levene. Como los datos se comportaron siguiendo una distribución normal sus medias se compararon mediante one-way ANOVA y las diferencias significativas fueron calculadas utilizando el test post hoc de Bonferroni. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático SSPS versión 20 para Windows.

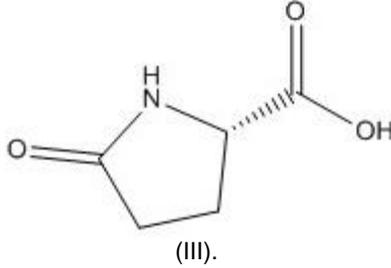
- 20 Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Figura 3, donde puede observarse cómo tras diez días de sequía las plantas del testigo disminuyen significativamente su contenido hídrico relativo (un 10,2%), mientras que las plantas tratadas con cuatro tratamientos a 2,5 mM de piroglutámico no presentaron esta disminución. Las plantas tratadas con ácido pipercolínico si presentaron una disminución con respecto a su control, pero esta fue inferior a la ocurrida en las plantas testigo (5,1%); sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas con respecto a su control.

Estos datos fueron corroborados por las medidas de intercambio gaseoso. Como muestra la figura 4, las plantas tratadas con piroglutámico o pipercolínico tuvieron una fotosíntesis neta superior a las plantas del testigo sequía.

- 30 El análisis de las medidas de fotosíntesis neta y de evapotranspiración reveló que la eficiencia en el uso del agua fue significativamente mayor para las plantas tratadas (Figura 5). Esta eficiencia resultó casi el doble en las plantas tratadas que en el testigo sequía.

**REIVINDICACIONES**

1.- Método para aumentar la tolerancia de plantas a condiciones de estrés osmótico, caracterizado por que comprende administrar a la planta una dosis eficaz de al menos un compuesto de fórmula (III):



5

2.- El método según la reivindicación 1, caracterizado por que el compuesto de fórmula (III) se utiliza en solución acuosa.

10

3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que adicionalmente compuesto de fórmula (III) se utiliza un ingrediente activo que se selecciona un nematocida, insecticida, acaricida, fungicida, bactericida y herbicida.

15

4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el estrés osmótico está producido por un déficit hídrico o por salinidad.

5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la aplicación del compuesto de fórmula (III) se lleva a cabo utilizando una técnica seleccionada de pulverización, inyección, riego, inmersión y aplicación en sustrato.

20

6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la aplicación se hace por inmersión al sistema radicular.

25

7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la aplicación se hace por inmersión de semillas.



