

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 219**

51 Int. Cl.:

A01N 37/08 (2006.01)

A01N 3/02 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2018** **PCT/EP2018/055408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018** **WO18162449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2018** **E 18708692 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3592148**

54 Título: **Uso de ácido beta-ciclocítrico o una sal del mismo para potenciar la tolerancia de las plantas de la sobrecarga por sequía**

30 Prioridad:

07.03.2017 EP 17305241

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2024

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
25 Rue Leblanc, Bat Le Ponant
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**HAVAUX, MICHEL y
D'ALESSANDRO, STEFANO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 990 219 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de ácido beta-ciclocítrico o una sal del mismo para potenciar la tolerancia de las plantas de la sobrecarga por sequía

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para promover la tolerancia a la sequía en plantas.

Antecedentes de la invención

Durante su ciclo de vida, las plantas pueden estar en riesgo de exposición a sobrecargas ambientales tales como altas temperaturas y acceso limitado a agua. Actualmente, la sequía es una preocupación global en el campo agrícola. Los periodos de sequía pueden influir significativamente en los rendimientos de los cultivos al alterar el crecimiento de las plantas o provocar la muerte de las plantas. De acuerdo con las Naciones Unidas, la intensidad de la sequía está creciendo en todo el mundo. Determinados científicos son de la opinión de que las sequías hidrológicas y agrícolas serán cada vez más frecuentes debido al calentamiento global, dando lugar a una reducción en los recursos de agua y una disminución significativa en los rendimientos agrícolas.

Mejorar la tolerancia de las plantas a la sobrecarga por sequía también es de alto interés en floricultura. Actualmente, los clientes adquieren más plantas de jardín de mayoristas y minoristas en general y menos de centros de jardinería tradicionales. En consecuencia, el traslado y distribución de las plantas de jardín en general se producen lejos de su sitio de producción. Durante el traslado y la distribución, las plantas de jardín pueden estar expuestas a altas temperaturas y riego irregular, lo que provoca que se seque el sustrato y se marchite la planta. Las plantas sobrecargas por sequía no vendibles pueden representar un 15 % de las pérdidas posproducción.

Se han explorado varias estrategias para aumentar la tolerancia a la sequía en plantas, tales como productos químicos, fitomejoramiento y genomanipulación. Desde finales de la década de 1990, se ha perseguido la expresión transgénica de genes de "tolerancia a la sequía" como método para mejorar el rendimiento de cultivos en sequía.

Por ejemplo, el maíz Genuity® DroughtGard™ Hybrid comercializado por Monsanto es un maíz modificado genéticamente que tiene producción aumentada en sequía moderada.

También se han investigado productos químicos para aumentar la resistencia a la sequía en plantas. Por ejemplo, la solicitud internacional WO2008/094590 describe el uso de ácido abscísico (ABA) o su sal para aumentar la tolerancia a la sequía de plantas ornamentales. Se demostró que la aplicación foliar de moduladores del crecimiento mejoraba la tolerancia a la sequía. Desafortunadamente, algunos de estos productos químicos, tales como ácido abscísico y análogos del mismo, reducen el intercambio de gases al cerrar los estomas, por lo que se ralentiza la fotosíntesis y, por tanto, el crecimiento de la planta. Estos productos químicos se usan en general para tratamiento a corto plazo para mejorar la tolerancia de las plantas a sobrecargas ambientales ocasionales. Los usos a largo plazo de dichos productos químicos en cultivos de campo siguen siendo controvertidos, principalmente debido a sus posibles efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas. También se ha propuesto el uso de osmoprotectores, tales como prolina, trehalosa, fructano o manitol. Estos compuestos desempeñan funciones adaptativas en el ajuste osmótico mediático y en la protección de estructuras subcelulares en plantas sobrecargadas. Sin embargo, no todas las plantas pueden acumular estos compuestos.

Por consiguiente, hay una necesidad de métodos alternativos para mejorar la tolerancia de las plantas a la sobrecarga por sequía.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones. La invención se refiere al uso de ácido β-ciclocítrico, o una sal del mismo, para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta. El ácido β-ciclocítrico o una sal del mismo puede usarse para prevenir, retardar o disminuir al menos un efecto de la sequía en la planta, seleccionándose dicho efecto del grupo que consiste en disminución en la expansión foliar, clorosis foliar, quemaduras foliares y necrosis, marchitamiento, detención o disminución de la floración, disminución en el tamaño del fruto o el vegetal, disminución en la producción de frutos o vegetales, disminución en el tamaño de la planta, senescencia acelerada, muerte prematura de la planta, caída prematura de las flores, caída prematura de las hojas y disminución en la producción de semillas.

En un determinado aspecto, el ácido β-ciclocítrico o una sal del mismo se usa además para mejorar la recuperación de la planta después de una sobrecarga por sequía, y/o para disminuir la necesidad de agua en la planta.

El ácido β-ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta por pulverización, difusión, nebulización, inmersión, inundación, espolvoreo, por inyección en la planta, o por inyección en el sustrato de la planta. En un aspecto particular, el ácido β-ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta por pulverización foliar o añadiendo ácido β-ciclocítrico o una sal en el agua de riego.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta antes de un acontecimiento seleccionado del grupo que consiste en sequía meteorológica, sequía hidrológica, retirada del riego, trasplante de la planta, traslado de la planta y distribución de la planta. Puede realizarse una sola aplicación o múltiples aplicaciones de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo antes de dicho acontecimiento.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo también puede usarse de una manera más regular. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta al menos una vez cada tres meses, preferiblemente al menos una vez al mes, por ejemplo, al menos una vez a la semana.

La planta tratada con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede ser de cualquier tipo. En algunas realizaciones, la planta es una planta en maceta tal como una planta de interior o una planta de jardín. En algunas realizaciones, la planta es una planta de cultivo que crece en campo, invernadero o campo cubierto, y preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Apiaceae*, árboles frutales, *Poaceae* y *Brassicaceae*.

La invención también se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico, o una sal del mismo, para aumentar la vida útil de una planta cortada, por ejemplo, flores cortadas.

Otro objeto de la invención es una composición fitofarmacéutica que comprende (i) ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo como ingrediente activo y (ii) al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable. La composición fitofarmacéutica es para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta. El al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable se selecciona de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos. La composición fitofarmacéutica puede comprender además un ingrediente activo adicional seleccionado de fitohormonas, herbicidas, fungicidas, plaguicidas, fertilizantes, estimulantes, reguladores del crecimiento de las plantas y combinaciones de los mismos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta, que comprende:

- proporcionar una composición fitofarmacéutica que comprende ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo, y al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable seleccionado de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos, y

- aplicar dicha composición fitofarmacéutica a la planta antes, simultáneamente o después de la exposición de la planta a una sobrecarga por sequía, seleccionándose dicha sobrecarga por sequía del grupo que consiste en sequía meteorológica, sequía hidrológica, escasez o eliminación de riego, el trasplante de la planta, el traslado de la planta y la distribución de la planta.

