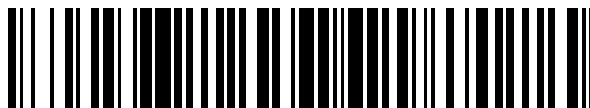


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 058 776**

21 Número de solicitud: 202430716

51 Int. Cl.:

A01N 43/12

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.09.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.03.2026

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (60,00%)**

C/ Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (40,00%)

72 Inventor/es:

LÓPEZ RÁEZ, Juan Antonio;

LIDOY LOGROÑO, Javier;

POZO JIMÉNEZ, María José;

MACÍAS DOMÍNGUEZ, Francisco Antonio;

GONZÁLEZ MOLINILLO, José María;

VALERA MONTOYA, Rosa;

GARCÍA ZORRILLA, Jesús y

RIAL CUMBRERA, Carlos

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **Eudesmanólidas para su uso como estimulante de la micorrización**

57 Resumen:

Eudesmanólidas para su uso como estimulante de la micorrización.

La presente invención se refiere al uso de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida como agente bioestimulante de la germinación de esporas de hongos y/o de la micorrización de plantas. Más específicamente, se refiere a la aplicación de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida para estimular la germinación de esporas y el desarrollo de hifas de hongos micorrícicos arbusculares y/o para aumentar la capacidad de micorrización en plantas.

ES 3 058 776 A1

DESCRIPCIÓN

Eudesmanólidas para su uso como estimulante de la micorrización

5 La presente invención se refiere al uso de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida como bioestimulantes. Más específicamente se refiere a la aplicación de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida para estimular la germinación de esporas y el desarrollo de hifas de hongos micorrízicos arbusculares y/o para aumentar la capacidad de micorrización en plantas. Por lo tanto, la presente invención se encuadra
10 dentro de los campos de la agricultura y microbiología, más particularmente, el desarrollo de inoculantes microbianos como bioestimulantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La creciente población humana requiere un aumento considerable en la producción de alimentos, lo que conlleva a una sobreexplotación de los recursos. En la actualidad se están desarrollando variedades de cultivos con mayor producción y más resistentes a estreses ambientales y enfermedades. Sin embargo, todavía es necesario el uso masivo de fertilizantes químicos y pesticidas para suplementar nutrientes esenciales y reducir
20 los daños ocasionados por enfermedades en los sistemas de producción agrícola. El uso y abuso de fertilizantes y pesticidas químicos en agricultura está generando un enorme impacto medioambiental, contaminando suelos y acuíferos, lo que contribuye al cambio climático, que afecta negativamente a personas, ecosistemas y especies en todo el mundo. Por ello, existe una necesidad urgente de encontrar alternativas más
25 sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, que reduzcan la utilización de estos agroquímicos nocivos y sirvan para proteger a nuestros suelos, nuestro medioambiente y la salud humana.

Una estrategia que está tomando un gran auge a nivel mundial es el uso de
30 microorganismos beneficiosos con propiedades bioestimulantes que establecen asociaciones simbióticas con las plantas, y que mejoran significativamente los agroecosistemas y la productividad de los mismos. De entre estos microorganismos beneficiosos destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (pertenecientes al filo Glomeromycota), que forman asociaciones beneficiosas con más
35 del 80% de las especies vegetales terrestres, incluyendo la mayoría de las especies de

- interés agronómico e industrial (cereales, hortalizas, frutales, algodón, etc.), así como especies ornamentales y forestales. Estas simbiosis mutualistas se conocen como micorrizas arbusculares y tienen una antigüedad de unos 450 millones de años. Las micorrizas arbusculares se caracterizan por la formación de estructuras específicas
- 5 dentro de las raíces de las plantas hospedadoras conocidas como arbuscúlos. En los arbuscúlos tiene lugar el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedadora. En las micorrizas arbusculares, el hongo micorrícico arbuscular (MA) también desarrolla una gran red de hifas, conocido como micelio extrarradical, que explora una gran cantidad de suelo y que constituye la estructura asimilativa de agua
- 10 nutrientes minerales, funcionando como pseudoraíces. Además de la nutrición, las micorrizas arbusculares ofrecen otros beneficios a la planta hospedadora, entre los que se incluye una mejora de las respuestas de defensa frente a patógenos y una mayor tolerancia a estreses ambientales como sequía y salinidad.
- 15 Debido a todas estas propiedades, los hongos MA tienen un enorme potencial como bioestimulantes (biofertilizantes y agentes de bioprotección) en una agricultura más sostenible y equilibrada. Sin embargo, a pesar de su potencial, su aplicación en agricultura sigue siendo un reto debido a la variabilidad de los resultados cuando se aplican a los sistemas de producción, lo que dificulta su comercialización e
- 20 implementación. Los hongos MA son biótrofos obligados, por lo que dependen de una planta hospedadora para desarrollarse y completar su ciclo de vida. Esto dificulta enormemente que se produzcan inoculantes cuantificables y homogéneos. Además, estos inoculantes son no estériles y con posibles problemas de contaminación. Por ello, la mayoría de los productos de hongos MA del mercado están basados en esporas, más
- 25 fáciles de cuantificar y almacenar, con una mayor homogeneidad y con menor riesgo de contaminación. Sin embargo, la producción de esporas es costosa y éstas son más lentas a la hora de colonizar y micorrizar, disminuyendo así la efectividad de los inoculantes. Además, su implementación como bioestimulantes a nivel agronómico y forestal se está viendo dificultada por la variabilidad de sus resultados en campo. La
- 30 variabilidad de los resultados obtenidos con los inoculantes basados en hongos MA reside fundamentalmente en tres factores: a) las condiciones ambientales, b) la calidad y efectividad de los inoculantes empleados y c) las técnicas de manejo, especialmente la fertilización química.
- 35 En resumen, sería deseable disponer de unos productos comerciales basados en

hongos MA que fueran capaces de establecer la simbiosis micorrícica con plantas de forma fiable y estable, para poder así mejorar su efectividad en sistemas de producción.

En vista de lo anterior, existe en el estado de la técnica la necesidad de nuevos compuestos capaces de estimular el desarrollo y/o crecimiento de los hongos MA con el objetivo de mejorar su capacidad de micorrización y su uso en cultivos intensivos de una manera más respetuosa con el medioambiente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10

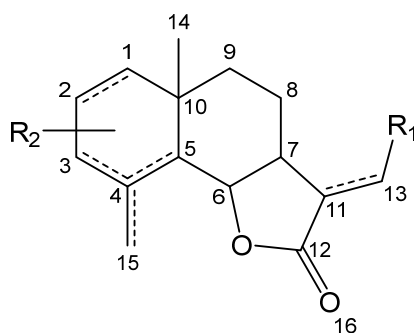
Mediante la realización de ensayos dirigidos a mejorar el desarrollo de plantas de interés agronómico y/o forestal en sistemas de producción, los inventores han observado que la aplicación de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida, mejora la productividad en plantas, favoreciendo el establecimiento de la simbiosis beneficiosa planta-hongo MA, y la eficiencia del fotosistema II.

En los ejemplos de la presente descripción se demuestra, mediante el uso de modelos *in vitro* e *in vivo*, que los compuestos definidos en las reivindicaciones mejoran la germinación de esporas y posterior desarrollo de hifas de hongos MA (Ejemplo 1) y la capacidad de micorrización del hongo MA (Ejemplos 2, 3, 4 y 5).

Por lo tanto, la presente invención describe el empleo de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida como agentes bioestimulantes del crecimiento de los hongos MA y de la formación de micorrizas arbusculares.

25

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende un compuesto de fórmula general (I) (de aquí en adelante “compuesto de la invención”):

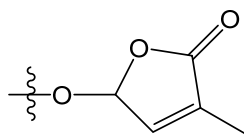


(I)

30

donde:

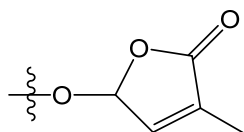
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



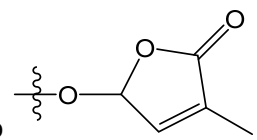
R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y

5 ----- representa un enlace sencillo o doble, con la condición de que:

- cuando el enlace 11,13 es sencillo, entonces R₁ es H, -OH, =O o,



- cuando el enlace 11,13 es doble, entonces R₁ es H o



10 - cuando un enlace seleccionado de entre 3,4; 4,15; o 4,5 es doble, los otros dos son enlaces sencillos; preferiblemente el enlace 4,15 es doble y los otros dos sencillos;

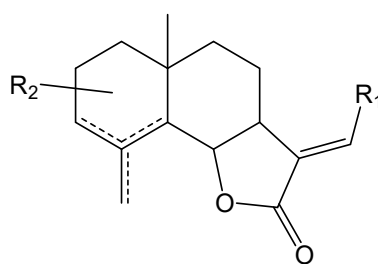
como agente bioestimulante de la germinación de hongos y de la micorrización.

15 En una realización preferida, cuando el enlace 1,2 es un enlace doble, el enlace 4,15 es doble y R₂ es H.

En otra realización preferida, R₂ está en la posición 1 del anillo y el enlace 1,2 es un enlace sencillo.

20 El término "alquil (C₁-C₅)" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo.

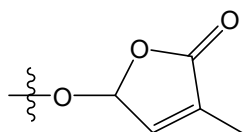
25 El radical R₁ del compuesto de fórmula general (I) puede ser cualquier elemento o grupo químico dentro de la lista indicada, y ----- del compuesto de fórmula general (I) puede ser un enlace sencillo o doble dentro de las condiciones indicadas. Sin embargo, en una realización preferida, el compuesto es de fórmula (Ia):



(Ia)

donde:

R₁ se selecciona de entre H, y el grupo:



5

R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y ----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

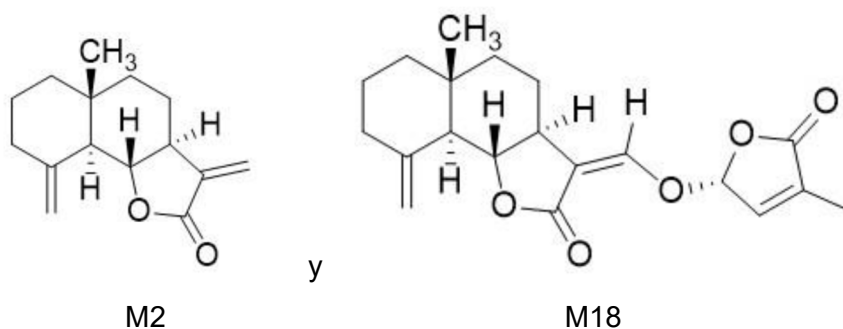
En una realización más preferida, R₂ del compuesto de fórmula (Ia) está en la posición 1 del anillo, más preferiblemente R₂ de la fórmula general (Ia) es H.