Figura 1

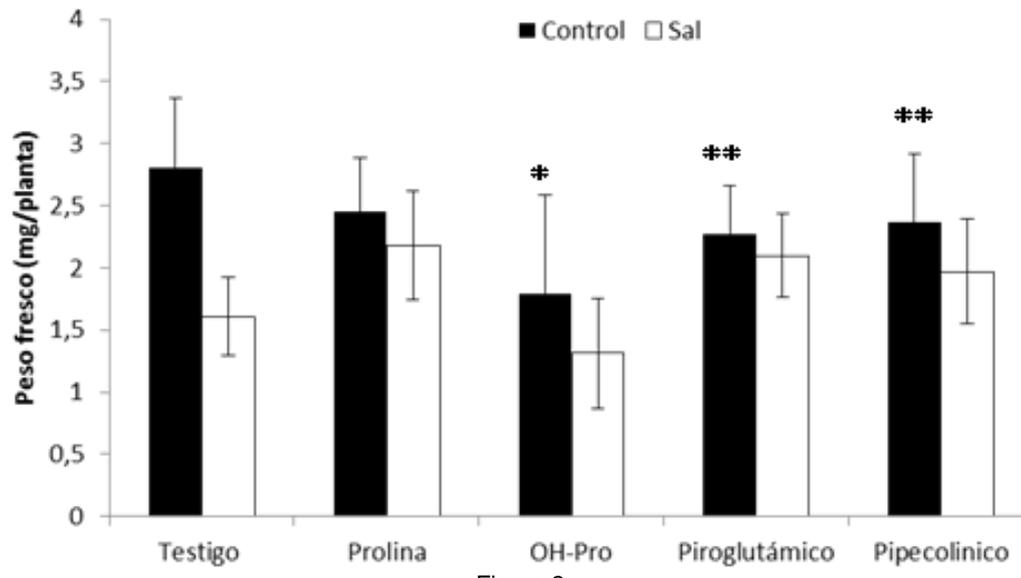


Figura 2

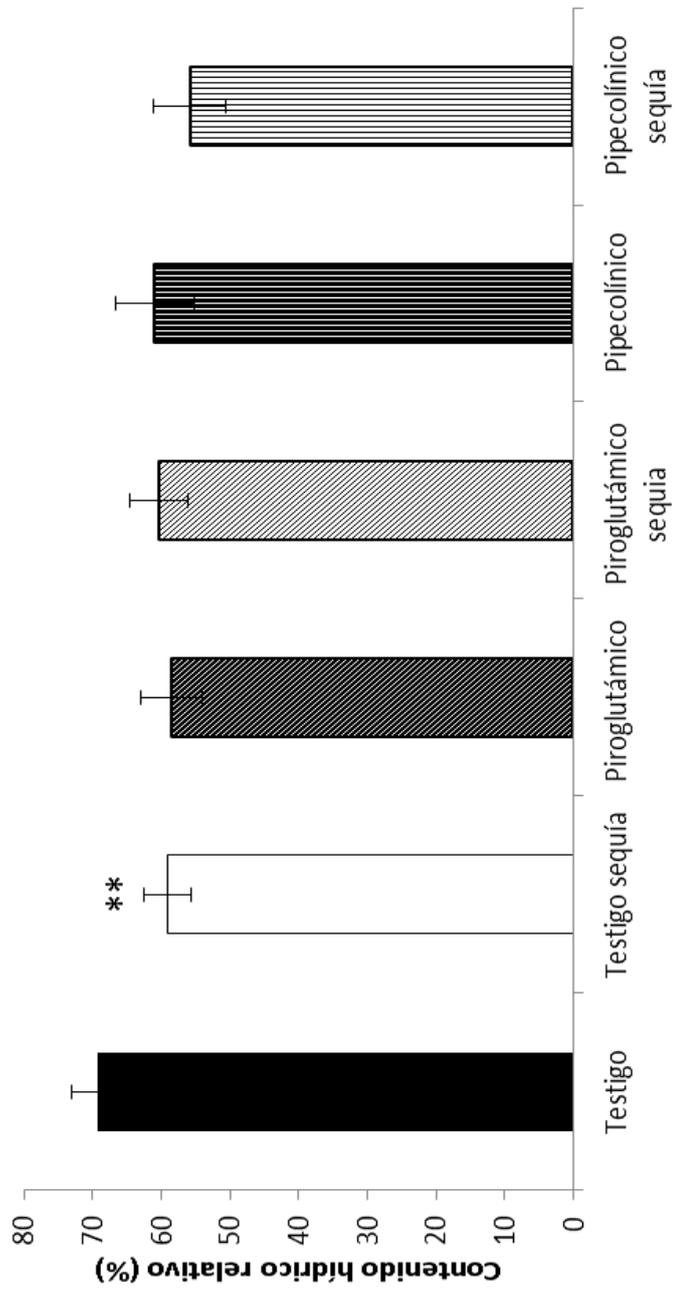