Figuras:

La **figura 1A** muestra el nivel de ácido β -ciclocítrico (β -cca) cuantificado por GC-MS (SIM m/z 153) en plantas de 5 semanas de edad (*Arabidopsis thaliana*) regadas con 25 ml de β -cca 1,5 mM. La **figura 1B** muestra el nivel de β -ciclocitral (β -cc) cuantificado por GC-MS (SIM m/z 137) en las mismas plantas de 5 semanas de edad regadas con 25 ml de agua que contiene β -cca 1,5 mM. La **figura 1C** muestra la cuantificación de ácido β -ciclocítrico (β -cca) por GC-MS (SIM m/z 153) en hojas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con β -cca 1,5 mM durante 24 h (hojas β -cca, 50 μ l de solución de β -cca por hoja) y en hojas en condiciones de control (CTRL) (sin tratamiento con β -cca).

La **figura 2A** muestra la imagen de plantas de 5 semanas de edad pretratadas con 25 ml de agua que contenía β -cca (Bcca) 1,5 mM o 25 ml de agua (CTRL) y sometidas a 7 días de sobrecarga por sequía. La **figura 2B** muestra las mismas plantas 3 días después de volver a regar con agua solamente. La **figura 2C** muestra la conductancia de los estomas de plantas pretratadas con 25 ml de β -cca (Bcca) o agua (CTRL) y después sometidas a condiciones de sobrecarga por sequía (0-8 días), media de 6 hojas por punto.

La **figura 3A** muestra la conductancia de los estomas en plantas pretratadas con 25 ml de β -cca 1,5 mM en agua (β -cca) por maceta o 25 ml de agua por maceta (CTRL) y después sometidas a sobrecarga por sequía (0-4 días). La **figura 3B** y **figura 3C** muestra el contenido relativo de agua (RWC) y el contenido de agua en relación de peso seco (FW-DW)/DW, respectivamente, en las mismas plantas (promedio de 6 hojas por punto), en el día 0, 3, 4 y 5.

La **figura 4** muestra la imagen de plantas de pimiento pretratadas con 500 ml de agua que contenía β -cca 0,15 mM por maceta o 500 ml de agua por maceta, después de 4 días se sobrecarga por sequía, en condiciones ambientales (verano).

La **figura 5A** muestra la imagen de plantas *ost2-2* de 5 semanas de edad (perjudicadas en el cierre de los estomas) pretratadas con 25 ml de β -CCA 1,5 mM o con agua (CTRL) y después sometidas a 5 días de sobrecarga por sequía.

La **figura 5B** muestra la imagen de las mismas plantas 3 semanas después de volver a regarlas con agua.

La **figura 6A** muestra la conductancia de los estomas en plantas silvestres (WT) o en plantas *ost2-2* pretratadas con 25 ml de β -CCA 1,5 mM (WT β -ccA, *ost2.2* β -ccA) o con agua (WT CTRL, *ost2.2* CTRL) y después sometidas a condiciones de sobrecarga (0-3 días), media de 6 hojas por punto.

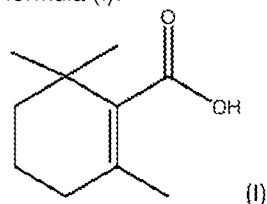
La **figura 6B** muestra el contenido relativo de agua (RWC) en plantas *ost2-2* pretratadas con 25 ml de β -CCA 1,5 mM (*ost2.2* β -ccA) o con 25 ml de agua (*ost2.2* CTRL) en 4 y 5 días de sobrecarga por sequía (promedio de 6 hojas por punto). La **figura 6C** muestra la filtración de iones en plantas *ost2-2* pretratadas con β -ccA o con agua, en 5 días de sobrecarga por sequía (6 hojas por condición).

La **figura 7** muestra la imagen de plantas de pensamientos pretratadas con 300 ml de agua por maceta (control) o pretratadas con 300 ml de agua que contenía β -ccA 0,15 mM por maceta (pretratamiento con β -ccA), después de someterse a 7 días de sobrecarga por sequía (A) y después de volver a regar (una semana) (B). Una semana después de volver a regar, las plantas de pensamientos pretratadas con β -ccA mostraron 47 ± 6 flores de promedio, mientras que las plantas de control mostraron 23 ± 1 flores solamente.

La **figura 8** muestra que la exposición a largo plazo de plantas de *Arabidopsis* a β -CCA no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento en condiciones normales. Figura 8A) imagen de las plantas y figura 8B) captura del peso seco al final del experimento.

Descripción detallada de la invención

El ácido β -ciclocítrico, también denominado en este documento β -ccA o β -CCA, corresponde al compuesto de fórmula (I):



Su nombre químico es ácido 2,2,6-trimetilciclohexeno-1-carboxílico. El ácido β -ciclocítrico también se denomina ácido β -ciclogeránico.

Los autores de la invención mostraron que el tratamiento con ácido β -ciclocítrico aumenta la tolerancia de las plantas a sobrecarga ambiental, en particular a condiciones de sequía.

De forma más precisa, los autores de la invención mostraron que el ácido β -ciclocítrico se recogía y acumulaba en las hojas cuando se aplicaba a las plantas por pulverización foliar o cuando se añadía en el riego con agua. El tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* con ácido β -ciclocítrico antes de la exposición a la sobrecarga por sequía demostró evitar los síntomas de la sequía en las plantas, tales como el marchitamiento. Después de volver a regar, las plantas pretratadas se recuperaron y estuvieron completamente turgentes, mientras que las plantas de control, que no se habían tratado con β -CCA, murieron. El β -CCA promovió la tolerancia a la sequía en la planta de modelo *Arabidopsis thaliana*, pero también en otras especies de plantas de interés agrícola tales como pimiento, plantas de tomate y plantas florales, por ejemplo, plantas de pensamientos.