10

En otra realización preferida, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores, ----- del compuesto de fórmula (Ia) es un enlace doble en la posición 4,15.

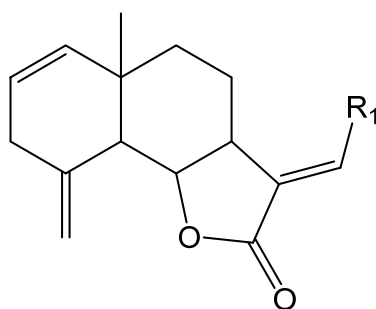
15

En otra realización preferida, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones anteriores, los compuestos de fórmula (Ia) se seleccionan de entre:



20

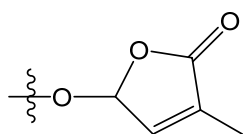
En otra realización preferida del uso del compuesto de fórmula general (I), el compuesto es de fórmula (Ib):



(Ib)

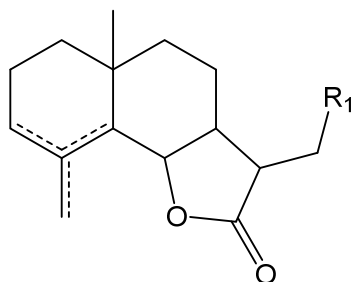
donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



5

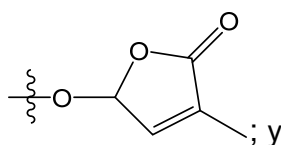
En otra realización preferida del uso del compuesto de fórmula general (I), el compuesto es de fórmula (Ic):



(Ic)

donde:

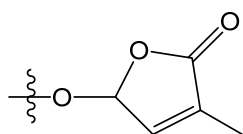
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

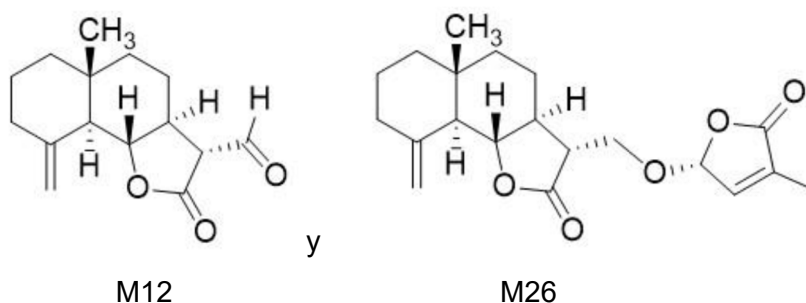
15

En una realización más preferida, R₁ del compuesto de fórmula (Ic) se selecciona de entre =O y el grupo:



En otra realización preferida, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores del compuesto de fórmula (Ic), ----- es un enlace doble en la posición 4,15.

- 5 En otra realización preferida, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores, el compuesto de fórmula (Ic) se selecciona de entre:



10

El compuesto de la invención está formando parte de una composición, dando lugar a la composición de la invención, la cual puede comprender uno o más compuestos que caen dentro de la fórmula general (I) y preferiblemente de los de fórmula general (Ia), (Ib), (Ic) o cualquiera de sus combinaciones. Asimismo, la composición de la invención

15 puede comprender un vehículo agrícolamente aceptable.

20

En la presente invención, se entiende por "vehículo agrícolamente aceptable", a todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adhesivos, aglutinantes, etc, que se utilizan habitualmente en la tecnología de formulación de composiciones agrícolas, y que son bien conocidos por los expertos la materia.

25

Por lo lado, la composición de la invención también puede comprender, adicionalmente al compuesto de la invención, otros compuestos útiles en el crecimiento y/o desarrollo de las plantas y hongos, tales como macro-/micronutrientes, fitohormonas, fertilizantes, pesticidas, herbicidas, etc.

30

Como entiende el experto en la materia, en la composición de la invención también pueden ir macro- y/o microelementos que proporcionen nutrientes a las plantas. Así, en una realización preferida, la composición de la invención comprende, además, macroelementos y/o microelementos.

Los macroelementos son aquellos elementos que se expresan como % en la planta o

- g/100g. Los principales son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Los microelementos se expresan como ppm (parte por millón) = mg/Kg = mg /1000g, y los principales son hierro, cinc, cobre, manganeso, molibdeno, boro y cloro. Se sabe que existen unos 27 elementos químicos que tienen funciones en la planta que, debido a
- 5 que la planta los requiere a unas concentraciones determinadas, hay que añadirlas al suelo. Existen además otros nutrientes benéficos como por ejemplo el silicio, el sodio y el cobalto que fortalecen algunas características de las plantas en diferentes especies. El experto en la materia sabe cuáles son los macro- y micronutrientes adecuados a añadir a la planta de interés para cubrir las necesidades de la misma.
- 10 Así, en una realización preferida, los macroelementos de la composición de la invención se seleccionan del grupo que consiste en sales de nitrógeno, sales de fósforo, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de azufre y combinación de ellos.
- 15 En otra realización preferida, los microelementos de la composición de la invención se seleccionan del grupo que consiste en sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de manganeso, sales de molibdeno, sales de boro, sales de cloro y combinaciones de ellos.
- 20 Las fitohormonas son sustancias producidas por las células vegetales que intervienen en multitud de procesos biológicos y que son capaces de regular los fenómenos fisiológicos de las plantas. Ejemplos de fitohormonas que puede emplearse en la composición de la invención incluyen, sin limitar a, auxinas, giberelinas, citocininas y etileno.
- 25 Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal (esencialmente provocan la elongación de las células) y pueden ser naturales (sintetizadas por una célula vegetal de manera silvestre) o artificiales (sintetizadas en el laboratorio). Ejemplos de auxinas naturales incluyen, sin limitar a,
- 30 ácido indol-3-acético (AIA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) y ácido fenilacético. Ejemplos de auxinas artificiales incluyen, sin limitar a, ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA).
- La giberelina es una fitohormona producida en la zona apical, frutos y semillas, cuyas
- 35 principales funciones son la interrupción del período de latencia de las semillas,

haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas y frutos y la regulación del crecimiento longitudinal del tallo. Ejemplos de giberelinas incluyen, sin limitar a, el ácido giberélico (GA3), giberelina A1 (GA1) y giberelina A4 (GA4).

- 5 Las citocininas son fitohormonas que promueven la división y la diferenciación celular. Ejemplos de citocininas incluyen, sin limitar a, la cis- y trans-zeatina, la isopenteniladenina, la dihidrozeatina (con sus respectivos derivados glicosilados), la benciladenina, la kinetina y la topolina. También se consideran citoquininas otros compuestos de origen no vegetal y derivados sintéticos de la difenilurea como el CPPU
10 y el tidiazuron (TDZ), que actúan como análogos estructurales de la molécula natural.

- En la presente invención se entiende por “fertilizante” al/los compuesto/s necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta, estando entre dichos componentes microorganismos (o sustancias producidas por los mismos) que proporcionan o mejoran
15 la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a la planta favoreciendo el desarrollo y crecimiento de la misma.

- Asimismo, la composición de la invención puede comprender organismos que pueden resultar beneficiosos para las plantas, tales como bacterias (incluyendo actinomicetos),
20 hongos, algas y protozoos. Ejemplos de dichos microorganismos incluyen, sin limitar a, hongos del género *Trichoderma* (tales como *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link fr, *T. reesei* EG Simmons, *T. virens*, *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. lignorum*, *T. citroviride*, etc.), micorrizas (*Glomus* sp., etc.), bacterias del género *Rhizobium* (tales como *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. hainanense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, , *R. lusitanum*, , *R. mongolense*, *R. phaseoli*, *R. rhizogenes*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. yanglingense*, etc.), del género *Neorhizobium* (*N. galegae*, *N. huautlense*, etc.), *Allorhizobium* (*A. undicola*), *Pararhizobium* (*P. giardinii*), *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. huakuii*, *M. tianshanense*, etc.),
25 *Ensifer* (*E. fredii*, *E. meliloti*, etc.), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. lupini*, etc.),
30 bacterias que colonizan tejidos vegetales internos (tales como *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Paenibacillus* sp, etc.), algas marinas (tales como *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Laminaria* sp., etc.), etc.

Los compuestos de la invención pueden estar dentro de la composición de la invención en un intervalo de concentración muy amplio, el cual puede variar en función de la planta, de la estación del año en que sea administrada, de la presencia de otros componentes en la composición. El experto en la materia, según las necesidades del cultivo, y base a su conocimiento general común, sabe determinar la concentración necesaria para que el compuesto de la invención ejercía su acción de estimular la germinación de hongos y la micorrización. No obstante, en una realización preferida de la composición de la invención, el compuesto de la invención está en una concentración de entre 10 y 1000 nM.

En otra realización todavía más preferida de la composición de la invención, el compuesto de la invención está en una concentración de entre 100 y 500 nM.

Tal como se ha explicado al comienzo de la presente descripción, el compuesto de la invención mejora la productividad en plantas, favoreciendo el establecimiento de la simbiosis beneficiosa planta-hongo MA, y la eficiencia del fotosistema II.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el compuesto de la invención favorece la eficiencia del fotosistema II (PSII). El PSII es un complejo de proteínas de membrana presente en las membranas de los tilacoides de las plantas superiores y las algas, y que desempeña un papel fundamental durante la fotosíntesis. Por tanto, la cuantificación de la eficiencia fotoquímica del PSII es una variable utilizada para detectar el nivel de estrés en las plantas y está relacionada con la promoción del crecimiento de las mismas.

Así, la composición de la invención que comprende el compuesto de la invención puede administrarse a una planta para favorecer la productividad de la misma mediante la estimulación de la germinación de los hongos MA y/o la estimulación de la micorrización. Por lo tanto, en una realización preferida de la composición de la invención, la composición es administrada a una planta. Cualquier planta micorrícica, más del 80% de las plantas terrestres, incluyendo las plantas de interés agronómico, puede beneficiarse de los efectos de la composición de la invención.

En la presente invención se entiende por "planta", a cualquier ser vivo autótrofo y fotosintético, cuyas células poseen pared compuesta principalmente de celulosa y carecen de capacidad locomotora. En una realización preferida del uso de la invención, las plantas se seleccionan entre plantas de cultivo y plantas ornamentales.

