

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 785**

21 Número de solicitud: 202131206

51 Int. Cl.:

A01H 3/00

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.12.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.06.2023

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)**

**CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ DE LARRINOA GANADO, Naia;
LOPEZ LLORCA, Luis Vicente y
LOPEZ MOYA, Federico**

54 Título: **USO DEL QUITOSANO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA PLANTA PLATANERA DEL GÉNERO *MUSA***

57 Resumen:

Metodología mediante el uso del quitosano, un biopolímero natural, para modificar la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) procedentes de plantas de platanera. Mediante este método se activa el metabolismo de COVs que defienden a la planta frente a diversos estreses, y que promueven su crecimiento, por lo que presenta una potencial utilidad en la agricultura, sustituyendo a los fertilizantes químicos y los fitosanitarios tóxicos. Esta metodología es, por tanto, susceptible de ser explotada industrial y comercialmente.

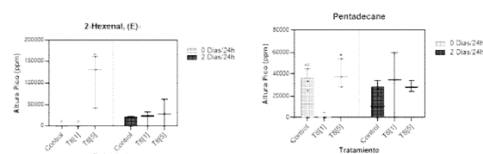


FIG. 1

DESCRIPCIÓN

**USO DEL QUITOSANO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA PLANTA PLATANERA DEL GÉNERO *MUSA***

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención se encuadra en el campo general de la agrobiotecnología y, en particular se refiere al uso y aplicación del quitosano para modificar la expresión y producción de compuestos orgánicos volátiles de plantas de platanera del género *Musa*, como, por ejemplo, la planta platanera *Musa acuminata* o *Musa balbisiana*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El abuso de pesticidas y fertilizantes genera contaminación ambiental, eutrofización y pérdida de biodiversidad. Por ello, actualmente se está fomentando el uso de aditivos orgánicos agrícolas que generen un menor impacto ambiental. El quitosano es un biopolímero ecológico, con baja toxicidad e impacto ambiental, y con aplicaciones interesantes en el ámbito de la agricultura [1]. En particular, estimula las defensas de las plantas y mejora su crecimiento [2], [3]. El efecto promotor del quitosano puede atribuirse a su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias, de hongos fitopatógenos y micoparásitos, afectando a la germinación y a la morfología de las hifas [2], [4], [5].

25 El quitosano, es un biopolímero natural, que se extrae mediante la desacetilación parcial de la quitina, siendo su fuente principal, son los exoesqueletos de crustáceos y moluscos, productos provenientes de los desechos de la industria marisquera.

30 Las características del quitosano le confieren un papel de gran importancia en una amplia gama de sectores industriales con aplicaciones médicas, biotecnológicas y agrícolas, por dar algunos ejemplos importantes [5], [6].

Por otro lado, *Musa acuminata* Colla es una especie silvestre de platanera nativa del sudeste asiático [7]. *Musa acuminata*, es una monocotiledónea perteneciente a la familia Musaceae, con tres géneros, *Musa*, *Ensete* y *Musella*, de los cuales *Musa* está

35

representado por 65 especies [7]. La mayoría de los plátanos comestibles del mundo están incluidos dentro del género *Musa*. Las variedades comerciales de plataneras se originan de la hibridación entre dos especies de plataneras silvestres, *M. acuminata* y *M. balbisiana* [8].

- 5 Las plataneras (*Musa* spp.) son un cultivo tropical y subtropical, con valores económicos y nutricionales clave, fundamentales para la seguridad alimentaria mundial. También se cultivan las plataneras con fines ornamentales y para fibra [8]. Clasificada como la cuarta en términos de producción de fruta en los países en desarrollo, la platanera (*Musa* spp.) se cultiva en 130 países, ocupando más de 10,5 millones de hectáreas en todo el mundo [9].

10

Por otro lado, los compuestos orgánicos volátiles (COV) son moléculas cuya presión de vapor es de al menos 0,01 kPa a 20 °C [10], y actúan como mediadores fundamentales en la comunicación de las plantas [11]. Los COVs se producen en diversos tejidos vegetales [34] y se difunden por el aire, influyendo directa e indirectamente en otras plantas, insectos, herbívoros e incluso seres humanos [12]. Los COVs permiten una rápida comunicación entre plantas y pueden activar su sistema de defensa frente a diversos estreses [13]. Los COVs producidos por plantas, actúan como mediadores en las interacciones entre las plantas y los organismos que las rodean. Por ello, sus potenciales aplicaciones en agricultura han sido amplio objeto de estudio [11].

20

Se ha estudiado el efecto inhibitorio de los COVs sobre la germinación de esporas y el crecimiento de hifas en hongos patógenos [14]. Los COVs advierten a la planta, activando su sistema de defensa para preparar la resistencia a un estrés ambiental próximo [13]. Presentan también, efectos alelopáticos, perjudicando el crecimiento de otras especies vegetales potencialmente competidoras [11], [13]. Los COVs tienen también un papel importante en la modificación de las interacciones con otros niveles tróficos y en la detección de organismos vecinos [11]. Pueden mediar en la defensa contra parásitos, patógenos y depredadores y también, facilitar los procesos reproductivos o la competencia entre especies [15].

30

Con respecto a las aplicaciones agrícolas del quitosano, se ha demostrado que el quitosano induce la tolerancia de las plantas contra estreses abióticos, como la salinidad y la sequía [3]. El quitosano posee propiedades antivirales, mejora la respuesta del huésped a los virus y viroides, e inhibe la propagación de la infección vírica en el sistema de la

planta [16]. Tiene actividad antimicrobiana de amplio espectro contra una gran variedad de bacterias y hongos [3]. Presenta también, propiedades fertilizantes, complementando las necesidades vegetales de nutrientes esenciales, mejorando el crecimiento y el desarrollo vegetal [3], [5]. Por último, se ha documentado la actividad antifúngica del quitosano, observando que afecta a la germinación y a la morfología de las hifas de hongos patógenos [4], [17], [18]. El quitosano inhibe, además, el crecimiento de una amplia gama de bacterias [16], [19].

Por otro lado, el efecto del quitosano en la inducción de COVs en plantas no ha sido muy estudiado. Badiali et al., (2018), determinaron la eficacia del quitosano en la inducción de la biosíntesis de xantonas y COVs en las raíces de *Hypericum perforatum* [20]. Yin et al., (2012), estudiaron los efectos del quitosano en el crecimiento y contenido de metabolitos secundarios del orégano griego [21]. En el caso de las plantas de tomate, el quitosano aumenta la formación de los COVs con actividad inhibidora contra *Botrytis. cinerea*, disminuyendo la susceptibilidad de la planta al hongo patógeno [22].