Además, los autores de la invención mostraron que el pretratamiento con β -CCA evitaba pérdidas de agua, durante sobrecarga por sequía, en *Arabidopsis thaliana* silvestre, pero también en un mutante de *Arabidopsis* en que la respuesta de los estomas al ácido abscísico estaba anulada, concretamente el mutante *ost2-2*. Los autores de la invención mostraron además que el tratamiento de plantas silvestres con β -CCA antes de la sobrecarga por sequía no disminuyó la conductancia de los estomas y, por tanto, no indujo cierre de los estomas en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Dichos resultados, junto con la capacidad de β -CCA de aumentar la resistencia a la sequía en el mutante *ost2-2*, sugieren fuertemente que el mecanismo de acción de β -CCA no depende simplemente del cierre de los estomas, como se mostró previamente para compuestos tales como ácido abscísico. Como β -CCA no promueve significativamente el cierre de los estomas, no es probable que β -CCA afecte al intercambio de gases y a la fotosíntesis en las plantas y, por tanto, ralentice el crecimiento de las plantas.

Por consiguiente, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede usarse como ingrediente activo fitofarmacéutico, preferiblemente como un agente para mejorar la tolerancia de las plantas a sobrecargas ambientales.

En un aspecto particular de la invención, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se usa para mejorar la tolerancia a sobrecarga por sequía en una planta. En un determinado aspecto, la invención se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para prevenir los efectos de la sequía en una planta. Por ejemplo, la invención

también se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico, o una sal del mismo para prevenir las pérdidas de agua en una planta, especialmente cuando la planta se somete a sobrecarga por sequía. La invención también se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para prevenir o retardar las quemaduras o foliares y/o marchitamiento en una planta. Un objeto adicional de la invención es el uso de ácido β -ciclocítrico, o una sal del mismo, para reducir la necesidad de agua en una planta. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para mejorar la tolerancia de una planta al choque por trasplante. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para mejorar la recuperación de la planta después de sobrecarga por sequía o choque por trasplante. Un aspecto adicional de la invención es el uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para aumentar la vida útil de una planta. En un aspecto particular, la invención se refiere al uso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo para aumentar la vida útil de una planta cortada, por ejemplo, flores cortadas, por ejemplo, en forma de un ramo.

Como se menciona anteriormente, el ácido β -ciclocítrico se refiere al compuesto de fórmula (I) como se muestra anteriormente. El ácido β -ciclocítrico puede prepararse fácilmente por oxidación a partir de β -ciclocitral. El β -ciclocitral es un producto comercial típicamente usado como aditivo aromático en alimentos. Por ejemplo, el β -ciclocitral puede oxidarse en ácido β -ciclocítrico en agua y usarse tal cual. El ácido β -ciclocítrico también puede prepararse por oxidación de β -ciclocitral opcionalmente en presencia de Ag_2O , y después aislarse por extracción con éter dietílico, y recristalización en benceno/ciclohexano, como se describe en Tomita *et al.*, (Environ. Sci. Pollut. Res., 2016, 23:11998-12006).

Como se usa en este documento, "*una sal de ácido β -ciclocítrico*" se refiere a cualquier sal de ácido β -ciclocítrico aceptable para uso fitofarmacéutico.

Huelga decir que, en dicha sal, el ácido β -ciclocítrico está presente como un carboxilato, concretamente como β -ciclocitrato. Sales apropiadas de acuerdo con la invención abarcan, sin limitación, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, y sales de etanolamina, trietanolamina y dimetiletanolamina. Sales preferidas son β -ciclocitrato de sodio, β -ciclocitrato de potasio y β -ciclocitrato de amonio y combinaciones de los mismos.

Como se usa en este documento, "*sobrecarga por sequía*" se refiere a condiciones en donde la planta se expone a una escasez de agua, que significa que el aporte diario de agua proporcionado a la planta, o captado por la planta, es menor que la cantidad diaria de agua mínima necesaria por la planta. La "*sobrecarga por sequía*" puede deberse a causas ambientales tales como sequía meteorológica, por ejemplo, escasez de precipitaciones o periodo seco prolongado, y sequía hidrológica, por ejemplo, deficiencia de agua en el suelo o nivel reducido de agua subterránea. Como alternativa, la "*sobrecarga por sequía*" puede estar provocada por riego irregular que puede producirse durante acontecimientos tales como traslado y distribución de la planta. En determinadas realizaciones, la sobrecarga por sequía puede combinarse con alta temperatura, en particular temperatura mayor de 30 °C. En otro aspecto, la "*sobrecarga por sequía*" puede producirse por trasplante y, por tanto, se refiere a choque por trasplante. Como se usa en este documento, "*trasplante de una planta*" se refiere a la acción de mover una planta desde una ubicación y volver a plantarla en otra ubicación. El trasplante puede provocar daños a los pelos radicales de la planta debido a desarraigo o secado. En consecuencia, la absorción de agua de la planta puede alterarse después del trasplante. Además, la planta puede someterse a un aporte insuficiente de agua durante el trasplante.

La "*sobrecarga por sequía*" puede provocar varios efectos negativos en las plantas. Dichos efectos (también denominados a partir de ahora daños o síntomas) abarcan, sin limitación, disminución en la expansión foliar, clorosis foliar, quemaduras foliares y necrosis, marchitamiento, alteración en el desarrollo de la planta, por ejemplo, detención o disminución en la floración, disminución en el tamaño del fruto o vegetal, disminución en la producción de frutos o vegetales, disminución en el tamaño de la planta, senescencia acelerada, muerte prematura de la planta, caída prematura de las flores, caída prematura de las hojas y disminución en la producción de semillas.

Como se usa en este documento, un compuesto puede "*mejorar la tolerancia o la resistencia de una planta a la sequía*" significa que el tratamiento de la planta con el compuesto promueve la resistencia de la planta a sobrecarga por sequía, concretamente puede prevenir, disminuir o retardar uno o varios efectos provocados o resultantes de la exposición a sobrecarga por sequía en la planta, tal como el marchitamiento, en comparación con una planta de control que no se ha tratado con el compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede aumentar la vida útil de la planta en sobrecarga por sequía, en comparación con una planta de control expuesta a la misma sobrecarga por sequía. En otra realización, el compuesto puede promover la recuperación de la planta después de la sobrecarga por sequía, en comparación con una planta de control que no se ha tratado con el compuesto. En otras realizaciones, un compuesto que puede "*mejorar la tolerancia o la resistencia de la planta a la sequía*" puede reducir las necesidades de agua en la planta, por lo que puede realizarse riego menos frecuente para mantener la planta viva.

La planta que puede tratarse con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede ser de cualquier tipo. La planta puede pertenecer a plantas herbáceas o plantas leñosas. En algunas realizaciones, la planta es una planta de cultivo. Por ejemplo, la planta puede seleccionarse del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Apiaceae*, árboles frutales, *Poaceae* y *Brassicaceae*.