Ejemplos de plantas de cultivo incluyen, sin limitar a, cereales (tales como arroz, maíz,

trigo, escanda, cebada, avena, quinua, trigo, centeno, espelta, etc.), hortalizas (tales como zanahoria, acelga, espinaca, remolacha, apio, apio nabo, chirivía, perejil, berenjena, patata, pimiento, tomate, ajo, ascalonia, cebolla, espárrago, puerro, acelga, borraja, endibia, escarola, hierba de los canónigos, lechuga, champiñón, guisante, haba, judía verde, calabacín, calabaza, pepino, alcachofa, boniato, brócoli, col blanca, col china, col de Bruselas, col de Milán, col lombarda, coliflor, colinabo, colirábano, nabo, rábano, etc.), plantas de tabaco y plantas de girasol. Otro tipo de plantas cuyo crecimiento puede incrementarse son los árboles frutales, tales como naranjos, manzanos, perales, etc., o frutales de baya, tales como fresas, frambuesas, arándanos, grosellas, etc. Ejemplos de plantas ornamentales incluyen, sin limitar a, claveles, rosas, tulípanes, flores de pascua y geranios.

En una realización preferida de la invención, las plantas de cultivo son plantas no leguminosas. En la presente invención, se entiende por “planta no leguminosa” a todas aquellas plantas que no pertenecen a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae* dentro del orden *Fabales*. Dentro de las plantas no leguminosas, una de las que presentan mayor interés agronómico es la familia de las solanáceas, dentro de las cuales se encuentra el tomate.

No obstante, en otra realización preferida, la planta es una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) o una planta de lechuga (*Lactuca sativa*).

Como se ha explicado en párrafos anteriores, la concentración del compuesto de la invención en la composición de la invención puede variar en función de la planta. Así, en una realización preferida, la concentración del compuesto de formula M2 es de 10, 100 o 1000 nM cuando la composición es administrada a plantas de tomate como agente bioestimulante de la germinación de hongos y de la micorrización, favoreciendo con ellos el crecimiento de la planta de tomate.

En otra realización preferida, la concentración del compuesto de formula M2 es de 10 nM cuando la composición es administrada a plantas de lechuga como agente bioestimulante de la germinación de hongos y de la micorrización, favoreciendo con ello el crecimiento de la planta de lechuga.

En otra realización preferida, la concentración del compuesto de formula M12 es de 10

o 100 nM cuando la composición es administrada a plantas de tomate como agente bioestimulante de la germinación de hongos y de la micorrización, favoreciendo con ello el crecimiento de la planta de tomate.

5 En otra realización preferida, la concentración del compuesto de formula M12 es de 10 o 100 nM cuando la composición es administrada a plantas de lechuga como agente bioestimulante de la germinación de hongos y de la micorrización, favoreciendo con ello el crecimiento de la planta de lechuga.

10 La composición de la invención puede presentarse en forma líquida o en forma sólida, dependiendo de la forma de administración que vaya a emplearse. Puede aplicarse directamente al suelo antes o después de la siembra del cultivo, mediante aspersión o en el surco de la siembra o sobre toda la superficie. Otra posibilidad es aplicar la composición a la semilla antes de ser sembrada. Las dosis y épocas de aplicación de la
15 composición durante el ciclo del cultivo dependerán de la concentración de los compuestos de la invención y/o del tipo de cultivo. Técnicas sobre cómo administrar composiciones y la cantidad a administrar son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y su uso es práctica de rutina para el experto en la materia.

20 Así, en una realización preferida de la invención, la composición es administrada al suelo de la planta.

En una realización preferida, la composición de la invención está formulada en forma líquida, o en forma sólida.

25

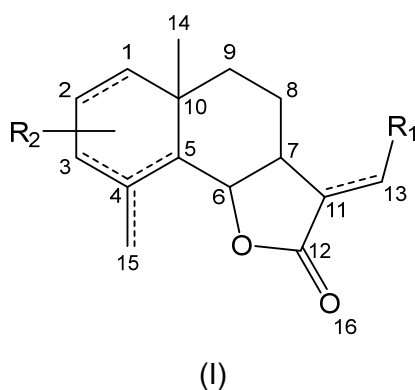
Las formas de presentación líquidas son adecuadas para su pulverización sobre el suelo, la planta o el material vegetal, o bien para crear una solución en la que se sumergen las plantas o el material vegetal. Alternativamente, las composiciones se pueden encontrar en forma sólida mediante liofilización y posterior paletización de las
30 mismas, las cuales pueden ser aplicadas directamente al suelo o resuspendidas en soluciones, preferentemente acuosas.

De forma análoga al uso de la invención, y debido a las propiedades de los compuestos de la invención, en la presente descripción también se contempla un método para
35 estimular la germinación de hongos y/o la micorrización de plantas por los hongos, lo

que genera que un mayor crecimiento de las plantas y una mejora del rendimiento de las mismas, es decir, mejora la cantidad de biomasa por planta, el tamaño y el número de frutos por planta, etc.

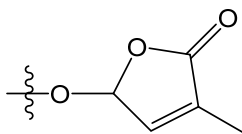
- 5 Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para estimular la germinación de hongos y/o la micorrización de plantas por los hongos, de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende:

- 10 (a) poner en contacto el hongo o la raíz de la planta, con una composición que comprende un compuesto de formula general (I), descrito previamente en el primer aspecto de la invención:



donde:

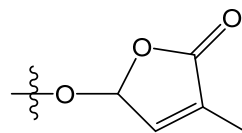
- 15 R_1 se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



R_2 se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C_1 - C_5); y

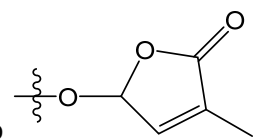
----- representa un enlace sencillo o doble, con la condición de que:

- cuando el enlace 11,13 es sencillo, entonces R_1 es H, -OH, =O o



20

- cuando el enlace 11,13 es doble, entonces R_1 es H o



- si un enlace seleccionado de entre 3,4; 4,15; o 4,5 es doble, los otros dos son enlaces sencillos;

y

(b) desarrollar el hongo y/o la planta de la etapa (a).

En una primera etapa, el método de la invención comprende poner en contacto una
 5 planta o la semilla procedente de dicha planta con la composición de la invención tal
 como se ha definido en párrafos anteriores. La planta (o la semilla de la misma) puede
 ponerse en contacto con la composición de la invención por cualquier técnica conocida,
 como por ejemplo, pero sin limitarse a, a través de hidroponía, a través de una solución
 aplicada al suelo, por medio de la aplicación de la cepa o composición por pulverización,
 10 rociado, revestimiento, fumigación o impregnación de cualquier parte aérea de la planta
 o de la semilla, mediante la introducción de la composición de la invención en el agua
 de riego, mediante la germinación de semillas de la planta en presencia de dicha
 composición, mediante cultivo de material vegetal *in vitro* en contacto con la
 composición de la invención, o mediante inmersión de la raíz de la planta en una
 15 solución que comprende la composición de la invención.

Así, en una realización preferida del método de la invención, la puesta en contacto entre
 la planta (o la semilla procedente de la misma) y la composición de la invención, se lleva
 a cabo mediante el agua de riego, pulverización, rociado, revestimiento, fumigación,
 20 inmersión o impregnación.

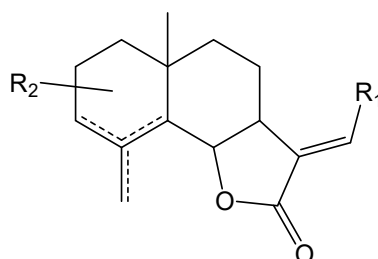
En una segunda etapa, el método de la invención comprende desarrollar la planta (o la
 semilla) de la etapa (a). Dicho desarrollo comprende proporcionar a la planta (o la
 semilla) las condiciones adecuadas de luz, temperatura, humedad, nutrientes, etc. para
 25 que la planta crezca (o para que la semilla germine y de lugar a una planta). Las
 condiciones adecuadas de crecimiento para las distintas plantas de cultivo pueden
 encontrarse en manuales ampliamente conocidos por el experto en la materia y
 disponibles al público.

30 En otra realización preferida, cuando el enlace 1,2 es un enlace doble, el enlace 4,15 es
 doble y R₂ es H.

En otra realización preferida, R₂ está en la posición 1 del anillo y el enlace 1,2 es un
 enlace sencillo.

35

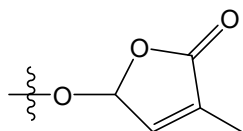
En una realización preferida del método de la invención, el compuesto es de fórmula (Ia):



(Ia)

5 donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y

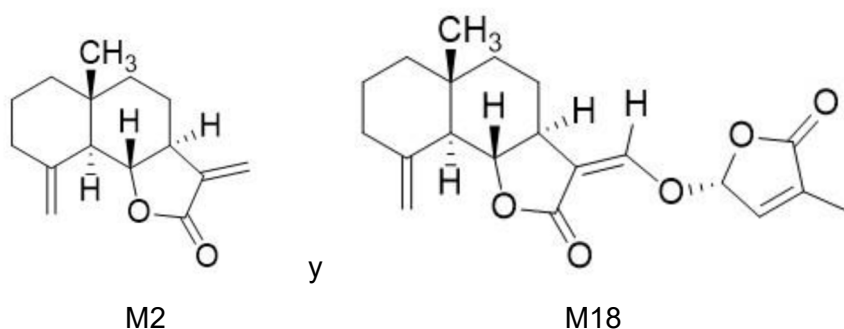
10 ----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

En otra realización preferida del método de la invención, R₂ del compuesto de fórmula (Ia) está en la posición 1 del anillo, más preferiblemente R₂ de la fórmula general (Ia) es H.

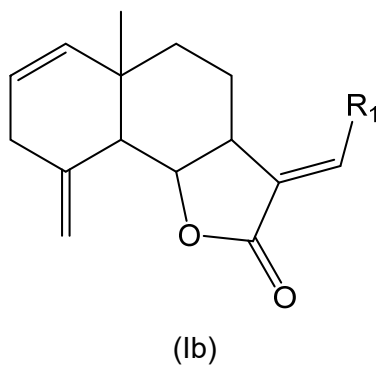
15

En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores, ----- del compuesto de fórmula (Ia) es un enlace doble en la posición 4,15.

