

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/018281 A1

(43) Fecha de publicación internacional
18 de febrero de 2010 (18.02.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 35/06 (2006.01) A01N 41/04 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070302

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de julio de 2009 (23.07.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802324 4 de agosto de 2008 (04.08.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA** [ES/ES]; Pabellón de Gobierno, C/ Molinos de agua, s/n, E-38207 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BORGES RODRÍGUEZ, Andrés A.** [ES/ES]; Instituto De Productos Naturales Y Agrobiología (IPNA), Avda. Astrofísico F. Sánchez, 3, E-38205 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES). **BORGES PÉREZ, Andrés A.** [ES/ES]; Instituto De Productos Naturales Y Agrobiología (IPNA), Avda. Astrofísico F. Sánchez, 3, E-38205 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES). **JIMÉNEZ ARIAS, David** [ES/ES]; Instituto De Productos Naturales Y Agrobiología (IPNA), Avda. Astrofísico F. Sánchez, 3, E-38205 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES). **MARTÍN RODRÍGUEZ, Vanesa** [ES/ES]; Instituto De Productos Naturales Y Agrobiología (IPNA), Avda. Astrofísico F. Sánchez, 3, E-38205 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES).

EXPÓSITO RODRÍGUEZ, Marino [ES/ES]; Instituto De Productos Naturales Y Agrobiología (IPNA), Avda. Astrofísico F. Sánchez, 3, E-38205 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES). **LUÍS JORGE, Juan Cristo** [ES/ES]; Universidad De La Laguna, Pabellón de Gobierno, C/ Molinos de agua, s/n, E-38207 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF MENADIONE TO INCREASE SALINE STRESS TOLERANCE IN PLANTS

(54) Título: USO DE MENADIONA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO DE LAS PLANTAS

(57) Abstract: The invention relates to the use of compositions containing menadione (vitamin K3 or pro-vitamin K) and/or some of the water-soluble derivatives thereof in order to improve saline stress tolerance in affected plants. The treatment comprises the application of solutions containing the aforementioned compounds by any means by which the compositions are brought into contact with any part of the plant and/or seeds.

(57) Resumen: Esta invención está relacionada con el uso de composiciones que contienen menadiona (Vitamina K 3 o Provitamina K) y/o algunos de sus derivados hidrosolubles para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas. El tratamiento se lleva a cabo mediante la aplicación de las soluciones que contengan los citados compuestos por cualquier vía que ponga en contacto las composiciones de la invención con cualquier parte de la planta y/o semillas.



WO 2010/018281 A1

USO DE MENADIONA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO DE LAS PLANTAS

5 Esta invención está relacionada con el uso de composiciones que contienen menadiona (Vitamina K₃ o Provitamina K) y/o algunos de sus derivados hidrosolubles para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas. El tratamiento se lleva a cabo mediante la aplicación de las soluciones que contengan los citados compuestos por cualquier vía
10 que ponga en contacto las composiciones de la invención con cualquier parte de la planta y/o semillas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La salinidad de los suelos es uno de los principales factores que está afectando cada vez más a las zonas de cultivo a nivel mundial, especialmente en las zonas áridas y semiáridas de producción.

 La salinidad es un problema grave en muchas zonas áridas, donde el riego ha ido aumentando lentamente la concentración de sales solubles en
20 el suelo y reduciendo el potencial productivo de muchos cultivos. La salinidad puede inhibir la germinación y el crecimiento de las plantas, reduciendo el rendimiento o la calidad de la cosecha.

 La salinización de los suelos afecta a la Humanidad desde el inicio de la agricultura. La actividad antrópica ha incrementado la extensión de
25 áreas salinizadas al ampliarse las zonas de regadío con el desarrollo de grandes proyectos hidrológicos que han provocado cambios en el balance de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos. La proporción de suelos afectados por salinidad se cifra en un 10% del total mundial, y se estima que entre 25 y 50 % de las zonas de regadío están salinizadas (Rhoades
30 *et al.*, 1992. FAO Irrigation and Drainage paper. FAO, United Nations, Rome, 48 pp.).