La planta a tratar puede ser una planta de cereal tal como maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, mijo, avena, trigo sarraceno, quinoa o triticale. Como alternativa, la planta puede seleccionarse del género *Gossypium*, es decir, una especie de algodón o de especies de *Nicotiana* (tabaco). Las plantas de cultivo también abarcan cultivos oleaginosos tales como girasol, colza, soja o linaza.

La planta a tratar también puede ser una hortaliza tal como hortalizas cucurbitáceas, del género *Brassica*, frutales o de hoja. Como ejemplo de hortalizas cucurbitáceas, se puede citar el calabacín, pepino, melón y sandía. Las hortalizas del género *Brassica* abarcan, sin limitación, col, brécol, coliflor, berza y mostaza. Ejemplos de hortalizas frutales son, por ejemplo, tomate, pimiento, aguacate, guisante, alubia o berenjena. Las hortalizas de hoja abarcan espinacas, hojas de remolacha, lechuga y similares.

Como alternativa, la planta puede ser una planta ornamental tal como plantas de interior, y plantas florales ornamentales. Por ejemplo, la planta ornamental puede seleccionarse de *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Rosaceae*, *Geraniaceae* y *Violaceae*. Ejemplo de plantas florales ornamentales abarcan, sin limitación, geranios, caléndulas, rosas, pensamientos, orquídeas y petunias.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede usarse para tratar plantas en diversos tipos de situación y entorno, para aumentar su tolerancia a sobrecargas ambientales, en particular a sobrecarga por sequía. La planta puede ser una planta en maceta, tal como una planta de interior o una planta de jardín. Como alternativa, la planta puede estar en la tierra, por ejemplo, que crece en un campo, un jardín o una huerta. La planta puede ser de cualquier fase de desarrollo, tal como en fase vegetativa, fase reproductora o fase de maduración. Por ejemplo, la planta puede ser una plántula, una planta de inicio, un brote o una planta en fase de floración.

La planta puede ser una planta silvestre, por ejemplo, una planta no modificada genéticamente, o una planta modificada genéticamente.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta por cualquier medio convencional, tal como pulverización, difusión, nebulización, inmersión, inundación, espolvoreo o por riego, por ejemplo, riego con aspersor o riego por goteo, quimigación (es decir, por la adición al agua de riego), inyección en la planta, o por inyección en el suelo o el sustrato de la planta. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta al completo o ponerse en contacto con una o más partes de la planta, tal como raíces u hojas. Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico puede producirse directa o indirectamente en la planta u obtenerse de un precursor o sustancia aplicada a la planta de cualquier manera convencional citada anteriormente.

Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico puede disolverse directamente en agua corriente, que entonces puede aplicarse por pulverización, por ejemplo, pulverización foliar, o riego. La frecuencia y duración del tratamiento con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo, así como la cantidad del agente activo a aplicar a la planta pueden variar dependiendo de la especie de la planta a tratar, la situación de la planta, las condiciones ambientales tales como el clima local, y/o la sobrecarga por sequía que se espera. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta antes de una sobrecarga por sequía esperada, por ejemplo, antes de un acontecimiento tal como sequía meteorológica, sequía hidrológica, escasez o eliminación de riego, el trasplante de la planta, el traslado de la planta y la distribución de la planta.

El ácido β -ciclocítrico o una sal puede aplicarse una vez o varias veces a la planta. Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse de forma regular a la planta.

El tratamiento con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede durar varios días, varias semanas o varios meses, dependiendo de la planta a tratar. La frecuencia de las aplicaciones puede ser al menos una vez al mes, al menos una vez a la semana, al menos cada tres días e incluso diariamente. En otras realizaciones, el tratamiento de la planta con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede comprender una sola aplicación del compuesto únicamente, preferiblemente en unos pocos días antes de, o justo antes, de una sobrecarga por sequía esperada.

En un determinado aspecto de la invención, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se usa para mejorar la tolerancia a la sequía en un cultivo. El cultivo puede estar en un invernadero, un campo cubierto o un campo. En algunas realizaciones, la planta es un cultivo de campo, tal como maíz, trigo, algodón, girasol, colza, alubia o tabaco.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede administrarse "como un tratamiento agudo", por ejemplo, cuando se espera un periodo de sequía. Como un ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse antes de un periodo esperado de sequía, o durante periodos con un alto riesgo de sequía, por ejemplo, antes y/o durante el verano. Por motivos de ilustración únicamente, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse al menos un día antes, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 días antes del inicio de un periodo esperado de sequía. Una sola aplicación de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo al cultivo puede realizarse antes de la sequía esperada o durante el periodo de alto riesgo de sequía. Como alternativa, pueden realizarse múltiples aplicaciones, por ejemplo, pueden realizarse al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aplicaciones al cultivo. El número de aplicaciones puede ser, por ejemplo, al menos una vez cada dos semanas, al menos una vez a la semana, al menos una vez cada tres días, una vez cada dos días o una vez al día. Por motivos de ilustración

únicamente, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse al cultivo diariamente, durante un periodo de al menos 4 días antes del periodo esperado de sequía.

En algunas realizaciones, la aplicación de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede continuarse durante el periodo de sequía, con la misma frecuencia o una diferente.

Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse al cultivo de campo como tratamiento profiláctico, de una manera regular. Por ejemplo, el cultivo puede tratarse con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo al menos una vez cada 3 meses, al menos una vez cada 2 meses, e incluso al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces al mes.

El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a las plantas de cultivo durante la fase de crecimiento vegetativo y/o la fase reproductora del cultivo. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede ser adecuado para su aplicación al cultivo desde el inicio de la fase vegetativa hasta la cosecha. La aplicación de ácido β -ciclocítrico también puede realizarse después de la cosecha, por ejemplo, para cultivos de hortalizas. Como ejemplo, la aplicación de ácido β -ciclocítrico a cultivos sembrados en campo puede comenzar justo después de la germinación. Dicho tratamiento puede tener como objetivo potenciar la tolerancia a la sequía y también reducir las necesidades de agua en el cultivo. Como otro ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse al cultivo con riego de agua, concretamente cada vez que se riegue el cultivo. Como ejemplo adicional, el ácido β -ciclocítrico o una sal puede aplicarse a la planta una vez al mes, cada dos semanas o una vez a la semana.

La cantidad de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo a aplicar al cultivo por hectárea puede variar dependiendo de la especie de cultivo y el objetivo que se busque. Por ejemplo, la cantidad de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo aplicada por hectárea puede ser mayor cuando se use como tratamiento agudo para proteger el cultivo contra un periodo esperado de sequía, que cuando se use como tratamiento profiláctico como se describe anteriormente.