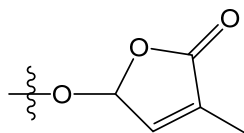
20 En otra realización preferida del método de la invención, los compuestos de fórmula (Ia) se seleccionan de entre:



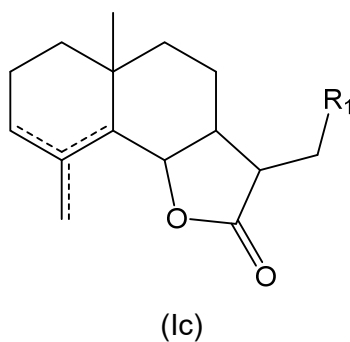
En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto es de fórmula (Ib):



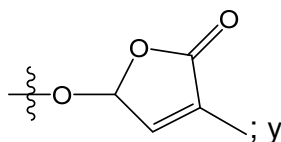
5 donde:
R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



10 En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto es de fórmula (Ic):



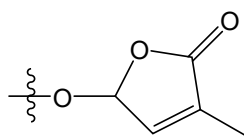
donde:
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



15 ----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

En una realización más preferida del método de la invención, R₁ del compuesto de fórmula (Ic) se selecciona de entre =O y el grupo:

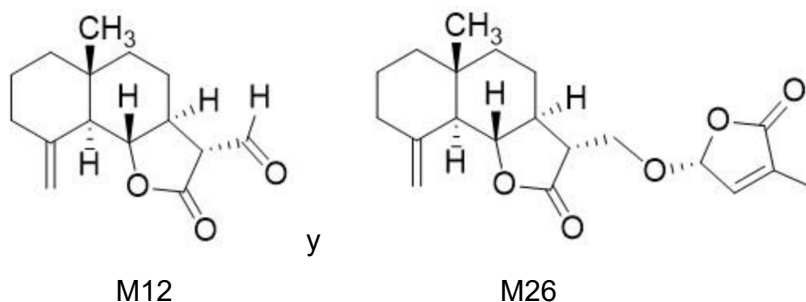
20



En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores del compuesto de fórmula (Ic),  es un enlace doble en la posición 4,15.

En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con todas y cada una de las realizaciones preferidas anteriores, el compuesto de fórmula (Ic) se selecciona de entre:

10



En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto está en una concentración de entre 10 y 1000 nM.

En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto está en una concentración de 100 y 500 nM.

En otra realización preferida del método de la invención, la planta es una planta de lechuga, o una planta de tomate.

En otra realización preferida del método de la invención, la composición es administrada al suelo que rodea la planta.

25

En otra realización preferida del método de la invención, la composición está formulada en forma líquida, en forma sólida o en forma hidropónica.

Todos los términos empleados en el método de la invención, así como todas las realizaciones preferidas del método de la invención, han sido explicados previamente en

30

relación con el uso de la invención, y son de aplicación al método de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** Estructuras moleculares de la eudesmanólida M2 (A), y de varios compuestos derivados de la eudesmanólida M2: M12 (B), M18 (C) y M26 (D). Y estructura de la de la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 (E), utilizados en la presente invención.

10 **Figura 2.** Cuantificación de los niveles de germinación de esporas del hongo MA *Rhizophagus irregularis* in vitro. Efecto de la aplicación exógena de las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida M2, M12 M18, y M26 (10, 100 y 1000 nM). Las barras representan el incremento relativo de germinación frente al control sin tratar. La aplicación de la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 fue usada como control positivo. Las barras corresponden a la media de 5 réplicas (15 esporas/réplica) independientes
15 $\pm$ el error estándar. Análisis estadístico T-test entre cada tratamiento comparado con el control sin tratar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 3. Cuantificación de los niveles de micorrización del hongo MA *Rhizophagus irregularis* en plantas de lechuga (cv. Maureen) (A) y tomate (cv. MoneyMaker) (B).
20 Efecto de la aplicación exógena de las eudesmanólidas M2 y M12 (10 y 100 nM). Las barras representan el incremento relativo de micorrización frente plantas control sin tratar (C). La aplicación de la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 se usó como control positivo. Las barras corresponden a la media de 10 réplicas independientes $\pm$ el error estándar. Análisis estadístico T-test entre cada tratamiento comparado con el control sin
25 tratar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 4. Cuantificación de la eficiencia del fotosistema II [Y(II)] en hojas de lechuga (cv. Maureen) (A) y tomate (cv. MoneyMaker) (B), en plantas micorrizadas con el hongo MA *Rhizophagus irregularis*. Efecto de la aplicación exógena de las eudesmanólidas M2 y
30 M12 (10 y 100 nM). Las barras representan el incremento en el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (PSII) frente a plantas control no micorrizadas (Nm) y sin micorrizadas sin tratar (C). La aplicación de la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 se usó como control positivo. Las barras corresponden a la media de 10 réplicas independientes $\pm$ el error estándar. Análisis estadístico T-test entre cada tratamiento
35 comparado con el control sin tratar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 5. Cuantificación de los niveles de micorrización del hongo MA *Rhizophagus irregularis* en plantas tomate comerciales en condiciones de producción. Se utilizaron dos variedades diferentes: el tomate pera chocolate (A) el portainjerto Kardia (B). Efecto de la aplicación exógena de la eudesmanólida M2 (10, 100 y 1000 nM). Las barras representan el incremento relativo de micorrización frente plantas control sin tratar. La aplicación de la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 se usó como control positivo. Las barras corresponden a la media de 10 réplicas independientes $\pm$ el error estándar. Análisis estadístico T-test entre cada tratamiento comparado con el control sin tratar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante los experimentos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la capacidad de las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida para estimular la germinación de las esporas del hongo MA *R. irregularis* in vitro, así como la micorrización en plantas de lechuga y tomate crecidas en alveolos y maceta.

Ejemplo 1. Estudios de estimulación de la germinación de esporas del hongo MA *R. irregularis* in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron una serie de experimentos in vitro de germinación de esporas del hongo MA *R. irregularis* (MUCL 57021), tras la aplicación exógena de diferentes lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida con el objeto de determinar su capacidad estimuladora de la germinación.

Se utilizaron diferentes concentraciones de los compuestos para evaluar su efecto y la dosis más efectiva. Los experimentos se llevaron a cabo en placas Petri de 90 mm de diámetro con 35 ml de medio agar (2%) en agua desionizada en condiciones de esterilidad. Para la preparación de los diferentes eudesmanólidas utilizadas, se prepararon disoluciones stock (1 mM) disolviendo los diferentes compuestos en acetona (100%). Previamente a su aplicación a las placas Petri, se prepararon las correspondientes diluciones seriadas de las eudesmanólidas en agua desionizada estéril a una concentración final de acetona en placa del 1%. Previamente a la adición

a las placas Petri, todas las diluciones de eudesmanólidas M2, M12, M18 y M26 (Figura 1) fueron esterilizadas mediante filtros de 0.22 μm . Seguidamente, en una campana de flujo laminar, se añadieron 50 μl de cada dilución por placa y se extendieron de forma homogénea por toda la superficie del agar utilizando un asa de siembra.

5

Para descartar el posible efecto de la acetona en la germinación de las esporas, en todos los ensayos se incluyeron controles con 1% acetona en agua desionizada estéril. Como en el caso de los tratamientos, a las placas control se les añadió 50 μl . Las placas se mantuvieron abiertas durante 1 hora para permitir la absorción de los compuestos añadidos. Posteriormente, se añadió una solución de 15 esporas axénicas (esterilizadas) por placa de *R. irregularis*. Las placas se sellaron e incubaron a 25°C en oscuridad. La germinación de las esporas se evaluó diariamente. Se probaron tres concentraciones diferentes de las diferentes eudesmanólidas, siempre dentro del rango de concentración fisiológico en el que se encuentran en la planta, y su correspondiente control. Las concentraciones utilizadas fueron 0, 10, 100 y 1000 nanomolar (nM) y se utilizaron 5 réplicas independientes por tratamiento [5 placas con 15 esporas por placa (75 esporas por tratamiento)].

Dado que las estrigolactonas tienen la capacidad de estimular la ramificación y el desarrollo de las hifas de los hongos MA, la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 se incluyó como control positivo de germinación en todos los estudios (Figura 1E). La germinación de las esporas se examinó diariamente a partir del tercer día. En este primer ensayo, se cuantificaron los niveles de germinación 7 días después de la aplicación de las diferentes eudesmanólidas.

25

RESULTADOS

2'-*epi*-GR24 indujo la germinación de esporas a las tres concentraciones utilizadas, indicando que éstas eran viables (Figura 2). Las cuatro eudesmanólidas ensayadas (M2, M12, M18 y M26) también estimularon la germinación de las esporas de *R. irregularis* significativamente ($p < 0.01$) con respecto al tratamiento control sin tratar. En el caso del M2, se observó una inducción de 6.5 veces (650%) tras la aplicación de 100 nM con respecto al control sin tratar (Figura 2A). En el caso del compuesto M12, se detectó una inducción de 3.2 veces (320%) tras la aplicación de 10 nM con respecto al control (Figura 2A). En el caso del compuesto M18, se observó un aumento en los niveles de

35

germinación de 4.0 veces (400%) tras la aplicación de 100 nM respecto al control sin tratar (Figura 2B). Y tras la aplicación del compuesto M26, se detectó un aumento de 3.0 (300%) tras la aplicación de 100 nM con respecto al control sin tratar (Figura 2B). Los resultados demuestran que las cuatro lactonas sesquiterpénicas estudiadas tienen la capacidad de promover la germinación de las esporas del hongo MA *R. irregularis* (MUCL 57021) por encima del 300%, aunque los cuatro no presentan la misma capacidad de inducción. También se observaron diferencias entre las diferentes concentraciones utilizadas, siendo en todos los casos las concentraciones más bajas (10 y 100 nM) las más eficientes.

Estos resultados muestran que lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida M2, M12, M18 y M26 (Figura 1) funcionan como moléculas señal en la rizosfera utilizadas por la planta para favorecer la colonización por parte de los hongos MA.

Ejemplo 2. Evaluación de la estimulación de micorrización del hongo MA *R. irregularis* en maceta en plantas de lechuga y tomate

MATERIALES Y MÉTODOS

Tras los resultados obtenidos *in vitro*, se realizaron una serie de experimentos para determinar si la mayor capacidad de germinación de las esporas del hongo MA observada tras los tratamientos tenía como consecuencia una mayor micorrización de plantas de interés agronómico. Para ello se usaron plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) como hospedadores, y esporas del hongo MA *R. irregularis* (MUCL 57021). El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de estimular la micorrización de las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmonólidas ensayados en el estudio anterior. Para ello, se seleccionaron los compuestos M2 y M12 (Figura 2), por ser los que mejores datos de germinación mostraron. Semillas de lechuga (*L. sativa* cv Maureen) y tomate (*S. lycopersicum* cv MoneyMaker), fueron esterilizadas en superficie con 50% de lejía comercial durante 10 min, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, las semillas se sembraron en vermiculita esterilizada y se incubaron a 25°C en un fitotrón para su germinación. Plántulas de diez días se trasplantaron individualmente a alveolos de 100 ml con arena:vermiculita (1:1) estéril. Para cada genotipo, las plantas fueron inoculadas con 675 esporas del hongo

MA *R. irregularis* (plantas Ri). Como control de micorrización, se incluyó un set de plantas sin inocular con el hongo MA. Las plantas Ri fueron tratadas con las eudesmanólidas M2 y M12, a dos concentraciones diferentes 10 y 100 nM. Como control positivo, se incluyó el tratamiento con la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24 (Akiyama *et al.*, 2005). También se incluyeron controles negativos con plantas Ri sin tratar con ningún compuesto (Control).