En las zonas afectadas por salinidad, la principal solución ha sido la sustitución de cultivos sensibles por otros más tolerantes como remolacha azucarera, cebada, algodón, etc., que reemplazan a los cultivos tradicionales. Sin embargo, esta opción puede no tener interés por problemas de mercado, particularidades climáticas o necesidades nutricionales de la población, por lo que resultaría más importante disponer de variedades tolerantes en los principales cultivos o bien aumentar su capacidad de tolerancia.

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua, y al crear un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional. Una causa de la reducción del crecimiento es la inadecuada fotosíntesis debida al cierre estomático y en consecuencia la limitación de la entrada de CO_2 (Leidi y Pardo, 2002. Revista de investigaciones de la facultad de Ciencias Agrarias, N° II).

En los últimos 25 años los inventores han venido investigando sobre el efecto que los reguladores del crecimiento de las plantas podrían producir en el reforzamiento de los mecanismos naturales de defensa y, como consecuencia, en la inducción de tolerancia a salinidad además de resistencia a patógenos y plagas en las plantas tratadas y otros efectos positivos. En este sentido, los investigadores han observado cómo un determinado tipo de reguladores del crecimiento de las plantas, los derivados hidrosolubles de la Vitamina K, eran capaces de estimular los mecanismos naturales de defensa de las plantas tratadas y

consecuentemente de inducir resistencia frente a los ataques de patógenos y plagas (WO/1995/03702), así como para contrarrestar los daños producidos por pesticidas y herbicidas (WO/2003/105586).

5

Los inventores también han obtenido resultados sorprendentes en lo que se refiere al uso de un derivado hidrosoluble de la Vitamina K3, la menadiona sodio bisulfito (MSB) en el cultivo de platanera (banana) para estimular el adelanto de la floración de las plantas tratadas, frente a las no tratadas (WO/1996/28026)

10

Además, las plantas tratadas con derivados hidrosolubles de la Vitamina K3, especialmente con el MSB, originan el desarrollo de propiedades antialimentarias frente a los ataques de patógenos y plagas (Patente ES-200601179).

15

Los investigadores de la presente invención han continuado experimentando acerca de los efectos del MSB en relación al estrés salino.

20

Sorprendentemente, las plantas tratadas con estas composiciones presentan una mayor tolerancia frente a dicho estrés especialmente en lo que se refiere a condiciones de alta salinidad. Los efectos nocivos sobre los cultivos provocados por la salinidad son contrarrestados, al menos en parte, por el tratamiento de los mismos con MSB, lo que se traduce en una mejora de la calidad de la cosecha e incremento del rendimiento de la misma.

25

Los compuestos descritos en la presente invención son sistémicos, biodegradables, no pesticidas, no tóxicos e inocuos desde el punto de vista medioambiental, y no son peligrosos para las plantas, los animales y las personas. Además se pueden mezclar con varios aditivos, por

30

ejemplo: fertilizantes orgánicos e inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas.

5 En relación con la estimulación de los sistemas defensivos de las plantas por medio de menadiona, en el documento de patente WO/2003/105586 se emplean composiciones que contienen menadiona y/o algunos de sus derivados hidrosolubles para estimular los mecanismos naturales de defensa de las plantas, contrarrestando en parte los daños
10 químicos ocasionados por pesticidas y herbicidas. Asimismo, el documento de patente WO/1996/28026 está basado en los mismos compuestos que el documento anterior para inducir resistencia de las plantas a patógenos y plagas.

15 Por otra parte, el documento WO/2005/054156 menciona que las plantas tratadas con un fertilizante compuesto por Vitamina K y/o sus derivados, ácido algínico, y betaina son capaces tanto de mejorar el crecimiento como aumentar la tolerancia al estrés abiótico y osmótico.