Nagarajan y Chandiramouli, (2018) comprobaron la calidad de los frutos de *M. acuminata*, estudiando las interacciones entre COVs [23]. Sin embargo, el estudio de Berhal et al., (2017) fue el primero en caracterizar los COVs producidos por los dos tipos de plataneras más relevantes: Cavendish (AAA) y Plátano del Pacífico (AAB) [9].

Finalmente, debemos dejar constancia de que en la patente núm. ES2574588T3 divulga el uso del quitosano para incrementar la esporulación de hongos. En cambio, la presente solicitud de patente contempla la aplicación del quitosano en plantas para incrementar la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) que participan activamente en la respuesta de defensa de la planta. Es decir, según nuestro estudio añadir a la planta una determinada concentración de quitosano favorece la defensa de ésta sobre ciertos patógenos y/o estreses. Por tanto, no existe conflicto entre ambas patentes ya que no tienen nada que ver, y no sería posible para un experto en la materia conociendo las divulgaciones contenidas en la patente núm. ES2574588T3 proponer una solución en plantas de platanera para mejorar su defensa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención permite modificar el perfil de compuestos orgánicos volátiles (COVs) de plantas de platanera mediante la aplicación de quitosano.

5 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del quitosano para incrementar la producción de COVs en la planta platanera del género *Musa*, siendo dicha planta aquella que se selecciona del grupo que consiste en *Musa acuminata* o *Musa balbisiana*, entre otras plantas plataneras del género *Musa*.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al método para incrementar la producción de compuestos orgánicos volátiles de la planta platanera del género *Musa* que comprende: la selección de una planta platanera del grupo que consiste en *Musa acuminata* o *Musa balbisiana*, su incubación con una solución hidropónica que comprende al menos quitosano y el crecimiento de dicha planta platanera incubada en el medio de cultivo de la invención, en condiciones apropiadas para el incremento de producción de compuestos orgánicos
15 volátiles.

Otro aspecto de la invención se refiere al método para la obtención de compuestos orgánicos volátiles para su uso como agente de control biológico que comprende: la selección de una planta platanera del grupo que consiste en *Musa acuminata* o *Musa*
20 *balbisiana*, su incubación con una solución hidropónica que comprende al menos quitosano, el crecimiento de la planta platanera seleccionada en condiciones apropiadas para el incremento de producción de compuesto orgánicos volátiles y el aislamiento de los compuestos orgánicos volátiles producidos en el paso anterior.

25 En este sentido, la producción de COVs obtenidos a partir del método detallado posibilita su aplicación industrial y comercial.

En una realización preferente de la invención, la solución hidropónica presenta una concentración de quitosano de entre 0,5 mg/ml y 6 mg/ml, siendo la concentración de
30 quitosano más preferente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml.

La invención detallada anteriormente se basa en que la administración a una planta de platanera una dosis concreta de quitosano (anteriormente citadas) produce cambios en la expresión y producción de COVs en comparación con el perfil de compuestos orgánicos

volátiles de la planta sin tratar con quitosano.

La presente invención describe una metodología que se puede emplear con cualquier planta de platanera. La especie de platanera que se emplea en el ejemplo para la
5 modificación de su perfil de COVs es *M. acuminata* perteneciente al género *Musa*.

El quitosano empleado se administra a las plantas plataneras mediante soluciones hidropónicas. El quitosano se emplea disuelto en HCl (0.25 M) y posteriormente se ajusta el pH de la disolución con NaOH. El quitosano en polvo empleado se recomienda que
10 presente un peso molecular de 70 kDa y un grado de desacetilación entre del 90.1 %. La disolución de quitosano se debe dializar para eliminar las sales y posteriormente se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En la presente invención, tal como se detallará en el apartado de exposición detallada de
15 los modos de realización, se introducen plantas de platanera el grupo de *Musa acuminata* en una caja de cultivo, conocida comúnmente como Magenta Box. Así, se inoculan las plantas plataneras seleccionadas con una de estas tres opciones:

- Con disoluciones hidropónicas control, sólo con sales de Gamborg,
- 20 - Con disoluciones hidropónicas con quitosano a una concentración de 1 mg/ml.
- Con disoluciones hidropónicas con quitosano a una concentración de 5 mg/ml.

Para captar los volátiles tempranos, las fibras captadoras de volátiles se disponen junto a las plantas de platanera y se dejan captando COVs las primeras 24 horas. Mientras que
25 para captar los COVs tardíos, las plantas platanera inoculadas se mantienen en contacto con las soluciones hidropónica durante 3 días, captando los COVs sólo durante las últimas 24 horas.

La detección de COVs se realiza mediante la cromatografía de gases acoplada a la
30 espectrometría de masas (GC-MS), por microextracción en fase sólida (HS-SPME). Para comparar el perfil de COVs de las plantas plataneras tratadas con quitosano y sin tratar.

En la presente invención se hace referencia a los términos “compuestos orgánicos volátiles”, “COVs” y “volátiles” indistintamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la explicación de la invención y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un conjunto de imágenes donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Se muestra el resultado obtenido de los COVs de *Musa Acuminata* que se activan con el quitosano en los volátiles tempranos.

Figura 2. Se muestra el resultado obtenido de los COVs de *Musa Acuminata* que se activan con el quitosano en los volátiles tardíos.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

A continuación, se describe la invención haciendo referencia a un ejemplo el cual se proporciona con la única intención de ilustrar la metodología, por lo que la invención no se limita únicamente a lo descrito en el ejemplo.

Preparación del quitosano:

Se emplea un quitosano, el cual fue denominado T8, que se presenta en un estado seco en polvo, proveniente de caparazones de crustáceos marinos, con grado de desacetilación del 90.1 % y peso molecular de 70 kDa, (obtenido de Louis Schoppenhauer GmbH y Co.KG, Alemania).

Se obtienen disoluciones de quitosano en HCl [0.25M] a una concentración de 10g/l, con un pH de la disolución de 5.6.