Para la aplicación de los diferentes compuestos (eudesmanólidas y 2'-*epi*-GR24), se prepararon disoluciones stock (1 mM) en acetona al 100%. Previamente a su adición, se prepararon las correspondientes diluciones seriadas de los diferentes compuestos en solución nutritiva de Hewitt, a una concentración final de acetona del 1‰. Para favorecer la micorrización se utilizó solución Hewitt modificada, conteniendo un 25% de los niveles estándares de fosfato. Las plantas se trataron 2 veces por semana con los diferentes compuestos, utilizando un volumen de 10 ml. Los tratamientos control (sin tratar) se regaron también dos veces por semana con 10 ml de acetona al 1‰. Se utilizaron 10 réplicas independientes por tratamiento. Los niveles de micorrización se evaluaron a las 6 semanas del trasplante.

RESULTADOS

No se observó ningún efecto negativo en el crecimiento o desarrollo de las plantas tras la adición de los diferentes compuestos.

El tratamiento con 2'-*epi*-GR24 (control positivo) 10 nM mejoró ligeramente los niveles de micorrización de las esporas de *R. irregularis* con respecto al tratamiento control sin tratar, aunque no de forma significativa (Figuras 3A y B), tanto en lechuga como en tomate. Con respecto al tratamiento con eudesmanólidas, los dos compuestos estudiados (2 y 12) también mejoraron los niveles de micorrización de las esporas de *R. irregularis* significativamente ($p < 0.01$) con respecto al tratamiento control sin tratar en ambos cultivos. En el caso de lechuga, el compuesto M2 incrementó los niveles de micorrización 2.4 veces (240%) tras la aplicación de 10 nM (Figura 3A). En el caso de la concentración 100 nM no se observó cambio en los niveles de micorrización. El tratamiento con el compuesto M12, el tratamiento con 100 nM estimuló la micorrización 2.5 veces (250%) ($p < 0.05$) (Figura 3A). El tratamiento con 10 nM también estimuló la micorrización 1.9 veces (190%), aunque este aumento no fue estadísticamente

significativo (Figura 4A).

Resultados más claros se obtuvieron en plantas de tomate. La eudesmanólida M2 estimuló los niveles de micorrización 4.2 (420%) y 4.1 veces (410%) cuando se aplicó a 10 (p < 0.001) y 100 nM (p < 0.01), respectivamente (Figura 3B). El compuesto M12 aumentó la micorrización de forma significativa 2.8 veces (280%) cuando se aplicó a 10 nM (Figura 3B). No se observó un efecto en micorrización a la concentración de 100 nM.

Estos resultados muestran que las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida funcionan como moléculas señal en la rizosfera y que, por tanto, pueden ser aplicadas exógenamente a concentraciones fisiológicas para estimular la germinación de esporas de hongos MA y favorecer la micorrización.

Ejemplo 3. Estudio de los beneficios de la aplicación de eudesmanólidas y de la micorrización en plantas de lechuga y tomate.

Se analizaron varios parámetros fisiológicos en las plantas tratadas con los compuestos M2 y M12, y micorrizadas con el hongo MA *R. irregularis*, del experimento descrito en el estudio 2. Uno de los parámetros analizados fue la eficiencia fotosintética del fotosistema II [Y(II)], una medida utilizada para evaluar el nivel de estrés de la planta. Los niveles de Y(II) fueron medidos en hojas de lechuga y tomate de 6 semanas, utilizando el analizador de rendimiento de fotosíntesis miniPAM II (Walz).

RESULTADOS

La micorrización con el hongo MA *R. irregularis* mejoró la eficiencia fotosintética en todos los casos, indicando un menor nivel de estrés en las plantas micorrizadas. En el caso de lechuga, se observó un aumento de un 12% con respecto a la condición control sin micorrizar (C) (Figura 4A). El tratamiento con 2'-*epi*-GR24 (control positivo) 10 y 100 nM mejoró los niveles de Y(II) un 25% (p < 0.001), respectivamente. Los tratamientos con eudesmanólidas también mejoraron los resultados con respecto a los de plantas micorrizadas sin tratar. El tratamiento con 10 nM el compuesto M2 indujo un aumento de la eficiencia fotosintética del 33% y el tratamiento con 10 nM del 27% (p < 0.001) con respecto a las plantas control (Figura 5A). En el caso del compuesto M12, el tratamiento con 10 nM indujo un aumento de Y(II) del 23% (p < 0.001) con respecto a las plantas

control, y el tratamiento con 100 nM un aumento de 17% ($p < 0.01$) (Figura 4A).

En el caso de plantas de tomate, se observaron unos aumentos mayores de la eficiencia fotosintética en plantas micorrizadas con el hongo MA *R. irregularis*, detectándose una mejora del 35% (Figura 5B). Los tratamientos con eudesmanólidas, también mejoraron los niveles de Y(II) en mayor medida que en el caso de lechuga. El tratamiento con 2'-epi-GR24 (control positivo) 10 y 100 nM mejoró los niveles de Y(II) un 50% y un 61% ($p < 0.001$), respectivamente. El tratamiento con 10 nM el compuesto M2 indujo un aumento de la eficiencia fotosintética del 57% y el tratamiento con 10 nM del 65% ($p < 0.001$) con respecto a las plantas control (Figura 5B). En el caso del compuesto M12, el tratamiento con 10 nM indujo un aumento de Y(II) del 59% con respecto a las plantas control, y el tratamiento con 100 nM un aumento de 32% ($p < 0.01$) (Figura 4B).

Estos resultados muestran que las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida aplicadas exógenamente a concentraciones fisiológicas mejoran los niveles de micorrización en plantas de lechuga y tomate, que, además, su adición mejora la eficiencia del fotosistema II de la planta, reduciendo así el nivel de estrés.

Ejemplo 4. Evaluación de la estimulación de micorrización del hongo MA *R. irregularis* en maceta en cultivares comerciales de plantas de tomate.

En base a los resultados micorrización *in planta* obtenidos en lechuga y tomate, se realizó un nuevo experimento de micorrización con una variedad de tomate comercial. Se usaron plantas de tomate de la variedad pera chocolate (Albenga) (Unigen Seeds), suministradas por la cooperativa Hortoventas, y esporas del hongo MA *R. irregularis* (MUCL 57021). Las semillas de tomate fueron esterilizadas en superficie con 50% de lejía comercial durante 10 min, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, las semillas se sembraron en vermiculita esterilizada y se incubaron a 25°C en un fitotrón para su germinación. Plántulas de diez días se trasplantaron individualmente a alveolos de 100 ml con arena:vermiculita (1:1) estéril. Las plantas fueron inoculadas con 300 esporas del hongo MA *R. irregularis* (plantas Ri). Como control de micorrización, se incluyó un set de plantas sin inocular con el hongo MA. Las plantas Ri fueron tratadas con M2 (10 y 100 nM), por ser la que mejores resultados dio en los ensayos anteriores. Plantas de 30 días se trasplantaron individualmente a macetas de 0.5 L con arena:vermiculita (1:1) estéril. Se incluyeron controles negativos

con plantas Ri sin tratar con ningún compuesto (Control). No se observó ningún efecto negativo en el crecimiento o desarrollo de las plantas tras la adición del compuesto. Para la aplicación de la eudesmanólida 2, se preparó una disolución stock (1 mM) en acetona al 100%. Previamente al tratamiento, se prepararon las correspondientes diluciones
 5 seriadas del compuesto en agua destilada a una concentración final de acetona del 1%. Las plantas se trataron 2 veces por semana, utilizando un volumen de 10 ml por planta. Los tratamientos control (sin tratar) se regaron también una vez por semana con 10 ml de acetona al 1‰. Se utilizaron 10 réplicas independientes por tratamiento. Los niveles de micorrización se evaluaron a las 7 semanas después del trasplante.

10

RESULTADOS

El tratamiento con M2 incrementó los niveles de micorrización en la variedad comercial pera chocolate 1.7 veces (170%; $p < 0.05$) tras la aplicación de 10 nM (Figura 5A). Un
 15 aumento similar de 1.5 veces (150%; $p < 0.05$) se observó tras la aplicación de 100 nM (Figura 5A).

Estos resultados muestran que las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida pueden ser aplicadas exógenamente a concentraciones fisiológicas para estimular la
 20 germinación de esporas de hongos MA y favorecer la micorrización en plantas de tomate de interés comercial.

EJEMPLO 5. Experimentos de estimulación de micorrización del hongo MA *R. irregularis* en condiciones de producción de plantas de tomate en vivero.

25

MATERIALES Y MÉTODOS

En España, el 90% de las plantas de tomate se comercializan de forma injertada en una variedad vigorosa y resistente a diferentes enfermedades y plagas (portainjertos) (Thies,
 30 2021). Por ello, en este ensayo se usaron plantas de tomate de la variedad Kardia (Syngenta), comúnmente utilizada como portainjertos, en condiciones de crecimiento en vivero y esporas del hongo MA *R. irregularis* (MUCL 57021). Las semillas de tomate fueron sembradas en alveolos de 35 ml con turba y se incubaron a 25°C en una cámara de germinación en un vivero comercial. Las plantas fueron inoculadas con 300 esporas
 35 del hongo MA *R. irregularis* (plantas Ri). Como control de micorrización, se incluyó un

set de plantas sin inocular con el hongo MA. Las plantas Ri fueron tratadas con la eudesmanólida 2 (1000 nM). Plantas de 30 días se trasplantaron individualmente a macetas de 0.5 L con arena:vermiculita (1:1) estéril. Como control positivo, se incluyó el tratamiento con la estrigolactona sintética 2'-*epi*-GR24. También se incluyeron controles negativos con plantas Ri sin tratar con ningún compuesto (Control).

Para la aplicación de los diferentes compuestos (eudesmanólida M2 y 2'-*epi*-GR24) se prepararon disoluciones stock (1 mM) en acetona al 100%. Previamente al tratamiento, se prepararon las correspondientes diluciones seriadas de los compuestos en agua destilada a una concentración final de acetona del 1%. Las plantas se trataron 1 vez por semana con los diferentes compuestos, utilizando un volumen de 10 ml por planta. Los tratamientos control (sin tratar) se regaron también una vez por semana con 10 ml de acetona al 1%. Se utilizaron 10 réplicas independientes por tratamiento. Los niveles de micorrización se evaluaron a las 8 semanas.