20 La presente invención se refiere a un concepto más específico de estrés abiótico, el estrés salino, además, el efecto de la mejora de la tolerancia al estrés abiótico y osmótico, mencionada en WO/2005/054156, no puede ser atribuida a la Vitamina K o sus derivados puesto que, como se ha explicado anteriormente, la tolerancia a estos estreses es debida al ácido
25 algínico y betaina respectivamente.

El estrés salino es un tipo de estrés abiótico y el estrés osmótico es uno de los efectos del estrés salino. Como se ha comentado en el tercer párrafo de este apartado introductorio, la salinidad causa estreses relacionados tanto con el estrés hídrico y ósmosis celular como con la
30 toxicidad y desequilibrios nutricionales debidos al ión sodio u otros iones en el caso de ser sales diferentes a cloruro sódico.

Es conocido que los mecanismos defensivos de las plantas frente a estreses de diferente naturaleza pueden compartir algunos elementos implicados, como por ejemplo, rutas de transducción de señales, pero es tal la complejidad de estas respuestas, que no se podría considerar que los estreses causados a las plantas por patógenos, pesticidas y herbicidas articulan los mismos procesos a pesar de que puedan compartir parte de los mecanismos de la respuesta defensiva.

Con esta invención se solventa la dificultad de conseguir un crecimiento óptimo de las plantas sometidas a estrés salino. El uso de composiciones que contienen menadiona y/o alguno de sus derivados hidrosolubles genera un resultado sorprendente e inesperado en aquellas plantas que han sido sometidas a estrés salino y son tratadas con estas composiciones.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el uso de composiciones que contienen menadiona (Vitamina K3) y/o al menos uno de sus derivados solubles en agua que cuando son aplicadas a las plantas y/o semillas son capaces de bioestimular sus mecanismos naturales de defensa al estrés salino.

La invención propuesta satisface una necesidad experimentada desde hace tiempo ya que describe el uso de una clase de compuestos que son sistémicos, biodegradables, no pesticidas, no tóxicos e inocuos desde el punto de vista medioambiental, y que no son peligrosos para las plantas, los animales y las personas. Por consiguiente, la presente invención supone una herramienta segura para luchar contra la pérdida de rendimiento agrícola y abandono de cultivos por la salinización de los suelos (sin el uso de organismos modificados genéticamente).

En este sentido, un primer aspecto de la invención se basa en el uso de una composición acuosa que comprende menadiona y/o algunos de sus derivados hidrosolubles para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas y/o semillas.

Siendo los derivados hidrosolubles de menadiona todas aquellas sales que pueden solubilizarse en agua tales como menadiona sodio bisulfito (MSB), bisulfito potásico, bisulfito amónico o bisulfito magnésico, menadiona nicotinamida bisulfito (MNB), menadiona ácido p-aminobenzoico bisulfito, menadiona histidina bisulfito, menadiona adenina bisulfito, menadiona ácido nicotínico bisulfito o menadiona triptofano bisulfito sin perjuicio de otras sales no citadas.

Un segundo aspecto de la presente invención se basa en el uso de una composición acuosa para inducir tolerancia al estrés salino de las plantas y/o semillas que comprende,

a. 3.3×10^{-7} a 0.66 mM (0.0001 a 200 p.p.m.) de menadiona (Vitamina K3);

b. 3.3×10^{-6} a 33.3 mM (0.001 a 10000 p.p.m.) de un derivado de Vitamina K3 soluble en agua caracterizado por ser un bisulfito seleccionado de la lista que comprende; menadiona sodio bisulfito (MSB), bisulfito potásico, bisulfito amónico o bisulfito magnésico;

c. 3.3×10^{-5} a 33.3 mM (0.01 a 10000 p.p.m.) de un derivado de Vitamina K3 de bajo nivel de solubilidad en agua caracterizado por ser un bisulfito seleccionado de la lista que comprende; menadiona nicotinamida bisulfito (MNB), menadiona ácido p-aminobenzoico bisulfito, menadiona histidina bisulfito, menadiona adenina bisulfito, menadiona ácido nicotínico bisulfito o menadiona triptofano bisulfito;

d. o cualquier combinación de las composiciones según (a), (b) y/o (c).