La cantidad de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo aplicada por aplicación puede variar de 1 g a 100 kg por hectárea, por ejemplo, de 5 g a 50 kg por hectárea, de 10 g a 1 kg por hectárea, de 100 g a 1000 g por hectárea o de 10 g a 500 g por hectárea. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse al cultivo por cualquier medio convencional, por ejemplo, por difusión, pulverización o riego.

En otro aspecto, el ácido β -ciclocítrico o una sal se aplica a una planta para mejorar su resistencia al trasplante y/o para evitar los efectos del choque por trasplante en la planta. Típicamente, el ácido β -ciclocítrico o una sal puede aplicarse a la planta antes del trasplante, durante, por ejemplo, al menos 6 horas, 12 horas o 18 horas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, o 14 días antes del trasplante. En determinadas realizaciones, una sola aplicación de ácido β -ciclocítrico o una sal se realiza antes del trasplante, por ejemplo, al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas o 96 horas antes del trasplante. En otras realizaciones, pueden realizarse múltiples aplicaciones. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse cada tres días, cada dos días e incluso una vez al día hasta el trasplante. Como ejemplo, la planta puede tratarse con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo diariamente, durante 2 a 6 días, antes de su trasplante.

En algunas realizaciones, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica además a la planta después del trasplante, una vez o varias veces.

Como ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede administrarse a la planta una vez en 96 horas después del trasplante o durante varios días o varias semanas (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4), por ejemplo, al menos una vez a la semana, dos veces a la semana o diariamente, después del trasplante.

En un aspecto adicional, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se usa para mejorar la tolerancia a la sequía de plantas en maceta tales como plantas de jardín y plantas ornamentales en maceta, por ejemplo, plantas de interior.

En particular, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede usarse para mejorar la tolerancia de dichas plantas a una sobrecarga por sequía provocada por riego infrecuente. De hecho, las plantas en maceta, tales como plantas ornamentales en maceta y plantas de jardín pueden estar sujetas a riego irregular, e incluso altas temperaturas, especialmente durante el traslado desde su sitio de producción hasta su sitio de venta, y/o durante su comercialización. Por consiguiente, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta para mejorar la tolerancia de plantas en maceta a sobrecarga por sequía, por ejemplo, que se produce durante el traslado y/o la distribución. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse justo antes de la sobrecarga esperada por sequía, por ejemplo, cuando la planta está aún en el vivero. La planta puede tratarse con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas e incluso al menos 48 horas antes del traslado. El tratamiento con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede repetirse varias veces antes del traslado o comercialización. Por ejemplo, la planta puede tratarse diariamente con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo durante un periodo de varios días antes del traslado y/o comercialización, por ejemplo, durante un periodo de 2 días a 8 días, tal como 3, 4 o 5 días antes del traslado. El tratamiento de la planta con ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede repetirse opcionalmente durante el traslado y/o comercialización, en particular con aplicaciones menos frecuentes.

Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede administrarse a la planta en maceta, en particular a una planta ornamental en maceta, de una manera más regular. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta cada dos meses, una vez al mes o una vez a la semana. Dicho tratamiento aumenta la tolerancia a la sequía de la planta y también puede disminuir la necesidad de agua de la planta y/o aumentar la vida útil de la planta.

La aplicación de ácido β -ciclocítrico o una sal a plantas en maceta puede realizarse de cualquier manera convencional, por ejemplo, pulverización foliar, inundación de la planta y/o riego del sustrato de la planta. Por motivos de ilustración únicamente, la planta puede tratarse con una solución acuosa que comprende ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo por pulverización foliar. En otra realización, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede añadirse al sustrato de la planta, por ejemplo, rengando o mezclando el sustrato de la planta con una composición que contiene ácido β -ciclocítrico.

En otro aspecto, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede usarse para aumentar la tolerancia a la sequía y/o la vida útil de los ramos y otras plantas cortadas, por ejemplo, flores cortadas. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse directamente a la planta antes del corte. En una realización alternativa o adicional, el ácido β -ciclocítrico o una sal puede aplicarse a la planta cortada o al ramo. Típicamente, el ácido β -ciclocítrico puede aplicarse a la planta cortada por pulverización o inmersión. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo también puede añadirse en un sustrato en que se coge la planta cortada o en que se dispone la planta cortada. Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico puede estar presente en una solución acuosa, en donde el tallo cortado de la planta se inserta.

En todos los usos de acuerdo con la invención, el ácido β -ciclocítrico o una sal puede aplicarse como una composición líquida, preferiblemente como una composición acuosa, a la planta (por ejemplo, al cultivo, la planta en maceta, la planta a trasplantar o la planta cortada). La composición líquida puede comprender de 0,001 mM a 100 mM, por ejemplo, de 0,01 mM a 50 mM o de 0,05 mM a 10 mM, tal como de 0,1 mM a 5,0 mM, de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo. El pH de la composición acuosa puede ser de 3 a 9.

Como se menciona anteriormente, el ácido β -ciclocítrico o sal del mismo puede disolverse o dispersarse en agua, que entonces se aplica a la planta por pulverización o por riego. Como alternativa, el ácido β -ciclocítrico puede formularse en una composición fitofarmacéutica, antes del tratamiento de la planta. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición fitofarmacéutica que comprende ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo. Huelga decir que el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo está presente como un ingrediente activo, preferiblemente como un agente activo para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta.

Preferiblemente, la composición fitofarmacéutica es adecuada para proporcionar al menos uno de los siguientes efectos en una planta:

- mejorar la tolerancia a la sequía en una planta,
- evitar uno o varios efectos de la sequía en una planta,
- mejorar la vida útil de una planta, en particular una planta cortada,
- mejorar la tolerancia al choque por trasplante en una planta, y/o
- promover la recuperación de una planta expuesta a sobrecarga por sequía y/o choque por trasplante.

La composición fitofarmacéutica puede ser de cualquier tipo. La composición fitofarmacéutica puede ser, sin limitación, una composición acuosa o hidroalcohólica, una pasta, un gel, en particular un hidrogel, un pegamento, una emulsión, por ejemplo, una emulsión de agua en aceite, una emulsión de aceite en agua, una microemulsión, una emulsión múltiple, una dispersión líquida, una dispersión coloidal, un polvo, en particular un polvo espolvoreables, un gránulo, un granulado, un comprimido dispersable en agua, un polvo soluble en agua y un aerosol.