15

RESULTADOS

No se observó ningún efecto negativo en el crecimiento o desarrollo de las plantas tras la adición del compuesto.

20

El tratamiento con 2'-*epi*-GR24 (control positivo) 100 nM mejoró los niveles de micorrización de las esporas de *R. irregularis* 2.0 veces (200%; $p < 0.05$) con respecto al tratamiento control sin tratar (Figura 5B). El tratamiento con M2 (1000 nM) aumentó los niveles de micorrización de las esporas de *R. irregularis* 3.2 veces (320%; $p < 0.001$) con respecto al tratamiento control sin tratar (Figura 5B).

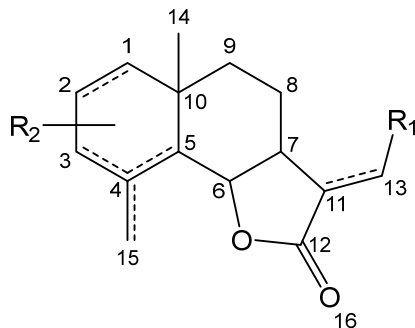
25

Estos resultados muestran que las lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida estimulan la germinación de esporas de hongos MA y favorecen la micorrización en variedades comerciales de tomate utilizadas como portainjertos en condiciones de producción en vivero.

30

REIVINDICACIONES

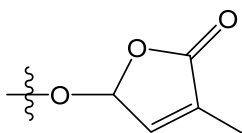
1. Uso de una composición que comprende un compuesto de formula general (I):



(I)

donde:

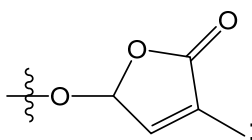
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y

----- representa un enlace sencillo o doble, con la condición de que:

- cuando el enlace 11,13 es sencillo, entonces R₁ es H, -OH, =O, o



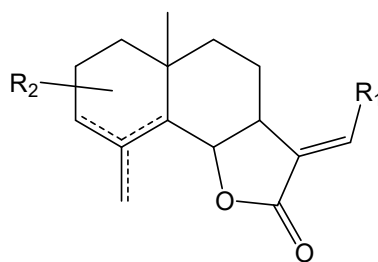
- cuando el enlace 11,13 es doble, entonces R₁ es H o

- cuando un enlace seleccionado de entre 3,4; 4,15; o 4,5 es doble, los otros

dos son enlaces sencillos;

como agente bioestimulante de la germinación de hongos y/o de la micorrización.

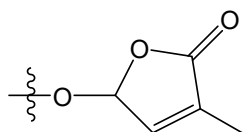
2. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula (Ia):



(Ia)

donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:

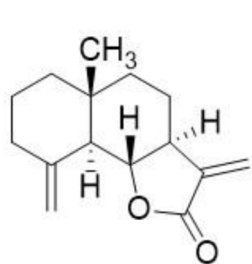


5

R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y

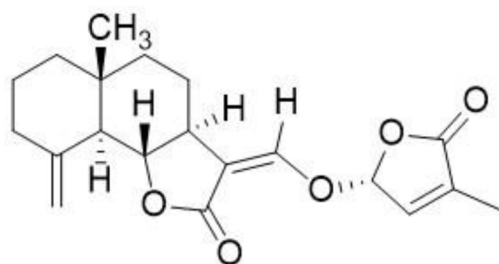
----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

- 10 3. Uso según la reivindicación 2, donde R₂ es H.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde ----- es un enlace doble en la posición 4,15.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde los compuestos de fórmula (Ia) se seleccionan de entre:



M2

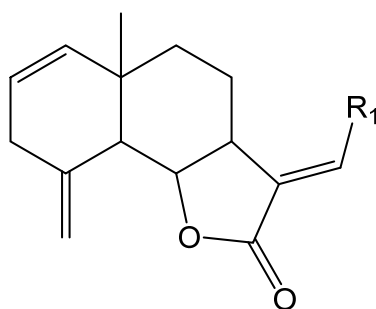
y



M18

20

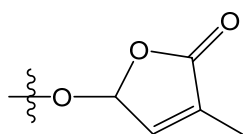
6. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula (Ib):



(Ib)

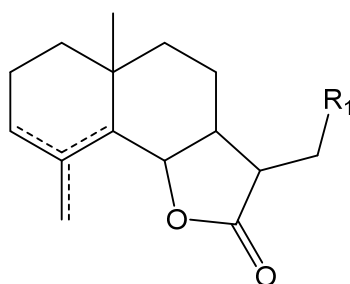
donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



5

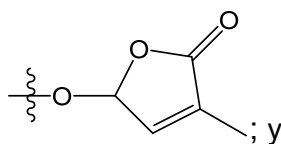
7. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula (Ic):



(Ic)

donde:

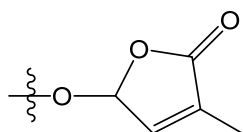
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

15

8. Uso según la reivindicación 7, donde R₁ se selecciona de entre =O y el grupo:

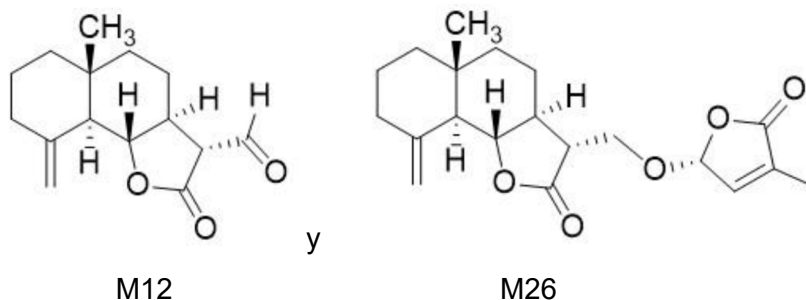


9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, donde ----- es un enlace

doble en la posición 4,15.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde los compuestos se seleccionan de entre:

5



11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el compuesto está en una concentración de entre 10 y 1000 nM.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el compuesto está en una concentración de 100 y 500 nM.

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la composición es administrada a una planta.

14. Uso según la reivindicación 13, en donde la planta es una planta de lechuga, o una planta de tomate.

20

15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la composición es administrada al suelo de la planta.

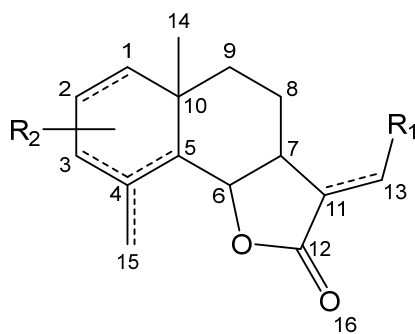
16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la composición está formulada en forma líquida, en forma sólida o de forma hidropónica.

25

17. Método para estimular la germinación de hongos y/o la micorrización de plantas por los hongos, que comprende:

(a) poner en contacto el hongo o la raíz de la planta, con una composición que comprende un compuesto de fórmula general (I):

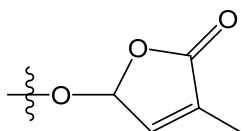
30



(I)

donde:

R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:

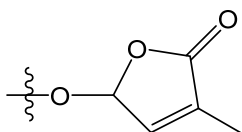


5

R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y

----- representa un enlace sencillo o doble, con la condición de que:

- cuando el enlace 11,13 es sencillo, entonces R₁ es H, -OH, =O, o



10

- cuando el enlace 11,13 es doble, entonces R₁ es H o

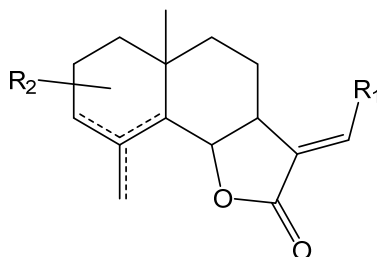
- cuando un enlace seleccionado de entre 3,4; 4,15; o 4,5 es doble, los otros dos son enlaces sencillos;

y

(b) desarrollar el hongo y/o la planta de la etapa (a).

15

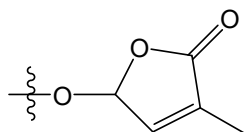
18. Método según la reivindicación 17, donde el compuesto es de fórmula (Ia):



(Ia)

donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



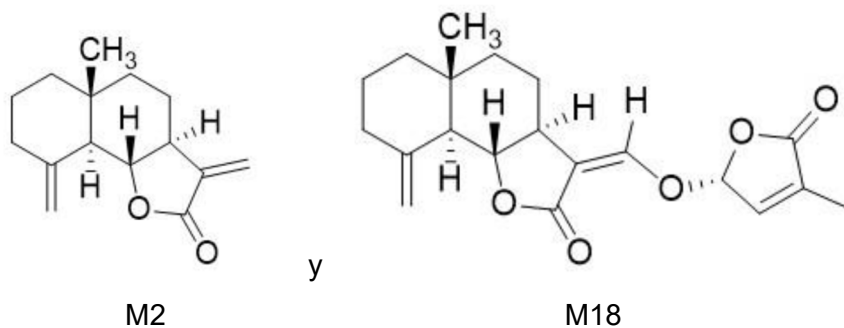
- 5 R₂ se selecciona de entre H, -OH, -OCO-alquil (C₁-C₅); y
 ----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

19. Método según la reivindicación 18, donde R₂ es H.

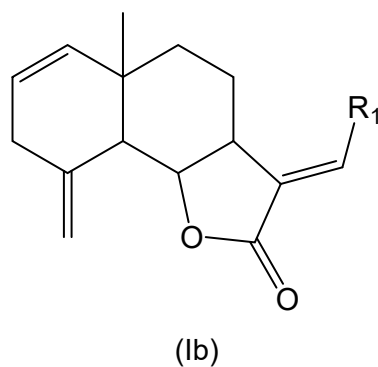
- 10 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, donde ----- es un enlace doble en la posición 4,15.

21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde los compuestos de fórmula (Ia) se seleccionan de entre:

15

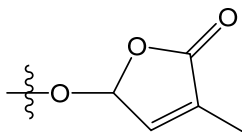


- 20 22. Método según la reivindicación 17, donde el compuesto es de fórmula (Ib):



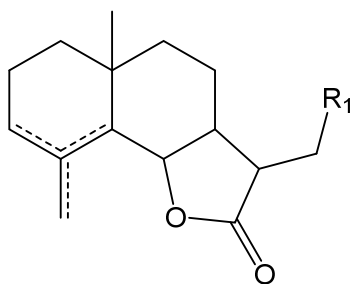
donde:

R₁ se selecciona de entre H y el grupo:



23. Método según la reivindicación 17, donde el compuesto es de fórmula (Ic):

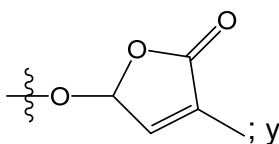
5



(Ic)

donde:

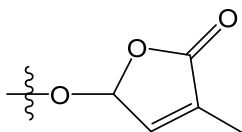
R₁ se selecciona de entre H, -OH, =O y el grupo:



10

----- representa un enlace sencillo o doble en una de las tres posiciones.