5 Todos estos compuestos son sistémicos, biodegradables, no pesticidas, no tóxicos e inocuos desde el punto de vista medioambiental, no son peligrosos para las plantas, los animales y las personas. Dichos compuestos originan el desarrollo en los cultivos de propiedades que contrarrestan el estrés ocasionado por la salinidad.

10 La concentración de los componentes activos de las composiciones dependerá del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones.

15 La efectividad de los componentes activos de las composiciones, referida a Vitamina K3, MSB y MNB puede esperarse a las siguientes concentraciones: Vitamina K3 entre 3.3×10^{-7} a 0.66 mM (0.0001 a 200 p.p.m.); MSB entre 3.3×10^{-6} a 33.3 mM (0.001 a 10000 p.p.m.); MNB entre 3.3×10^{-5} a 33.3 mM (0.01 a 10000 p.p.m.).

20 En una realización preferida, el compuesto es menadiona sodio bisulfito (MSB).

25 Un tercer aspecto de la invención es el uso de una composición según los compuestos anteriores y sus concentraciones para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación a la parte aérea mediante pulverización.

30 Los principios fisiológicos del transporte de los compuestos absorbidos por las hojas mediante pulverización, son similares a los que ingresan en las plantas por la absorción vía radicular, sin embargo, el movimiento de los compuestos aplicados sobre las hojas no es el mismo en tiempo y forma que el que se realiza desde las raíces al resto de la planta. La

absorción foliar es más efectiva cuando las condiciones de absorción desde el suelo son adversas como por ejemplo en caso de sequía, estrés salino, temperaturas extremas u otros estreses. Además, es mucho más
5 fácil obtener una distribución uniforme, a diferencia de la aplicación de granulados o en mezclas físicas.

La aplicación a la superficie de la planta de una de las composiciones anteriormente mencionadas, conteniendo una cantidad efectiva de uno o más de los compuestos descritos, origina una respuesta defensiva de
10 naturaleza sistémica y, en consecuencia, el tratamiento de una parte de la planta desencadena la bioestimulación de los mecanismos de defensa a lo largo de toda la planta.

Un cuarto aspecto de la presente invención es el uso de una
15 composición según los compuestos anteriores de menadiona y/o sus derivados hidrosolubles para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación al tallo por inyección.

Asimismo, un quinto aspecto de la presente invención es el uso de una
20 composición, según los compuestos anteriores y sus concentraciones, caracterizada porque se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

25 La aplicación de las composiciones acuosas por medio de la inmersión de la parte radicular de la planta así como de semillas se realiza por un tiempo y con una concentración que depende del tipo de planta, estado de desarrollo así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones. En el caso de semillas que requieran un tratamiento
30 especial de escarificación o eliminación de determinadas cubiertas para facilitar su germinación, el proceso de inmersión en las composiciones acuosas de la presente invención, se podrá realizar de forma más efectiva

después de la eliminación de las cubiertas para facilitar la absorción de los compuestos activos. Asimismo, también se podrán sumergir las semillas en cualquier estadio de germinación.

5

Las formas de aplicación que se han citado hasta ahora no limitan otro tipo de aplicaciones de las composiciones que contienen menadiona y/o alguno de sus derivados hidrosolubles a las plantas.

10 Un sexto aspecto de la invención hace referencia al uso de una composición, según los compuestos anteriores y sus concentraciones, que además comprende un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas.

15 De esta manera, al aplicar las composiciones que contienen menadiona y/o alguno de sus derivados hidrosolubles junto con aditivos, ya sea para aportar nutrientes o para tratar determinadas infecciones o plagas, se consigue no aumentar los costos de los tratamientos al hacerlo de forma coordinada.