Se elimina el NaCl por medio de un proceso de diálisis. Para realizar la diálisis del quitosano, se enjuagan las membranas de diálisis de celulosa (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich, USA) con agua de grifo, se hidratan y calientan a 800W un minuto en el microondas, se enjuagan por fuera y se vuelven a calentar 1 minuto en las mismas condiciones. Por último, se aclara la membrana con agua destilada por dentro y

por fuera, se le hace un nudo en un extremo, se rellena la tripa con la disolución de quitosano, dejando una porción vacía antes de hacer el nudo en el otro extremo, cerrándolo, para permitir la expansión del líquido en el proceso de diálisis y evitar así daños en la membrana. El proceso de aclarado y limpieza de las membranas tiene como objetivo
 5 eliminar los posibles residuos de productos químicos utilizados en la obtención de la celulosa.

La membrana cerrada con la disolución de quitosano se introduce en un recipiente con 5 L de agua destilada y se deja en agitación a 4 °C durante dos días, sustituyendo el agua
 10 cada 24 horas. Pasados los tres días, se mide el volumen de la disolución final, a partir de la cual, y con la cantidad de quitosano empleado, se calcula la concentración de la disolución dializada y se esteriliza en el autoclave (20 minutos a 121°C). La disolución resultante se conserva a 4 °C, se utiliza durante un periodo máximo de 1 mes.

15 Preparación de las soluciones hidropónicas:

Se preparan las disoluciones hidropónicas del tratamiento control con una disolución de sales Gamborg. Para ello, se disuelven 0.31g de Gamborg (Gamborg Basal Salt Mixture) en un litro de agua destilada y la disolución se autoclava a 120 °C durante 20 minutos. Por
 20 otro lado, se preparan disoluciones de Gamborg con quitosano a concentraciones de 1mg/ml y 5mg/ml. Para el tratamiento con quitosano, según la concentración de la disolución con quitosano se calcula el volumen necesario para obtener una concentración de 1mg/ml o de 5mg/ml, mediante la fórmula:

$$c1 \cdot v1 = c2 (1 \text{ mg/ml } \text{ ó } 5 \text{ mg/ml}) \cdot v2$$

25 Para ajustar la concentración final, al volumen de la disolución de quitosano se le añade agua destilada con 0.31g de sales de Gamborg, previamente autoclavada hasta alcanzar un volumen final de 1 litro. Las disoluciones finales se conservan a 4 °C.

30 Diseño experimental:

El experimento se realiza en una caja de cultivo Magenta Box (MB, Sigma). Se trata de cajas rectangulares (77 mm × 77 mm × 97 mm) de policarbonato transparente unidas una sobre otra con una junta. Para el tratamiento control se disponen 45 ml de solución

hidropónica y, para el tratamiento con quitosano, se inoculan 45 ml de solución hidropónica con quitosano a su concentración correspondiente (1 mg/ml o 5 mg/ml).

5 En cada MB se disponen 5 plantas de *Musa acuminata* cv. pequeña enana, plantas de cultivo in vitro (Cultesa, Tenerife, Canarias). En las magenta box, en las cuales hay 5 plantas, se dispone la solución respectiva a cada uno de los tratamientos.

10 Se realizan tres réplicas por cada tratamiento (control /quitosano), esto se repite para los dos niveles de la variable tiempo (0 Días/24h y 2 Días/24h) y para los dos niveles de la variable concentración (1 mg/ml y 5 mg/ml). Es decir, para cada tiempo vamos a tener 3 magenta box control, tres magenta boxes tratamiento de 1mg/ml, otros tres magenta boxes control y tres magenta boxes con el tratamiento de 5 mg/ml.

15 Para captar los COVs tempranos, las fibras SPME (de sus siglas en inglés correspondientes a “Microextracción en fase sólida” o MEFS de sus siglas en castellano) se dejan captando COVs las primeras 24 horas. La SPME es una fibra cubierta con una fase que sirve para la captación de COVs, que puede estar constituida de un polímero líquido o un adsorbente sólido, es una técnica utilizada en química analítica para extraer compuestos químicos para su posterior identificación.

20 Por último, se prepara una caja de cultivo Magenta Box sin plantas, sólo con las disoluciones, y se sigue el mismo procedimiento. Se captan los COVs presentes y se analizan, siguiendo el proceso detallado al experimento realizado para las plantas plataneras.

25 El experimento realizado con las disoluciones hidropónicas sin plantas se realiza para compararlo con los perfiles obtenidos en los experimentos con plantas *Musa acuminata* y, determinar que compuestos son únicamente generados por las plantas y, cuáles de ellos son representativos del ambiente o de las disoluciones hidropónicas.

30 Las Magenta Box de los experimentos se incuban en una cámara de cultivo (Visitable en los SSTTI, Universidad de Alicante), a una temperatura de 24°C, a una humedad relativa del 60% y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 18 horas de oscuridad durante cada experimento.

Microextracción en fase sólida/Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS):

- 5 El perfil de COVs de *Musa Acuminata* se determina mediante la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS), utilizando la microextracción de fase sólida o HS-SPME.

10 Para la microextracción se utiliza un soporte SPME y una fibra SPME. El soporte o holder es un mecanismo similar a una jeringa, con una aguja que atraviesa el mecanismo y que contiene una delicada fibra SPME retráctil que puede sustituirse (Grafit et al., 2018). En nuestro caso, se utiliza un *holder* manual (Supelco) y una fibra SPME Fiber Assembly 50/30um DVB/CAR/PDMS (Supelco). Para la extracción, el *holder* se sitúa sobre el orificio realizado previamente a las Magenta Box, de forma que la fibra queda en su interior. Se
15 sella el orificio restante uniendo el *holder* al recipiente mediante cinta de Parafilm. La fibra se mantiene dentro del recipiente en contacto con el ambiente de la planta durante 24h.

A continuación, la fibra se recoge y se lleva a cabo la desorción en el inyector de la GC-MS. Por último, la identificación de los compuestos se realiza comparando los espectros de
20 masas experimentales con los de la librería del sistema (Wiley275).

El análisis de los COVs de *M. acuminata* se realiza utilizando un equipo de cromatografía de gases GC-MS. Se utiliza un espectrómetro de masas de baja resolución (Agilent modelo 5977B) con analizador de cuádruplo acoplado unido a un cromatógrafo de gases (Agilent
25 modelo 7890B), equipado con una columna capilar con inyector split/splitless. La ionización de las muestras se realiza en impacto electrónico. La fibra se introduce en el inyector del GC durante 4 minutos, después se retira y, la separación cromatográfica se lleva a cabo durante 41 minutos. El inyector está a 250°C, alcanzando como máximo 260°C.