24. Método según la reivindicación 23, donde R₁ se selecciona de entre =O y el grupo:

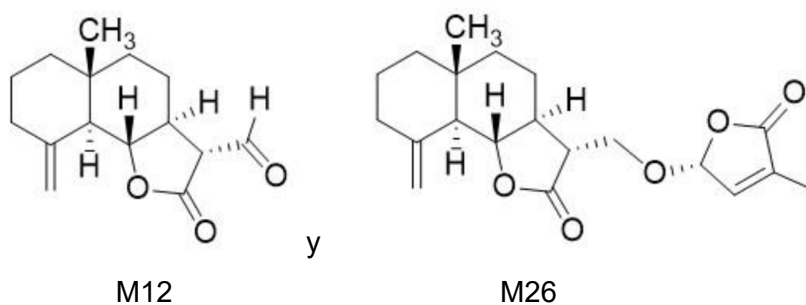


15

25. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde ----- es un enlace doble en la posición 4,15.

26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde los compuestos se seleccionan de entre:

20



- 5 27. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, en el que el compuesto está en una concentración de entre 10 y 1000 nM.
28. Método según la reivindicación 27, en el que el compuesto está en una concentración de 100 y 500 nM.
- 10 29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, en el que la planta es una planta de lechuga, o una planta de tomate.
30. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 29, en el que la
- 15 composición es administrada al suelo que rodea la planta.
31. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 30, en el que la composición está formulada en forma líquida, en forma sólida o en forma hidropónica.