20

El séptimo aspecto de la presente invención es el uso concreto de cualquiera de las composiciones que contienen menadiona y/o alguno de sus derivados hidrosolubles mencionadas anteriormente donde la composición se aplica a plantas y/o semillas de la especie *Solanum*
25 *licopersicum*. En una realización preferida, la composición se aplica a semillas de la especie *Solanum licopersicum* por inmersión. En otra realización preferida, las semillas de *Solanum licopersicum* se sumergen en una solución acuosa con una concentración de 10 a 300 mM (3000 a 90000 p.p.m.) de menadiona sodio bisulfito (MSB).

30

El octavo aspecto de la invención está basado en el uso concreto de cualquiera de las composiciones que contienen menadiona y/o alguno de

5 sus derivados hidrosolubles mencionadas anteriormente donde la composición se aplica a plantas y/o semillas de la especie *Arabidopsis thaliana*. En una realización preferida, la aplicación de las composiciones se realiza por pulverización foliar de plantas de la especie anterior. Asimismo, en otra realización preferida, la composición está formada por menadiona sodio bisulfito (MSB) y se emplea una concentración de 0,1 a 0,3 mM (30 a 90 p.p.m.).

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
15 siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

20 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante dos ejemplos llevados a cabo con una planta de interés hortofrutícola y con cierta capacidad de resistencia a la salinidad, *Solanum lycopersicum* y la planta modelo
25 *Arabidopsis thaliana*, sensible al estrés salino.

EJEMPLO 1

30 **Descripción del experimento:** se sometieron a tratamiento por inmersión durante 6 horas semillas de tomate en una disolución de 20 mM en MSB (6000 p.p.m.), retirando las semillas posteriormente de la misma y

dejándolas en agua destilada hasta completar un período de 24 horas. Las semillas control permanecieron sumergidas en agua destilada durante las 24 horas previas a la siembra en sustrato universal. Una vez germinadas las semillas las plántulas de tomate generadas fueron regadas cada 24 horas durante un máximo de 7 días con una solución salina 200 mM en NaCl.

A lo largo del experimento se realizaron medidas de fluorescencia de clorofila A encaminadas a la determinación de cómo el estrés salino afectaba a la capacidad fotosintética de la planta. Los datos fueron analizados mediante JIP-test. El concepto de JIP-test está basado en la Teoría de Flujos Energéticos en Membranas (Strasser, 1978. Chloroplast Development. Elsevier/North Holland, pp. 513–524; Strasser, 1981. Balaban International Science Services, Philadelphia, PA, pp. 727–737). El JIP-test define los flujos máximos de energía en la cascada de eventos que tienen lugar durante su Absorción (ABS_o), Captura (TR_o), Transporte (ET_o) y Disipación (D_o). Al mismo tiempo establece una relación con los datos de fluorescencia experimentales entre los valores mínimos F_0 y máximos F_M . Estos parámetros nos muestran información estructural y funcional (como son flujos fenomenológicos o índices de vitalidad ó PI, PI_{ABS}, PI_{CS}) los cuales nos permiten cuantificar el comportamiento del Fotosistema II en diferentes condiciones experimentales (Strasser *et al.*, 2004. Advances in Photosynthesis and Respiration. 19: 321–362).

La tabla 1 muestra los valores medios de la variación de diferentes parámetros de fluorescencia (F_0 , F_M , F_V/F_M y PI) frente al tiempo, para semillas control y tratadas con 20 mM de MSB (6000 p.p.m.). Como se puede observar las plantas procedentes de semillas tratadas con agua destilada o control sufrieron mucho más las drásticas condiciones de estrés salino impuestas en la eficiencia fotosintética del fotosistema II que aquellas que fueron previamente tratadas con MSB. Los valores de

fluorescencia inicial y máxima (F_0 y F_M) tienden a estabilizarse en aquellas plantas cuyas semillas fueron tratadas con MSB. El parámetro PI, que expresa la eficiencia funcional del Fotosistema II, muestra claramente esta protección inducida por el MSB, estando sus valores diez veces por encima de los mostrados por las plantas control.