La composición fitofarmacéutica puede ser una composición lista para usar, concretamente una composición que puede aplicarse directamente a las plantas, por ejemplo, con un dispositivo de pulverización o espolvoreo. Como alternativa, la composición fitofarmacéutica puede ser una composición concentrada, concretamente una composición que tiene que diluirse, dispersarse o disolverse en un disolvente apropiado, por ejemplo, en una solución acuosa, antes de la aplicación al cultivo. Con propósitos ilustrativos únicamente, la composición fitofarmacéutica de la invención está en forma de un polvo o un comprimido que se disuelve o dispersa en agua antes de pulverización foliar. Como ejemplo adicional, la composición fitofarmacéutica de la invención es un concentrado líquido que se diluye en agua, por ejemplo, hasta una concentración de un 1 % a un 20 % v/v antes de la aplicación a la planta. La composición fitofarmacéutica puede comprender uno o varios excipientes. Típicamente, la composición fitofarmacéutica puede comprender de un 0,001 % a un 95 %, preferiblemente de un 0,01 % a un 50 % en peso de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo y de un 5 % a un 99,99 % en peso, preferiblemente de un 50 % a un 99,99 % en peso de uno o varios excipientes, en comparación con el peso total de la composición fitofarmacéutica. Huelga decir que el uno o varios excipientes se seleccionan preferiblemente de excipientes fitofarmacéuticos. Como se usa en este documento "un excipiente fitofarmacéutico" se refiere a un excipiente que no

presenta toxicidad significativa con respecto al entorno (concretamente la flora y la fauna) y los seres humanos, a sus dosificaciones típicas de uso.

Los excipientes fitofarmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la materia, y abarcan, sin limitación, vehículos, en particular disolventes tales como agua y alcohol inferior, aceites minerales o aceites vegetales, diluyentes, tensioactivos, en particular tensioactivos catiónicos, anfóteros o no iónicos, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes, agentes antiespumantes, dispersantes, espesantes, adhesivos, agentes gelificantes, agentes de encapsulación, conservantes, estabilizantes, pigmentos, ceras, látex, goma, modificadores del pH y combinaciones de los mismos.

La composición fitofarmacéutica de la invención comprende (i) ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo como ingrediente activo y (ii) al menos un excipiente seleccionado de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos.

También se describe una composición fitofarmacéutica que comprende al menos un excipiente seleccionado de un tensioactivo, un espesante y un vehículo.

De acuerdo con la invención, debe entenderse que el término "vehículo" significa una sustancia natural o sintética, orgánica o inorgánica que se mezcla o combina con el agente activo para una mejor aplicabilidad a las plantas. El vehículo puede ser sólido o líquido, en general es inerte y debe ser adecuado para su uso en agricultura. Vehículos sólidos o líquidos adecuados incluyen, por ejemplo, sales de amonio y minerales molidos naturales, tales como caolinas, arcillas, talco, cuarzo, atapulgita, montmorillonita o tierra diatomácea, y minerales sintéticos molidos, tales como sílice finamente dividida, alúmina y silicatos naturales o sintéticos, resinas, ceras, fertilizantes sólidos, agua, alcoholes, especialmente butanol, disolventes orgánicos, aceites minerales y aceites vegetales, y también derivados de los mismos. También es posible usar mezclas de dichos vehículos. El vehículo puede representar de un 40 % a un 99,999 % en peso del peso total de la composición.

El tensioactivo puede ser un agente emulsionante, un agente dispersante o un agente humectante. El tensioactivo puede ser catiónico, aniónico, anfótero o no iónico. Como ejemplos de tensioactivos, se pueden citar ácidos grasos, fosfolípidos tales como lecitinas, sorbitano etoxilado esterificado con ácidos grasos tales como polisorbatos, por ejemplo, monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano o monopalmitato de polioxietilen (20) sorbitano, sales de poli(ácido acrílico), sales de ácido lignosulfónico, sales de ácido fenolsulfónico o naftalenosulfónico, policondensados de óxido de etileno con alcoholes grasos o con ácidos grasos o con aminas grasas, fenoles sustituidos (en particular alquifenoles o arilfenoles), sales de ésteres de ácido sulfosuccínico, derivados de taurina (en particular tauratos de alquilo), ésteres fosfóricos de alcoholes polioxietilados o fenoles, ésteres de ácido graso de polioles, y derivados de los compuestos anteriores que contienen funciones sulfato, sulfonato y fosfato. El tensioactivo puede representar de un 0,05 % a un 40 % en peso de la composición.

Los agentes espesantes incluyen, sin limitación, hidrato de alúmina, hidróxido de magnesio, arcillas de bentonita y sílice coloidal, almidones, por ejemplo, almidón de maíz, gomas vegetales, por ejemplo, goma arábiga, goma xantana y goma de tragacanto, derivados de almidón, alginatos, carragenatos, éteres de celulosa tales como metil celulosa, metil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa e hidroxipropil metilcelulosas, poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico) y mezclas de los mismos. El agente espesante puede representar de un 0,05 % a un 50 % en peso de la composición.

También se describe una composición fitofarmacéutica que comprende al menos un tensioactivo y/o al menos un vehículo. Por ejemplo, la composición fitofarmacéutica puede comprender:

- de un 0,001 % a un 50 % de ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo,
- de un 50 % a un 99,999 % de un vehículo, y
- opcionalmente de un 0,05 % a un 20 % de un tensioactivo,

expresándose los porcentajes en peso en comparación con el peso total de la composición fitofarmacéutica.

En algunas realizaciones, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo es el único agente activo presente en la composición fitofarmacéutica. En algunas otras realizaciones, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se usa en combinación con al menos un ingrediente activo fitofarmacéutico adicional. Por consiguiente, la composición fitofarmacéutica, por tanto, puede comprender al menos un ingrediente activo fitofarmacéutico adicional. dichos ingredientes activos adicionales pueden seleccionarse de fitohormonas, herbicidas, fungicidas, plaguicidas, fertilizantes, estimulantes, reguladores del crecimiento de las plantas y combinaciones de los mismos. El ingrediente activo adicional puede representar de un 0,01 % a un 20 % en peso de la composición fitofarmacéutica.

En algunas realizaciones particulares, la composición fitofarmacéutica está desprovista de cualquier regulador del crecimiento de las plantas.

La composición fitofarmacéutica de la invención puede prepararse por cualquier método convencional. Típicamente,

el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se mezcla con uno varios excipientes y opcionalmente con el ingrediente activo adicional, para obtener la composición fitofarmacéutica.

5 La invención también se refiere a un método para tratar una planta, que comprende aplicar ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo a la planta. El método de la invención es para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta.

También se describe un método para

- 10
- evitar uno o varios efectos de la sequía en plantas,
 - mejorar la vida útil de una planta, en particular una planta cortada, frutos u hortalizas cosechadas,
 - mejorar la tolerancia al choque por trasplante en una planta, y/o
 - promover la recuperación de una planta expuesta a sobrecarga por sequía y/o choque por trasplante.