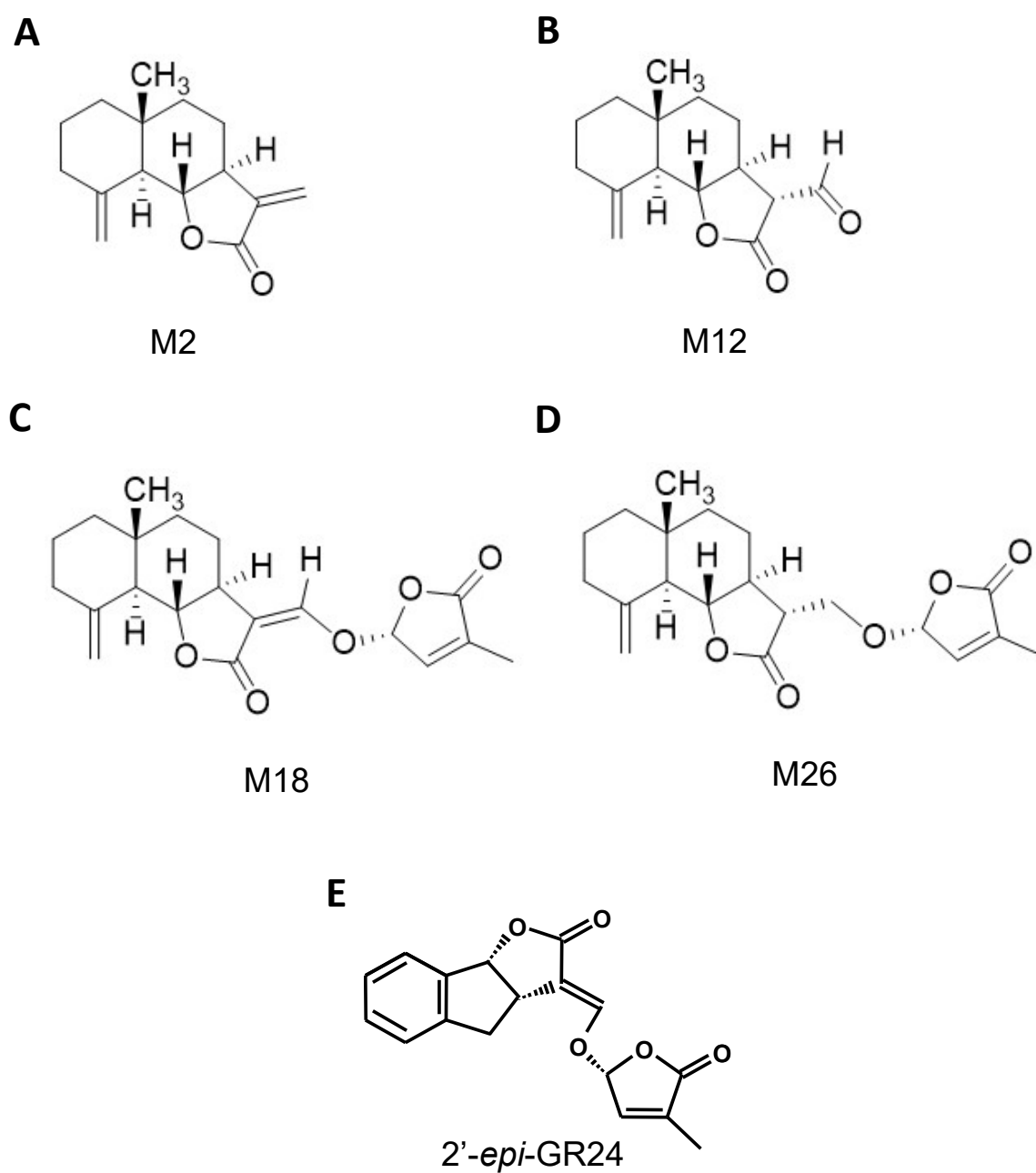


Fig. 1

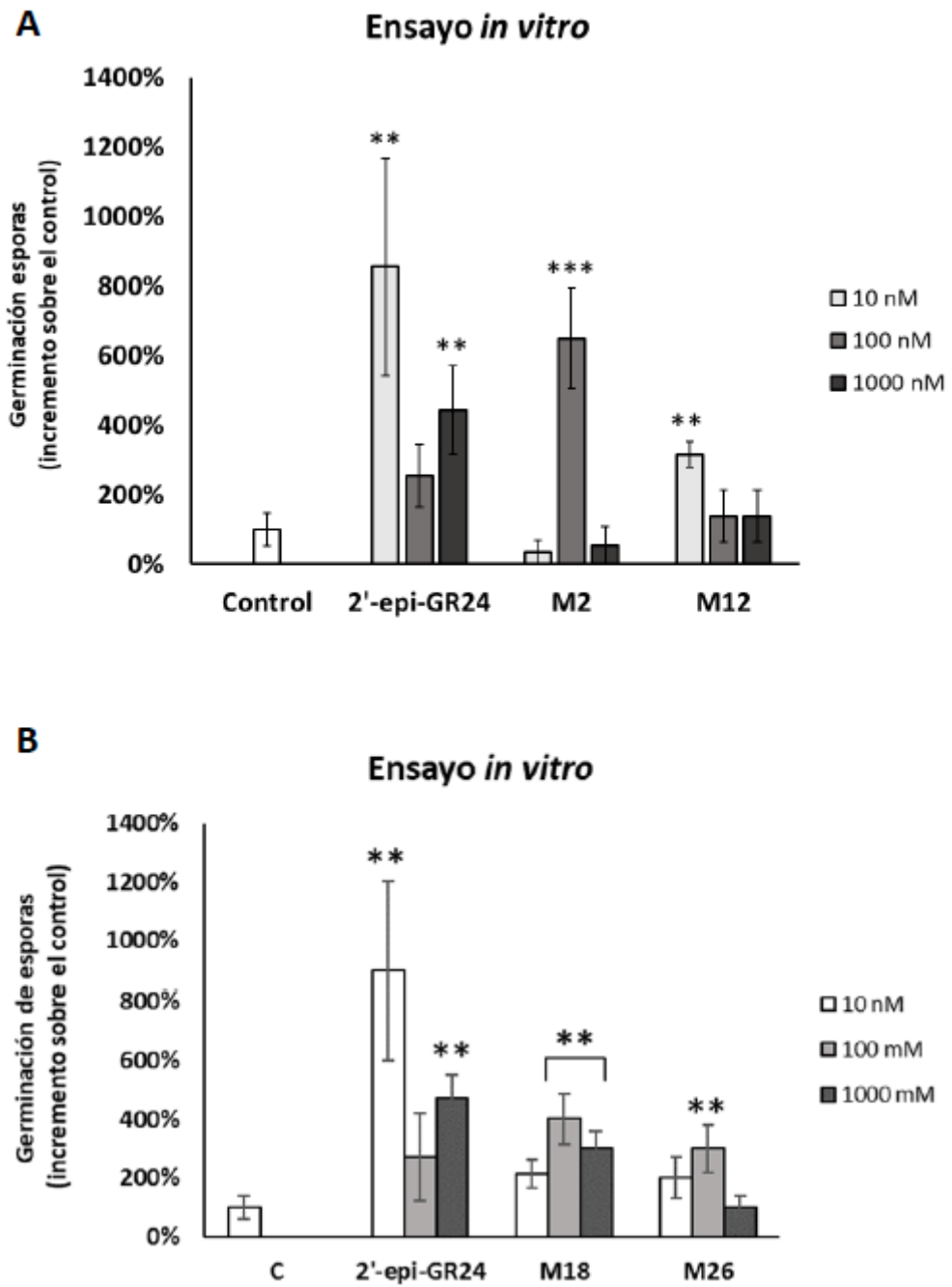


Fig. 2

Experimento 1

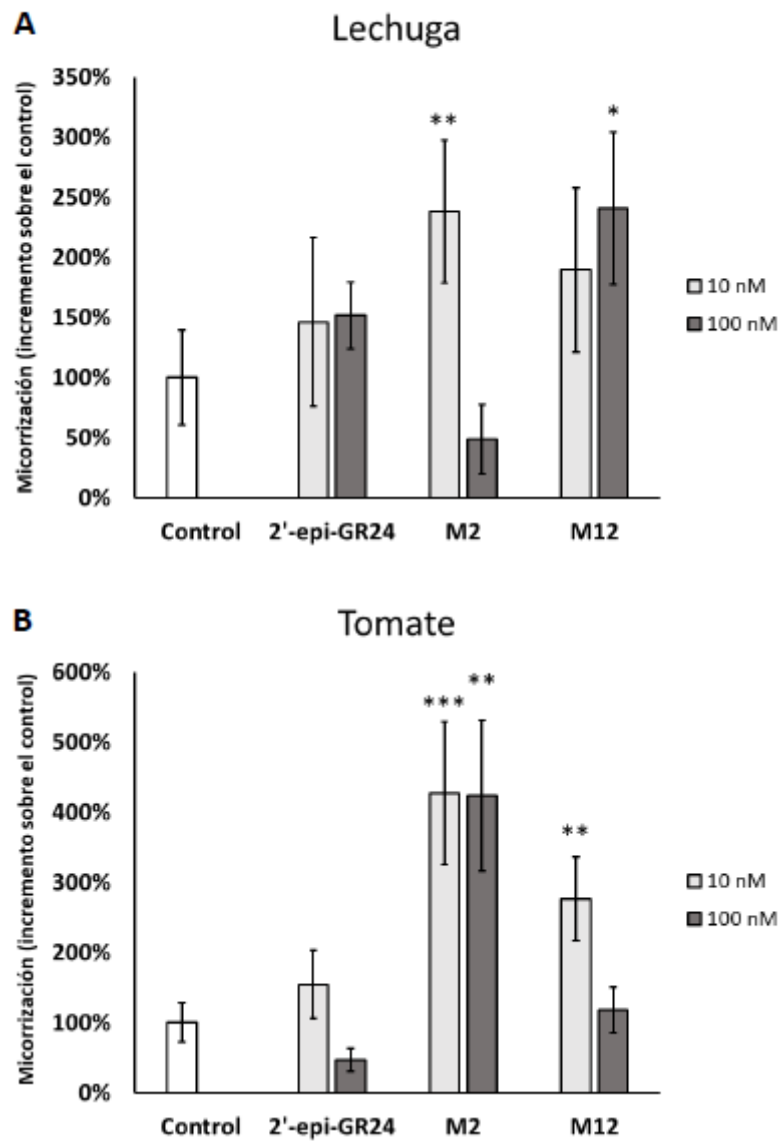
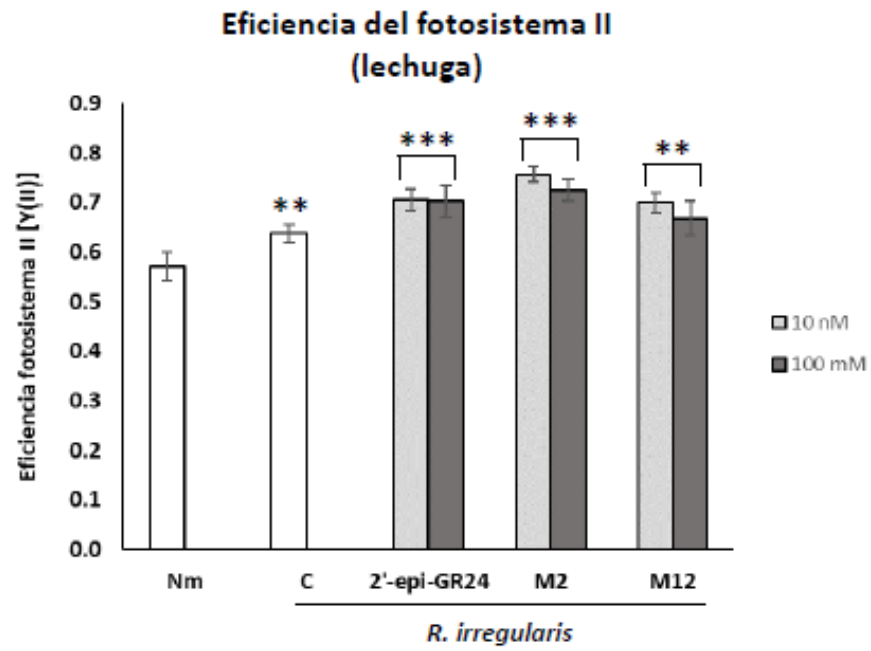


Fig. 3

A



B

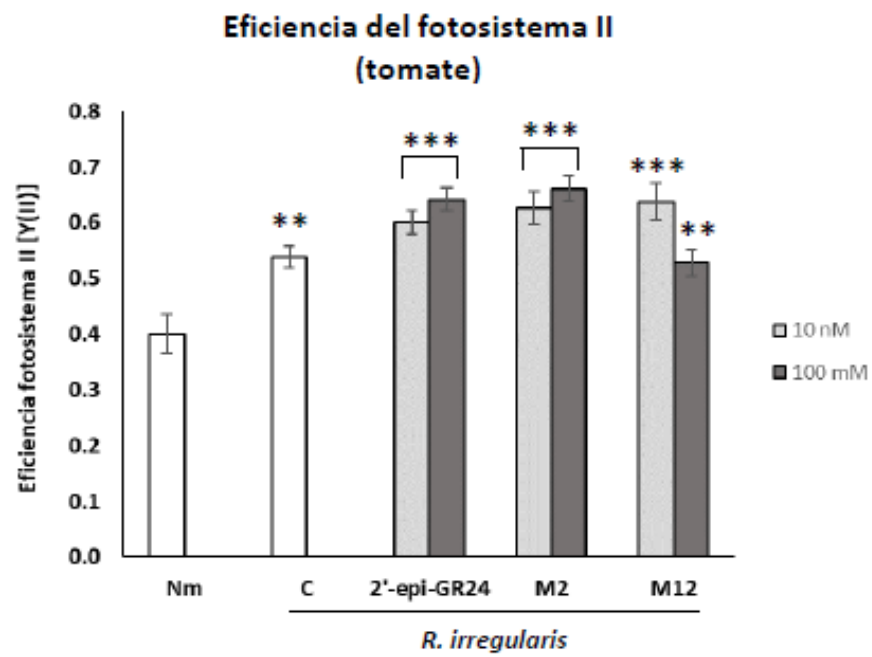


Fig. 4

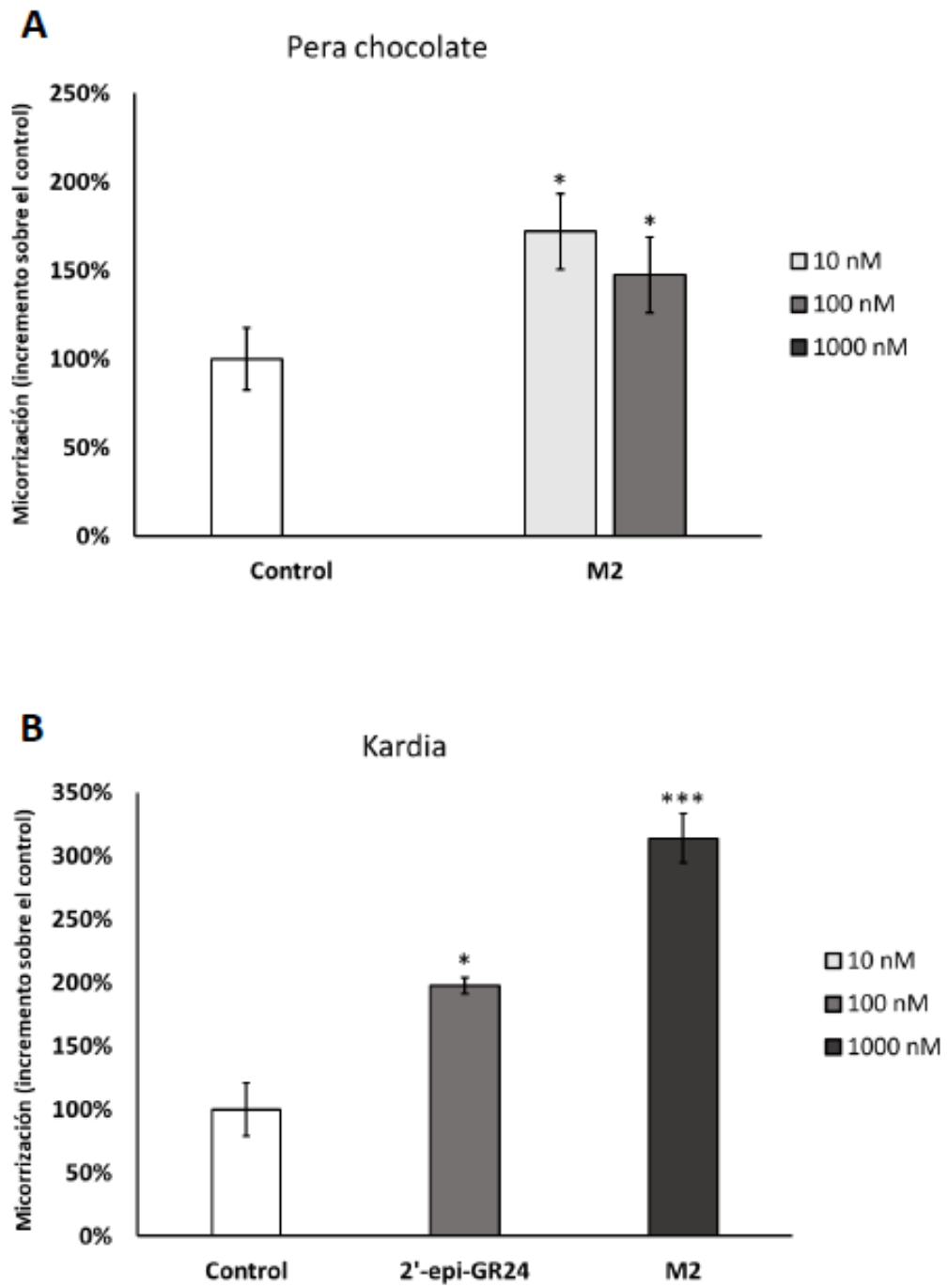


Fig. 5



- 21 N.º solicitud: 202430716
22 Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: **A01N43/12** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZORRILLA J G et al. "Facile synthesis of anhydrojudaicin and 11,13-dehydroanhydrojudaicin, two eudesmanolide-skeleton lactones with potential allelopathic activity". Phytochemistry Letters. Elsevier Ltd., 01/06/2019, Vol. 31, Páginas 229-236, ISSN 1874-3900, ISSN 1876-7486 (electronic), <DOI: 10.1016/j.phytol.2019.04.014>. Ver resumen; figura 1; apartado 2.	1-31
A	KAUR R" et al. "Isolation, Chemical Transformation, and Antifungal Potential of Sesquiterpene Lactones from Inula Racemosa". Medicinal and Aromatic Plants Abstracts. Chemistry of Natural Compounds, 01/04/2020, Páginas 207-212, ISSN 0009-3130. Ver resumen; tabla 1, esquema1.	1-31
A	BESSERER ARNAUD et al. "Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitocondria". PLoS biology. Jul 2006., Vol. 4, Nº 7, Páginas e226, ISSN 1545-7885 (electronic). Ver resumen, tabla 1.	1-31
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 14.07.2025	Examinador N. Martín Laso	Página 1/2

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

A01N

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

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT, CAS