Tabla 1. Cambios experimentados por las plantas de tomate sometidas a estrés salino a lo largo del una semana en los valores de fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_M), máxima eficiente cuántica del Fotosistema II (F_V/F_M) y eficiencia funcional del fotosistema II (PI).

		Días		
		1	3	7
Control	F_0	686 ± 31	673 ± 28	962 ± 45
	F_M	3466 ± 123	3429 ± 145	2152 ± 136
	F_V/F_M	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,55 ± 0,05
	PI	3,18 ± 0,83	3,33 ± 0,76	0,28 ± 0,34
MSB (20 mM)	F_0	715 ± 25	690 ± 37	724 ± 15
	F_M	3538 ± 117	3524 ± 143	3431 ± 129
	F_V/F_M	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,79 ± 0,03
	PI	2,94 ± 0,25	3,18 ± 0,45	2,51 ± 0,47

Valores medios de 10 plantas por tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos en experimentos independientes.

EJEMPLO 2

Descripción del experimento: Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 4 semanas fueron tratadas mediante spray foliar con una solución de 0.2

mM (60 p.p.m.) de MSB 24 horas antes de ser sometidas a estrés salino severo consistente en el riego continuado cada 24 horas durante un máximo de 7 días con una solución salina 200 mM en NaCl, al igual que en el ejemplo 1. La siguiente tabla muestra igualmente la tolerancia a la salinidad inducida por el tratamiento previo con MSB. Al igual que en experimento descrito en el ejemplo 1, a lo largo del experimento se realizaron medidas de fluorescencia de clorofila A encaminadas a la determinación de cómo el estrés salino afectaba a la capacidad fotosintética de la planta. Los datos fueron analizados mediante JIP-test al igual que en ejemplo anterior.

Tabla 2. Cambios experimentados por las plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino a lo largo de una semana en los valores de fluorescencia inicial (F0), fluorescencia máxima (FM), máxima eficiencia cuántica del Fotosistema II (Fv/FM) y eficiencia funcional del fotosistema II (PI).

		Días		
		1	3	7
Control	F0	699 ± 22	725 ± 34	807 ± 45
	FM	2885 ± 111	2890 ± 117	2795 ± 125
	Fv/FM	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,03
	PI	0,79 ± 0,12	0,71 ± 0,09	0,69 ± 0,15
MSB (0.2 mM)	F0	698 ± 26	668 ± 45	734 ± 54
	FM	2922 ± 99	2956 ± 112	3119 ± 121
	Fv/FM	0,76 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,76 ± 0,01
	PI	0,80 ± 0,13	0,85 ± 0,18	0,84 ± 0,15

Valores medios de 10 plantas por tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos en experimentos independientes.

De esta manera en la tabla anterior se muestran los valores medios de la variación de diferentes los diferentes parámetros de fluorescencia (F0, FM, FV/FM y PI) analizados frente al tiempo, para plántulas consideradas control y para aquellas tratadas con 0.2 mM de MSB (60 p.p.m.). Como se puede observar en la tabla 2, en las plantas tratadas con agua destilada o control, los valores de fluorescencia máxima (FM), máxima eficiencia cuántica del Fotosistema II (FV/FM) y eficiencia funcional del Fotosistema II (PI) sufren un descenso constante, con la excepción de los valores de fluorescencia inicial (F0). Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales las plantas tratadas con MSB no experimentaron dichos cambios en los parámetros de fluorescencia de clorofila, demostrando así la protección del MSB en las condiciones de estrés salino impuestas en aquellas plantas que fueron previamente tratadas con MSB. De nuevo el parámetro PI muestra claramente esta protección del fotosistema inducida por el MSB.