15 El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica en una cantidad eficaz a la planta. Una cantidad eficaz se refiere a una cantidad que posibilita conseguir uno o varios aspectos anteriores, por ejemplo, la mejora de la tolerancia a la sequía en la planta. Como se menciona anteriormente, la "cantidad eficaz" a aplicar, el número de aplicaciones y la duración del tratamiento pueden variar dependiendo de la planta a tratar, la sobrecarga esperada por sequía, la situación de la planta, las condiciones ambientales y el efecto a conseguir.

20 Los métodos de la invención pueden implementarse como se detalla completamente anteriormente para los usos de la invención. Por ejemplo, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse a la planta por cualquier medio convencional tal como pulverización, inundación, inmersión o nebulización, o añadirse al agua de riego.

25 Se describe que el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede disolverse en agua y después aplicarse por riego o pulverización a la planta.

30 De acuerdo con la invención, el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se formula en una composición fitofarmacéutica que se aplica a la planta, opcionalmente después de dilución, disolución o suspensión en un disolvente apropiado tal como agua. El ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo puede aplicarse una vez o más de una vez a la planta, como se describe anteriormente.

El método de la invención comprende las etapas de:

- 35
- proporcionar una composición fitofarmacéutica que comprende ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo, y al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable seleccionado de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos, como se describe anteriormente, y
 - aplicar dicha composición fitofarmacéutica a la planta.

40 El método comprende además una etapa de poner en contacto la planta con una sobrecarga por sequía. Esta etapa se realiza antes, simultáneamente o después de administrar el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo a la planta. La sobrecarga por sequía puede ser una cualquiera como se define anteriormente en este documento.

45 Aspecto y ventajas adicionales de la presente invención se divulgan en la siguiente sección experimental, que debe considerarse ilustrativa y no limitante del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 1. Material y método

• Mediciones por GC/MS

55 Las mediciones por GC/MS de β -ciclocitral y ácido β -ciclocítrico se realizaron como se describe previamente (Ramel *et al.*, 2012, Proceedings National Academy of Sciences USA 109, 5535-5540). La fracción lipídica se extrajo de las muestras (aproximadamente 500 mg de tejidos vegetales) en 4 ml de éter terc-butil metílico (TBME) más 1 ml de HCl 1 mM, que contenía 4-nonanol como referencia interna (10 μ g). Después de centrifugación, el sobrenadante se recogió, se evaporó y se analizó por GC-MS. Se cuantificó β -ciclocitral y ácido β -ciclocítrico en el ion más probable (m/z 137 y 153 respectivamente) en análisis SIM.

• Crecimiento de las plantas y tratamiento de sobrecarga

65 Se cultivaron líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (WT, ecotipo Col 0) y mutantes ost2-2 durante 5 semanas en condiciones de día corto (8 h/16 h, día/noche) en una densidad de flujo de fotones (PFD) moderada de $\sim 150 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura controlada (20 °C/18 °C, día/noche) y una humedad relativa del aire de un 65 %. La sobrecarga por sequía se aplicó deteniendo el riego después del tratamiento con 25 ml de agua o con 25 ml de agua

que contenía β -cca 1,5 mM por maceta.

Se compraron plantas de pimiento y se aclimataron al entorno de verano durante 1 semana. La sobrecarga por sequía se aplicó deteniendo el riego después del tratamiento con 500 ml de agua o de 500 ml de agua que contenía β -cca 0,15 mM por maceta.

Se realizó una experiencia similar con plantas de tomate.

Se compraron plantas de pensamientos (*Viola tricolor*) en el mercado local y se aclimataron al entorno de invernadero durante 1 semana. La sobrecarga por sequía se aplicó deteniendo el riego después de pretratamiento con 300 ml de agua (control) o 300 ml de agua que contenía β -CCA 0,15 mM por maceta (planta pretratada con β -cca). Después de 7 días de retirada del agua, las plantas se volvieron a regar.

Se tomaron imágenes de las plantas 7 días después de detener el riego (figura 7A) y después de una semana de volver a regar (figura 7B). Se contó el número de flores para cada planta.

• Mediciones de la conductancia de los estomas

La conductancia de los estomas se analizó durante la sobrecarga por sequía en al menos dos hojas por planta en seis plantas por condición, usando un porómetro difusor AP4 (Delta-T Devices, Cambridge, Reino Unido). Se tomaron dos lecturas por hoja y se promediaron. Se hicieron mediciones entre 1 y 2 horas después de iluminación, en la superficial foliar abaxial.

• Contenido relativo de agua (RWC)

Se cortaron 6 discos foliares por condición de hojas de plantas tratadas o no tratadas y se pesaron (FW). Para medir el peso turgente (TW), las muestras se sumergieron con agua bidestilada y se dejaron a 4 °C durante 16 horas. El peso seco (DW) se midió después de 16 h a 70 °C en un horno ventilado. El RWC se midió siguiendo la fórmula $(TW-FW)/(TW-DW)$.

• Filtración de iones

Se cortaron 6 hojas por condición de plantas tratadas o no tratadas y se pesaron (FW), y se colocaron en 25 ml de agua bidestilada. La conductividad de la solución se midió después de 2 h de agitación suave y después de hervir las muestras usando un conductímetro DIST-5 Hanna. Los valores se normalizaron al FW (valor) y los valores después de ebullición se presentan como el máx.

2. Resultados

β -CCA es soluble en agua. La adición de β -CCA al agua de riego dio lugar a una acumulación significativa de β -CCA en las hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* a lo largo del tiempo (figura 1A). No se observó aumento significativo en el nivel de β -ciclocital en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* regadas con solución de β -CCA (figura 1B). Dicho resultado indica que β -CCA aplicado de forma exógena se captó por las raíces y se transportó a las hojas. Los autores de la invención también mostraron que β -CCA puede entrar en tejidos foliares y acumularse cuando se aplica directamente sobre las hojas (figura 1C). Por tanto, se aplicara a través de las raíces o directamente a las hojas, el β -CCA se acumuló en las hojas sin ningún cambio en el contenido de β -ciclocital.