30 Tratamiento de Datos

Una vez obtenidos los resultados de la identificación de COVs, se realizó un tratamiento de datos previo al análisis de resultados.

Los espectros experimentales se cotejan con los que aparecen en distintas bases de datos, como en la base del National Institute of Standards and Technology (NIST) (<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>) y PubChem Compound (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>), asignando a cada espectro el compuesto con el que más similitud muestre. De los compuestos identificados se eliminan aquellos que solo aparecen en una réplica, si la altura del pico es menor de 50000 ppm.

Al listado total de COVs identificados en las muestras con plantas platanera de *Musa acuminata*, se eliminan aquellos que aparecen en los experimentos sólo con las disoluciones. Eliminando así, posibles contaminaciones ambientales y compuestos presentes en las disoluciones hidropónicas. Los compuestos seleccionados se clasifican por el tipo de molécula, utilizando las bases de datos como PubChem Compound (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) y ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>).

Análisis Estadístico

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) de un factor no balanceado para detectar diferencias estadísticas en la abundancia, es decir, en la altura de picos (ppm) de los compuestos que aparecen en común entre las muestras con y sin quitosano. Se ejecuta con el tratamiento como único factor fijo con tres niveles:

- planta sin quitosano (representado por la referencia “control”),
- planta con quitosano a 1 mg /ml (representado por la referencia T8[1]), y
- planta con quitosano a 5 mg /ml (representado por la referencia T8[5]).

Las referencias identificadas para los tres niveles identificados quedan representadas en las figuras 1 y 2 que acompañan a la presente memoria para ilustrar los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo.

Se realiza el mismo procedimiento para los dos tiempos, determinando si las diferencias en la abundancia aparecen en una fase temprana (a saber: COVs captados en las primeras 24 horas), más tardía (a saber: COVs captados en las últimas 24 horas al mantener las plantas plataneras en contacto con las soluciones hidropónicas durante 3 días), o en ambas.

Previamente, se comprueba la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad, haciendo uso del test de Barrett, cumpliendo con todos los requisitos. Cuando los valores no se ajustan a una distribución normal, se realiza el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5

Efecto del quitosano en la producción de COVs de *Musa acuminata*

Se comparan los COVs identificados en los experimentos llevados a cabo con plantas plataneras respecto de los COVs identificados en los experimentos llevados cabo solo con las disoluciones hidropónicas (sin plantas). Se detectan un total de 114 COVs presentes únicamente en los experimentos con plantas plataneras.

Entre los 114 compuestos identificados, los tipos de moléculas más frecuentes fueron: alcanos (25), terpenos (18= 9 monoterpenos, 8 sesquiterpenos y 1 terpeno carotenoide), hidrocarburos halogenados (16= 4 compuestos de Cloro, 6 compuestos de Nitrógeno, 2 compuestos de Bromo, 2 compuestos de Silicio, un compuestos de Flúor y un compuesto de Boro), hidrocarburos aromáticos (13), Ésteres (12), alquenos (9), alcoholes (6), aldehídos (2), benzaldehídos (3), éteres (3), aldehídos (2), una cetona y un benzoato.

Se detectan diferencias en la abundancia entre tratamientos en 24 COVs de los 114 totales. Estos compuestos se clasifican en cuatro grupos según la influencia del quitosano en su producción tal como queda detallado en la Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Agrupación de algunos de los COVs identificados en función del efecto generado por la presencia del quitosano.

Efecto del quitosano	Nº	Tipo de Compuesto	P-Valor	
			0 días/24h	2 días/24h
Activa el compuesto	C9	Alcano acíclico ramificado	0.2291	0.0468
Activa el compuesto	C23	Alcano acíclico lineal	0.0404	0.3423
Activa el compuesto	C32	Cicloalqueno	0.3634	0.0091
Activa el compuesto	C35	Terpeno, Monoterpeno acíclico	0.3932	0.0027

Efecto del quitosano	Nº	Tipo de Compuesto	P-Valor	
			0 días/24h	2 días/24h
Activa compuesto el	C36	Terpeno, Monoterpeno acíclico	0.1332	0.016
Activa compuesto el	C38	Terpeno, Monoterpeno acíclico	0.6182	0.0091
Activa compuesto el	C57	Hidrocarburo aromático	0.4578	0.0037
Activa compuesto el	C60	Fenol, Éter de fenilo, Anisole	0.5539	0.0006
Activa compuesto el	C62	Hidrocarburo Aromático, Fenol	0.0198	0.0014
Activa compuesto el	C90	Aldehído	0.0091	0.2782
Activa compuesto el	C109	Ester del ácido benzoico	0.0909	0.0485
Activa compuesto el	C114	Benzoato, Hidroxibenzoato, Salicilato	0.2606	0.0424
Inhibe el compuesto	C85	Hidrocarburo halogenado cíclico de Boro	0.6727	0.0196
Variable	C16	Alcano acíclico ramificado	0.0197	0.7134
Variable	C18	Alcano acíclico ramificado	0.0419	0.7982
Variable	C22	Alcano acíclico lineal	0.0471	0.2436
Variable	C74	Hidrocarburo halogenado aromático nitrogenado	0.0014	0.7457
Variable	C83	Hidrocarburo halogenado de Silicio	0.4617	0.0152
Variable	C96	Alcohol	0.0413	0.2376
Variable	C105	Ester del ácido tricloroacético, tricloroacetato	0.0471	0.3541
Variable	C106	Ester sulfúrico	0.0255	0.7763
Variable	C110	Éter aromático	0.4792	0.0091
Presencia /Ausencia	C37	Terpeno, Monoterpeno acíclico	-	0.0909
Presencia /Ausencia	C45	Terpeno, Sesquiterpeno policíclico	0.0909	-
Presencia /Ausencia	C67	Hidrocarburo heterocíclico aromático	-	0.0091
Presencia /Ausencia	C75	Hidrocarburo halogenado aromático nitrogenado	0.0909	-
Presencia /Ausencia	C101	Ester del ácido benzoico	-	0.0909
Presencia /Ausencia	C102	Ester sulfúrico	0.0909	-

Tabla 2. Identificación química de algunos de los COVs identificados en función del efecto generado por la presencia del quitosano