Figura 3

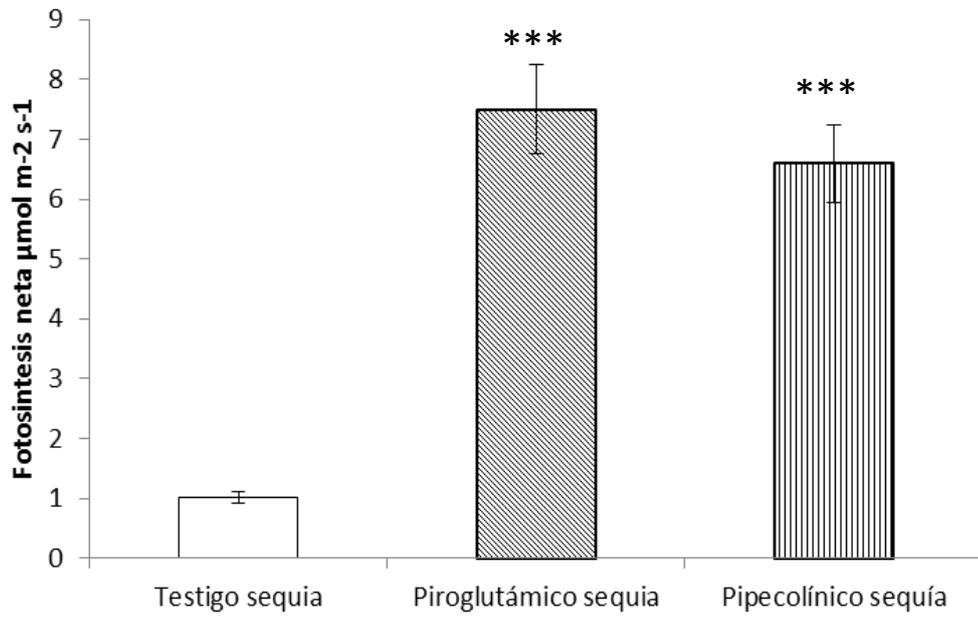


Figura 4

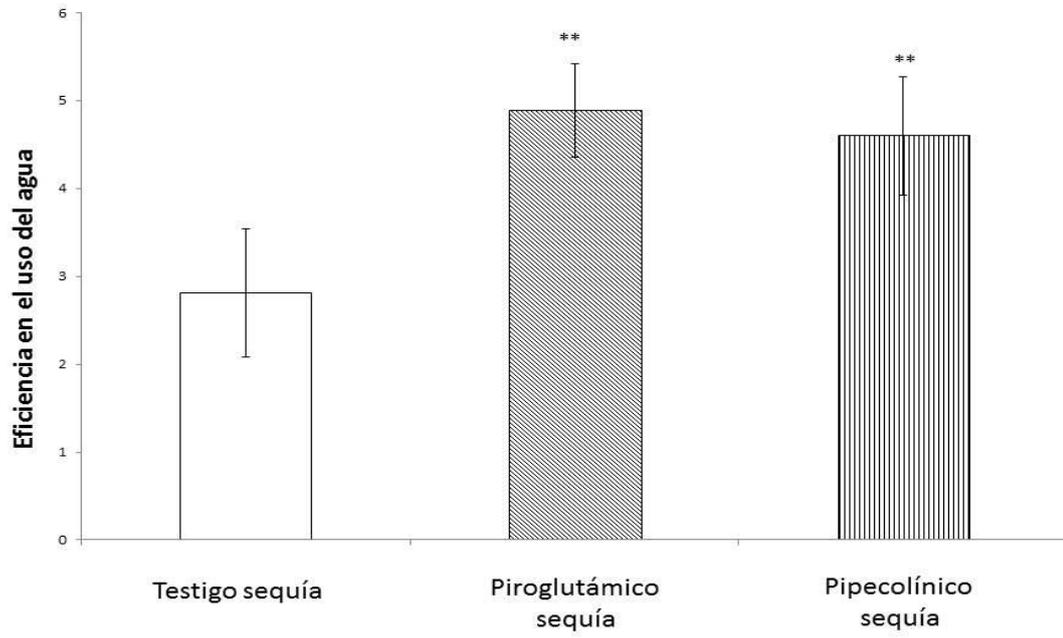


Figura 5