20

25

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición acuosa que comprende menadiona y/o algunos de sus derivados hidrosolubles para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas y/o semillas.
- 10 2. Uso de una composición acuosa para inducir tolerancia al estrés salino de las plantas y/o semillas que comprende,
- 15 a. 3.3×10^{-7} a 0.66 mM de menadiona (Vitamina K3) ;
- b. 3.3×10^{-6} a 33.3 mM de un derivado de Vitamina K3 soluble en agua caracterizado por ser un bisulfito seleccionado de la lista que comprende; menadiona sodio bisulfito (MSB), bisulfito potásico, bisulfito amónico o bisulfito magnésico;
- 20 c. 3.3×10^{-5} a 33.3 mM de un derivado de Vitamina K3 de bajo nivel de solubilidad en agua caracterizado por ser un bisulfito seleccionado de la lista que comprende; menadiona nicotinamida bisulfito (MNB), menadiona ácido p-aminobenzoico bisulfito, menadiona histidina bisulfito, menadiona adenina bisulfito, menadiona ácido nicotínico bisulfito o menadiona triptofano bisulfito;
- 25 d. o cualquier combinación de las composiciones según (a), (b) y/o (c).
- 30 3. Uso según las reivindicaciones 1 y 2 donde el compuesto es menadiona sodio bisulfito (MSB).
4. Uso de una composición según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se aplica a la parte aérea de la planta mediante pulverización.

5. Uso de una composición según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se aplica al tallo de la planta por inyección.
- 5 6. Uso de una composición, según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.
- 10 7. Uso de una composición según las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas.
- 15 8. Uso según las reivindicaciones 1 a 7 donde la composición se aplica a plantas y/o semillas de la especie *Solanum lycopersicum*.
9. Uso según la reivindicación 8 donde la composición se aplica a semillas por inmersión.
- 20 10. Uso según la reivindicación 9 donde la concentración de menadiona sodio bisulfito (MSB) es de entre 10 a 300 mM.
- 25 11. Uso según las reivindicaciones 1 a 7 donde la composición se aplica a plantas y/o semillas de la especie *Arabidopsis thaliana*.
12. Uso según la reivindicación 11 donde la composición se aplica por pulverización foliar.
- 30 13. Uso según la reivindicación 12 donde la concentración de menadiona sodio bisulfito (MSB) es de 0.1 a 0.3 mM.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, FSTA, HCAPLUS, AGRICOLA, CABA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2201911 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.03.2004. the whole document.	1-13
A	US 4764201 A (IINO et al.) 16.08.1988. the whole document.	1-13
A	SALAS, José A. et al."Variación in the índice and densidad estomática in plantas of tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) sometidas a tratamientos salinos Bioagro 13(3):99-104.2001.	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2009 (21.10.2009)

Date of mailing of the international search report

(05/11/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Amaro Roldán

Telephone No. +34 91 349 84 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070302

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2201911 AB	16.03.2004	WO 03105586 AB AU 2003238100 A	24.12.2003 31.12.2003 31.12.2003
-----	-----	-----	-----
US 4764201 A	16.08.1988	NONE	-----
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070302

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 35/06 (2006.01)

A01N 41/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/070302

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, FSTA, HCAPLUS, AGRICOLA, CABA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	ES 2201911 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.03.2004. Todo el documento.	1-13
A	US 4764201 A (IINO et al.) 16.08.1988. Todo el documento.	1-13
A	SALAS, José A. et al."Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) sometidas a tratamientos salinos Bioagro 13(3):99-104.2001.	1-13

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

21 Octubre 2009 (21.10.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05-NOVIEMBRE-2009 (05/11/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Amaro Roldán

N° de teléfono +34 91 349 84 13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070302

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES 2201911 AB	16.03.2004	WO 03105586 AB AU 2003238100 A	24.12.2003 31.12.2003 31.12.2003
US 4764201 A	16.08.1988	NINGUNO	-----

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N 35/06 (2006.01)

A01N 41/04 (2006.01)