Efecto del quitosano	Nº	Compuesto	P-Valor	

			0 días/24h	2 días/24h
Activa el compuesto	C9	<i>Undecane, 2,4-dimethyl-</i>	.2291	.0468
Activa el compuesto	C23	<i>Pentadecane</i>	.0404	.3423
Activa el compuesto	C32	<i>1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-propyl-</i>	.3634	.0091
Activa el compuesto	C35	<i>.beta.-Myrcene</i>	.3932	.0027
Activa el compuesto	C36	<i>.beta.-Ocimene</i>	.1332	.016
Activa el compuesto	C38	<i>2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-</i>	.6182	.0091
Activa el compuesto	C57	<i>Benzene, 1-ethenyl-4-ethyl-</i>	.4578	.0037
Activa el compuesto	C60	<i>Anisole</i>	.5539	.0006
Activa el compuesto	C62	<i>3,5-Dimethylanisole</i>	.0198	.0014
Activa el compuesto	C90	<i>2-Hexenal, (E)-</i>	.0091	.2782
Activa el compuesto	C109	<i>Benzoic acid, 2-methylbutyl ester</i>	.0909	.0485
Activa el compuesto	C114	<i>Methyl salicylate</i>	.2606	.0424
Inhibe el compuesto	C85	<i>Bicyclo[2.2.1]heptane, 2-[9-borabicyclo[3.3.1]non-9-yloxy]-, 1,7,7-trimethyl-</i>	.6727	.0196
Variable	C16	<i>Heptadecane, 8-methyl-</i>	.0197	.7134
Variable	C18	<i>Nonane, 4,5-dimethyl-</i>	.0419	.7982
Variable	C22	<i>Hexacosane</i>	.0471	.2436
Variable	C74	<i>Acridine, 9-methyl-</i>	.0014	.7457
Variable	C83	<i>Silane, diethylbutoxy(2-methylpent-3-yloxy)-</i>	.4617	.0152
Variable	C96	<i>(7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroinden-4-yl)methanol</i>	.0413	.2376
Variable	C105	<i>Trichloroacetic acid, dodecyl ester</i>	.0471	.3541
Variable	C106	<i>Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester</i>	.0255	.7763
Variable	C110	<i>Benzene, (ethoxymethyl)-</i>	.4792	.0091
Presencia /Ausencia	C37	<i>3,7-Nonadien-2-ol, 4,8-dimethyl-</i>		.0909
Presencia /Ausencia	C45	<i>Di-epi-.alpha.-cedrene</i>	.0909	
Presencia /Ausencia	C67	<i>Benzofuran, 5-methoxy-</i>		.0091

Presencia /Ausencia	C75	<i>L-Homoserine lactone, N,N-dimethyl</i>	.0909	
Presencia /Ausencia	C101	<i>Benzoic acid, ethyl ester</i>		.0909
Presencia /Ausencia	C102	<i>Sulfurous acid, octadecyl 2-propylester</i>	.0909	

Entre los compuestos que muestran diferencias entre tratamientos hay 8 COVs que se ha demostrado en estudios anteriores que presentan propiedades biológicas relevantes y beneficiosas para las plantas. La presente invención se centra en esos 8 compuestos orgánicos volátiles que aumentan su abundancia en presencia del quitosano. A saber: 2-Hexenal, (E)-, Pentadecane, anisole, 2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, .beta.-Ocimene, Salicilato de metilo, L-Homoserine lactone, N,N-dimethyl y Benzoic acid, ethyl ester.

Así, tal como se observa seguidamente, las figuras incluidas en la presente memoria muestran la presencia de 2-Hexenal, (E)-, Pentadecane, anisole, 2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, .beta.-Ocimene, Salicilato de metilo. Sin embargo, los compuestos L-Homoserine lactone, N,N-dimethyl y Benzoic acid, ethyl ester— de los cuales son conocidas sus propiedades beneficiosas - no se han identificado de forma certera en los tratamientos llevados a cabo y por ello no se incluyen gráficas sobre estos.

A concentraciones altas de quitosano en la solución hidropónica (5 mg/ml) se observa para los COVs tempranos que en 24h el quitosano activa el metabolismo de ciertos volátiles, tal como queda representado en la figura 1. Dichos COVs tempranos corresponden a: el 2-Hexenal, (E)- y el pentadecane.

Concretamente, el 2-Hexenal, (E)-, un aldehído que está implicado en las interacciones planta-patógeno, inhibe además a *Aspergillus flavus* [24] y presenta capacidad para suprimir mohos de frutas y verduras, lo que lo hace un atractivo biofumigante potencial [25].

El 2-Hexenal, (E)- a una concentración alta puede inhibir el desarrollo de la enfermedad fúngica causada por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* [26].

En segundo lugar, el pentadecane, un alcano acíclico lineal, que promueve el crecimiento vegetal [27], [28].

Por otro lado, tal como se muestra en la Figura 2, a concentraciones altas de quitosano en la solución hidropónica (5 mg/ml) se observa la presencia de COVs tardíos, activando el metabolismo de los siguientes compuestos:

5

El Anisole, un éter de fenilo, un compuesto antifúngico contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum* [29], [30].

10

El 2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, un monoterpeno acíclico que mejora la resistencia de *Arabidopsis thaliana* contra el patógeno *B. cinerea*, induciendo la lignificación en las paredes celulares y suprimiendo la penetración y crecimiento de las hifas [31].

15

El .beta.-Ocimene, otro monoterpeno acíclico, se libera por las hojas y flores de muchas especies vegetales, participa en la atracción de los polinizadores y actúa como defensa contra la herbívora. Las plantas infestadas emiten .beta.-Ocimene, atrayendo a los depredadores de los herbívoros [32], [33].

20

El Salicilato de metilo, un hidroxibenzoato, producido por las plantas de tabaco inoculadas con el virus del mosaico del tabaco. Este compuesto actúa como una señal aérea que activa la expresión de genes relacionados con la defensa en los tejidos sanos de la planta infectada y en las plantas vecinas, presentando un papel importante en la resistencia a la enfermedad [34]. También se ha detectado este compuesto volátil en plantas infestadas por herbívoros, indicando que desempeña un papel importante en la activación de las respuestas de defensa de la planta [35].

25

Además, se observa que hay dos compuestos que solo aparecen en presencia del quitosano.

30

Según la presente invención, el quitosano induce el metabolismo del L-Homoserine lactone, N,N-dimethyl en los compuestos volátiles tempranos, a una concentración baja (1mg/ml). El volátil L-Homoserine lactone, N,N-dimethyl es producido por bacterias patógenas o beneficiosas, y ha demostrado inducir diversas reacciones en animales y plantas. Actúa como moléculas sensoras de quórum que participan en la comunicación entre células bacterianas para controlar su comportamiento, y se ha demostrado que las

lactonas tienen un papel importante en la activación de las defensas de las plantas [36]–[38].

A una concentración baja (1mg/ml) en los volátiles tardíos, el quitosano induce el metabolismo del Benzoic acid, ethyl ester. Se conoce, que el ácido benzoico y sus derivados tienen propiedades antimicrobianas [39], y según el estudio de Wang *et al.*, (2021), se demostró que el éster etílico del ácido benzoico era tóxico para *Rhizoctonia solani*, un patógeno de plantas [40].

En conclusión, mediante los resultados de la experimentación realizada se confirma el potencial del quitosano para inducir en el metabolismo de plantas plataneras del género *Musa* la presencia de COVs con gran relevancia ambiental.

El quitosano, a una concentración de 5 mg/ml, en 24h, activa la producción de compuestos volátiles que presentan actividad antifúngica contra varios hongos patógenos. Estos COVs se podían utilizar como biofumigantes, inhibiendo el crecimiento de mohos en plantas y verduras.

A la misma concentración de 5 mg/ml, a partir de dos días en contacto con el quitosano, este activa la producción de COVs que actúan como agentes de control biológico contra una gran variedad de patógenos, y COVs que participan en la activación de respuesta de defensa de la planta.

Por último, el quitosano induce la presencia de compuestos volátiles con actividad antimicrobiana, que participan activamente en la defensa de la planta platanera del género *Musa*. Todo esto demuestra el potencial que tiene el quitosano como aditivo orgánico en aplicaciones agrícolas, una solución ecológica y sostenible para disminuir el uso de pesticidas y fertilizantes químicos.

Referencias bibliográficas

- [1] D. S. O. Coqueiro, M. Maraschin, and R. M. Di Piero, "Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants," *J. Phytopathol.*, vol. 159, no. 7–8, pp. 488–494, Aug. 2011, doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01791.x.

- [2] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [3] H. Zong, S. Liu, R. Xing, X. Chen, and P. Li, "Protective effect of chitosan on photosynthesis and antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 138, pp. 271–278, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.009.
- [4] F. Lopez-Moya, M. Suarez-Fernandez, and L. V. Lopez-Llorca, "Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 2. MDPI AG, Jan. 02, 2019, doi: 10.3390/ijms20020332.
- [5] M. Malerba and R. Cerana, "Recent advances of chitosan applications in plants," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 2, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3390/polym10020118.
- [6] V. Ghormade, E. K. Pathan, and M. V. Deshpande, "Can fungi compete with marine sources for chitosan production?," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 1415–1421, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112.
- [7] N. S. Mathew and P. S. Negi, "Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*Musa acuminata* Colla): A review," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 196, no. December 2016, pp. 124–140, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2016.12.009.
- [8] C. Wong *et al.*, "Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by ALFP," *Ann. Bot.*, vol. 88, no. 6, pp. 1017–1025, 2001, doi: 10.1006/anbo.2001.1542.
- [9] C. Berhal *et al.*, "First Characterisation of Volatile Organic Compounds Emitted by Banana Plants," *Sci. Rep.*, vol. 7, May 2017, doi: 10.1038/SREP46400.
- [10] E. Pagans, X. Font, and A. Sánchez, "Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration," *J. Hazard. Mater.*, vol. 131, no. 1–3, pp. 179–186, 2006, doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.09.017.
- [11] E. Effah, J. K. Holopainen, and A. C. McCormick, "Potential roles of volatile organic compounds in plant competition," *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, vol. 38, no. March, pp. 58–63, 2019, doi: 10.1016/j.ppees.2019.04.003.
- [12] L. A. Cáceres *et al.*, "In vivo extraction of volatile organic compounds (VOCs) from Micro-Tom tomato flowers with multiple solid phase microextraction (SPME) fibers," *Can. J. Chem.*, vol. 93, no. 2, pp. 143–150, 2015, doi: 10.1139/cjc-2014-0269.
- [13] F. Brilli, F. Loreto, and I. Baccelli, "Exploiting plant volatile organic compounds (VOCs) in agriculture to improve sustainable defense strategies and productivity of crops," *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. March, pp. 1–8, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00264.
- [14] P.-Y. Zhang, K.-S. Chen, P.-Q. He, S.-H. Liu, and W.-F. Jiang, "Effects of Crop Development on the Emission of Volatiles in Leaves of *Lycopersicon esculentum* and Its Inhibitory Activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*," *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 50, no. 1, pp. 84–91, 2008, doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00597.x.

- [15] N. Stoppacher, B. Kluger, S. Zeilinger, R. Krska, and R. Schuhmacher, "Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS," *J. Microbiol. Methods*, vol. 81, no. 2, pp. 187–193, May 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2010.03.011.
- 5 [16] A. El Hadrami, L. R. Adam, I. El Hadrami, and F. Daayf, "Chitosan in plant protection," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 4, pp. 968–987, 2010, doi: 10.3390/md8040968.
- [17] X. Huang *et al.*, "Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 166, pp. 1365–1376, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.016.
- 10 [18] Y. cai LI, X. juan SUN, Y. BI, Y. hong GE, and Y. WANG, "Antifungal Activity of Chitosan on *Fusarium sulphureum* in Relation to Dry Rot of Potato Tuber," *Agric. Sci. China*, vol. 8, no. 5, pp. 597–604, 2009, doi: 10.1016/S1671-2927(08)60251-5.
- [19] L. A. Hadwiger, "Plant science review: Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype," *Plant Science*, vol. 208. Elsevier, pp. 42–49, Jul. 01, 2013, doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.007.
- 15 [20] C. Badiali *et al.*, "Chitosan oligosaccharides affect xanthone and VOC biosynthesis in *Hypericum perforatum* root cultures and enhance the antifungal activity of root extracts," *Plant Cell Rep.*, vol. 37, pp. 1471–1484, 2018, doi: 10.1007/s00299-018-2317-2.
- 20 [21] H. Yin, X. C. Fretté, L. P. Christensen, and K. Grevsen, "Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 1, pp. 136–143, 2012, doi: 10.1021/jf204376j.
- 25 [22] H. Peiqing, L. Xuezheng, S. Jihong, H. Xiaohang, C. Kaoshan, and L. Guangyou, "Induction of volatile organic compound in the leaves of *Lycopersicon esculentum* by chitosan oligomer," *High Technol. Lett. (English Ed.)*, vol. 11, no. 1, pp. 95–100, Jan. 2005, Accessed: Jun. 23, 2021. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/cba/498305>.
- 30 [23] V. Nagarajan and R. Chandiramouli, "Interaction of volatile organic compounds (VOCs) emitted from banana on stanene nanosheet—a first-principles studies," *Struct. Chem.* 2018 295, vol. 29, no. 5, pp. 1321–1332, May 2018, doi: 10.1007/S11224-018-1114-4.
- [24] V. Ricciardi *et al.*, "From plant resistance response to the discovery of antimicrobial compounds: The role of volatile organic compounds (VOCs) in grapevine downy mildew infection," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 160, pp. 294–305, 2021, doi: 10.1016/j.plaphy.2021.01.035.
- 35 [25] D. D. Archbold, T. R. Hamilton-Kemp, A. M. Clements, and R. W. Collins, "Fumigating 'Crimson Seedless' table grapes with (E)-2-hexenal reduces mold during long-term postharvest storage," *HortScience*, vol. 34, no. 4, pp. 705–707, Jul. 1999, doi: 10.21273/hortsci.34.4.705.
- 40 [26] Y. Xu *et al.*, "Plant volatile organic compound (E)-2-hexenal facilitates *Botrytis*

cinerea infection of fruits by inducing sulfate assimilation,” *New Phytol.*, vol. 231, pp. 432–446, 2021, doi: 10.1111/nph.17378.

- [27] D. Blom *et al.*, “Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions,” *Environ. Microbiol.*, vol. 13, no. 11, pp. 3047–3058, Nov. 2011, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x.
- [28] P. Jishma, N. Hussain, R. Chellappan, R. Rajendran, J. Mathew, and E. K. Radhakrishnan, “Strain-specific variation in plant growth promoting volatile organic compounds production by five different *Pseudomonas* spp. as confirmed by response of *Vigna radiata* seedlings,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 1, pp. 204–216, Jul. 2017, doi: 10.1111/jam.13474.
- [29] D. J. Fitzgerald, M. Stratford, M. J. Gasson, and A. Narbad, “Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 5, pp. 1769–1775, Mar. 2005, doi: 10.1021/jf048575t.
- [30] Y. Wu, J. Yuan, Y. E. W. Raza, Q. Shen, and Q. Huang, “Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 55, no. 9, pp. 1104–1117, Sep. 2015, doi: 10.1002/jobm.201400906.
- [31] K. Kishimoto, K. Matsui, R. Ozawa, and J. Takabayashi, “Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*,” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 14, pp. 1520–1529, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.05.027.
- [32] G.-I. Arimura, R. Ozawa, S. Kugimiya, J. Takabayashi, and J. Rg Bohlmann, “Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)-b-Ocimene and Transcript Accumulation of (E)-b-Ocimene Synthase in *Lotus japonicus* 1,” *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 1976–1983, 2004, doi: 10.1104/pp.104.042929.
- [33] G. Farré-Armengol, I. Filella, J. Llusà, and J. Peñuelas, “ β -Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plants and Other Organisms,” *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 22, no. 7. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1148, Jul. 13, 2017, doi: 10.3390/molecules22071148.
- [34] V. Shulaev, P. Silverman, and I. Raskin, “Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance,” *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 718–721, Feb. 1997, doi: 10.1038/385718a0.
- [35] J. Zhu and K. C. Park, “Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1733–1746, Aug. 2005, doi: 10.1007/s10886-005-5923-8.
- [36] J. Pršić and M. Ongena, “Elicitors of Plant Immunity Triggered by Beneficial Bacteria,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Nov. 09, 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.594530.
- [37] A. Schikora, S. T. Schenk, E. Stein, A. Molitor, A. Zuccaro, and K. H. Kogel, “N-acyl-homoserine lactone confers resistance toward biotrophic and hemibiotrophic

pathogens via altered activation of AtMPK6,” *Plant Physiol.*, vol. 157, no. 3, pp. 1407–1418, Nov. 2011, doi: 10.1104/pp.111.180604.

[38] A. A. Zarkani *et al.*, “Homoserine lactones influence the reaction of plants to rhizobia,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 8, pp. 17122–17146, 2013, doi: 10.3390/ijms140817122.

[39] E. S. Park, W. S. Moon, M. J. Song, M. N. Kim, K. H. Chung, and J. S. Yoon, “Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 47, no. 4, pp. 209–214, 2001, doi: 10.1016/S0964-8305(01)00058-0.

[40] E. Wang *et al.*, “Volatile organic compounds from rice rhizosphere bacteria inhibit growth of the pathogen *rhizoctonia solani*,” *Agric.*, vol. 11, no. 4, p. 368, Apr. 2021, doi: 10.3390/agriculture11040368.

REIVINDICACIONES

1. Uso del quitosano para incrementar la producción de compuestos orgánicos volátiles de la planta platanera del género *Musa spp.*
5
2. Método para incrementar la producción de compuestos orgánicos volátiles de la planta platanera del género *Musa* que comprende:
 - Selección de una planta platanera del género *Musa spp.*
 - Incubación a la planta platanera seleccionada de una solución hidropónica que
10 comprende al menos quitosano.
 - Crecimiento de la planta platanera seleccionada en condiciones apropiadas para el incremento de producción de compuesto orgánicos volátiles.
3. Método para la obtención de compuestos orgánicos volátiles para su uso como agente
15 de control biológico que comprende:
 - Selección de una planta platanera del grupo género *Musa spp.*
 - Incubación a la planta platanera seleccionada de una solución hidropónica que comprende al menos quitosano.
 - Crecimiento de la planta platanera seleccionada en condiciones apropiadas para el
20 incremento de producción de compuestos orgánicos volátiles.
 - Aislamiento de los compuestos orgánicos volátiles producidos en el paso anterior.
4. Solución hidropónica según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el quitosano
25 está a una concentración de entre 0,5 mg/ml y 6 mg/ml.
5. Solución hidropónica según la reivindicación 4, donde el quitosano está a una concentración de entre 1 mg/ml y 5 mg/ml.

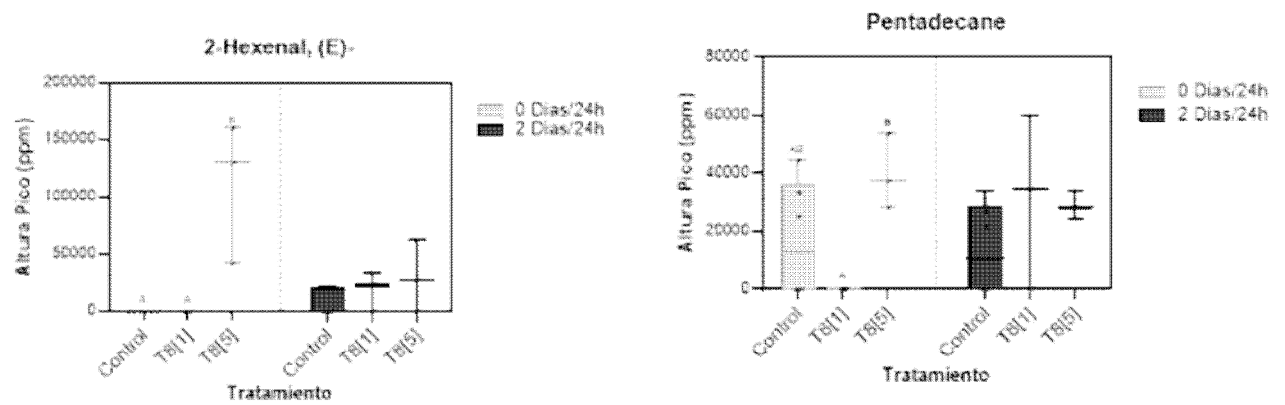


FIG. 1

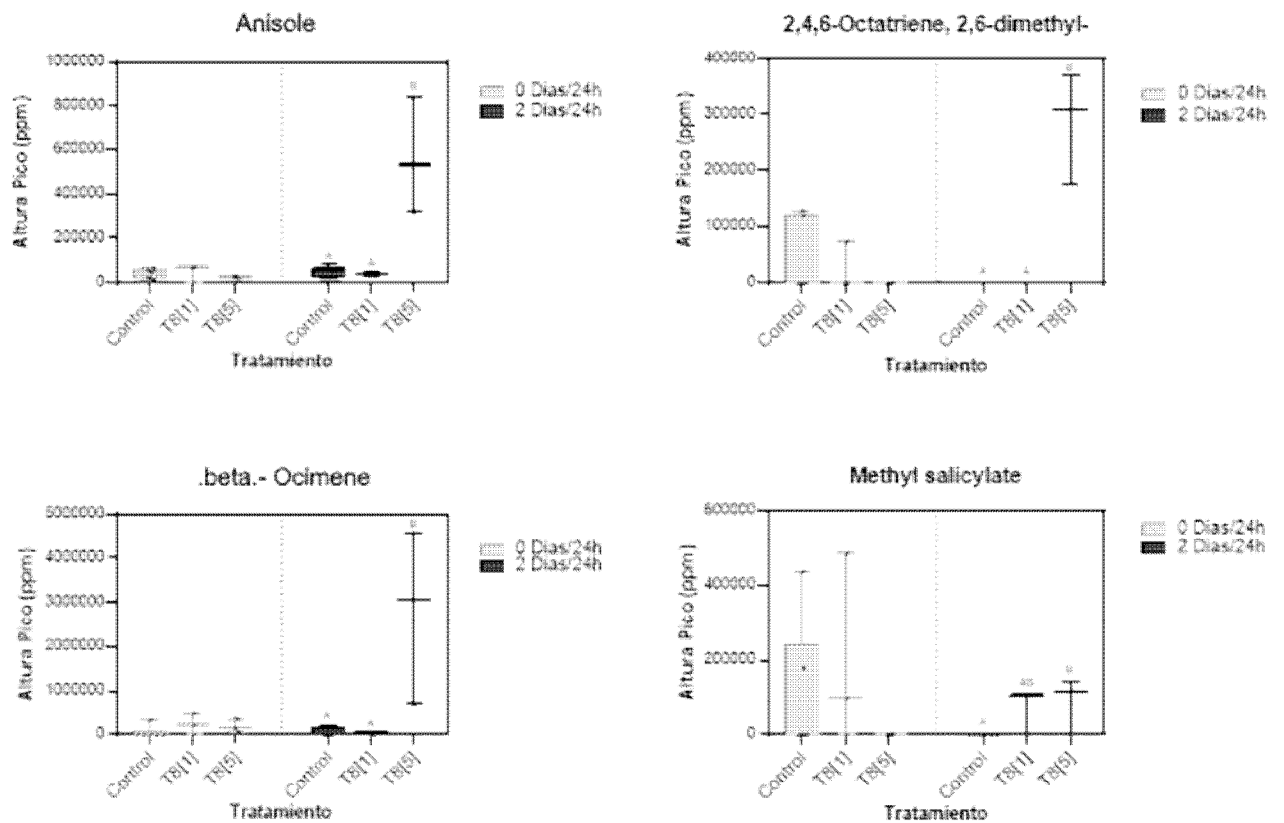


FIG. 2



- ②① N.º solicitud: 202131206
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H3/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HE P et al. Induction of volatile organic compound in the leaves of <i>Lycopersicon esculentum</i> by chitosan oligomer. High Technology Letters March 2005 Inst. of Scientific and Technical Information of China cn.28/02/2005, Vol. 11, Nº 1, Páginas 95 - 100, ISSN 1006-6748 (print). resumen	1-5
A	COELHO N et al. Impact of chitosan on plant tissue culture: recent applications. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 20210903 Springer Netherlands, Dordrecht., 03/09/2021, Vol. 148, Nº 1, Páginas 1 - 13, ISSN 0167-6857, <DOI: doi:10.1007/s11240-021-02156-6>. resumen	1-5
A	LOPEZ-MOYA, FEDERICO; SUAREZ-FERNANDEZ, MARTA; LOPEZ-LLORCA, LUIS VICENTE. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. International journal of molecular sciences, 2019, Vol. 20, no 2, p. 332, resumen	1-5
A	ESYANTI, RIZKITA RACHMI, et al. Chitosan nanoparticle-based coating as post-harvest technology in banana. Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2019. p. 012109. resumen	1-5

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:

Fecha de realización del informe
25.03.2022

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

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

A01H

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, TXT, INTERNET