Después de regar plantas de *Arabidopsis* con agua que contenía β -CCA (grupo β -CCA) o con agua desprovista de β -CCA al mismo pH (grupo de control), se indujo escasez de agua retirando el riego. Después de 7 días de eliminación del agua, las plantas de control mostraron síntomas claros de sobrecarga y deshidratación (figura 2A). Estos síntomas se atenuaron fuertemente en plantas pretratadas con β -CCA (figura 2A). Después del periodo de sobrecarga por sequía, las plantas se volvieron a regar con agua corriente (sin β -CCA). Las plantas de control no se recuperaron y murieron. En contraste, las plantas que se habían pretratado con β -CCA antes de la sobrecarga por sequía se recuperaron y estaban completamente turgentes (figura 2B). El pretratamiento con β -CCA también aumentó la resistencia a la sequía en otras especies de plantas tales como pimiento (figura 4). Se obtuvo un resultado similar para plantas de tomate (datos no mostrados). El β -CCA también fue eficaz para proteger las plantas el floración contra la sobrecarga por sequía. Como se ilustra en la figura 7, las plantas de pensamientos pretratadas con β -CCA mostraron menos síntomas de sequía que las plantas no tratadas después de una semana de retirada del agua (figura 7A). Además, la planta de pensamientos pretratada con β -CCA tuvo una mejor recuperación después de volver a regarla y mostró significativamente más flores que la planta de control (de promedio, 47 ± 6 flores frente a 23 ± 1 flores).

Los autores de la invención mostraron que la función protectora de β -CCA contra la sobrecarga por sequía no dependía simplemente del cierre de los estomas. No se indujo cierre de los estomas antes de la sobrecarga por sequía por tratamiento con β -CCA. La figura 2C y la figura 3A mostraron que no hubo diferencia significativa en la conductancia de los estomas entre las plantas de control y las plantas tratadas con β -CCA en el día 0

(concretamente justo antes de la sobrecarga por sequía). Además, el cierre de los estomas durante la sobrecarga por sequía fue similar en plantas tratadas con β -CCA y de control (figuras 2C, 3A). De forma notable, el contenido de agua en plantas pretratadas con β -CCA fue significativamente mayor que en las plantas de control, lo que demuestra que β -CCA posibilita evitar la pérdida de agua en las plantas durante sobrecarga por sequía (figura 3C).

De forma importante, el efecto protector de β -CCA contra la sobrecarga por sequía también se observó en el mutante *ost2-2* de *Arabidopsis* (figura 5A). En el mutante *ost2-2* de *Arabidopsis*, la respuesta de los estomas al ácido abscísico (ABA) está alterada y los estomas se mantienen abiertos (Merlot *et al.* 2007, EMBO J. 26, 3216). Como se esperaba, la tasa de transpiración está fuertemente aumentada en *ost2-2* en comparación con la planta silvestre (figura 6A), haciendo que este mutante sea muy sensible a la sobrecarga por sequía. El pretratamiento del mutante *ost2-2* de *Arabidopsis* con β -CCA aumentó significativamente su resistencia a la sobrecarga por sequía, en comparación con el mutante *ost2-2* de *Arabidopsis* de control que se trató con agua desprovista de β -CCA (figura 5A). El mutante *ost2-2* de *Arabidopsis* pretratado con β -CCA se recuperó completamente después de regarse y quedó turgente, mientras el mutante *ost2-2* de *Arabidopsis* de control murió. Una diferencia principal entre la planta mutante de control y la tratada con β -CCA durante la sequía fue que las pérdidas de agua se redujeron drásticamente en las plantas mutantes pretratadas con β -CCA en comparación con las plantas mutantes no tratadas (figura 6B). Por tanto, el tratamiento con β -CCA posibilita mantener un mayor contenido de agua en las hojas en condiciones de sobrecarga por sequía, incluso en plantas en que está anulada la respuesta de los estomas a ABA.

Los autores de la invención también mostraron que la filtración de iones en las hojas en sobrecarga por sequía se redujo notablemente por tratamiento con β -CCA (figura 6C), lo que indica protección de las membranas celulares de las hojas.

Conclusiones

β -CCA puede potenciar notablemente la tolerancia de las plantas a la sobrecarga por sequía. Esta molécula es fácilmente aplicable a plantas por riego del suelo con agua de riego que contiene β -CCA o pulverizando los brotes o las hojas con solución de β -CCA. El β -CCA puede usarse puro en agua o con aditivos.

Ejemplo 2

La exposición a largo plazo de plantas de *Arabidopsis* a β -CCA no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento en condiciones normales. Se regaron plantas de 10 días de edad durante 30 días con agua que contenía β -CCA para proporcionar plantas con 6 mg de β -CCA por planta y por semana. Los resultados se muestran en la figura 8. El β -CCA no tiene efecto sobre la tasa de crecimiento en ausencia de sobrecarga hídrica y no tiene toxicidad.

REIVINDICACIONES

1. Uso de ácido β -ciclocítrico, o una sal del mismo para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta.

2. El uso de la reivindicación 1, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo es para prevenir, retardar o disminuir al menos un efecto de la sequía en la planta, seleccionándose dicho efecto del grupo que consiste en disminución en la expansión foliar, clorosis foliar, quemaduras foliares y necrosis, marchitamiento, detención o disminución de la floración, disminución en el tamaño del fruto o el vegetal, disminución en la producción de frutos o vegetales, disminución en el tamaño de la planta, senescencia acelerada, muerte prematura de la planta, caída prematura de las flores, caída prematura de las hojas y disminución en la producción de semillas.

3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se usa además para mejorar la recuperación de la planta después de una sobrecarga por sequía, y/o para disminuir la necesidad de agua en la planta.

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta por pulverización, difusión, nebulización, inmersión, inundación, espolvoreo, por inyección en la planta, o por inyección en el sustrato de la planta.

5. El uso de la reivindicación 4, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta por pulverización foliar o añadiendo ácido β -ciclocítrico o una sal en el agua de riego.

6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta antes de un acontecimiento seleccionado del grupo que consiste en sequía meteorológica, sequía hidrológica, retirada del riego, trasplante de la planta, traslado de la planta y distribución de la planta.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica una vez o varias veces a la planta antes de dicho acontecimiento.

8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo se aplica a la planta al menos una vez cada tres meses.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la planta es una planta en maceta tal como una planta de interior o una planta de jardín.

10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la planta es una planta de cultivo que crece en campo, invernadero o campo cubierto, y seleccionada del grupo que consiste en *Solanaceae*, *Apiaceae*, árboles frutales, *Poaceae* y *Brassicaceae*.

11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo está presente en una composición fitofarmacéutica que está en forma de una composición acuosa o hidroalcohólica, una pasta, un gel, un pegamento, una emulsión, una microemulsión, una emulsión múltiple, una dispersión líquida, una dispersión coloidal, un polvo, un gránulo, un granulado, un comprimido dispersable en agua, un polvo soluble en agua y un aerosol.

12. Uso de ácido β -ciclocítrico, o una sal del mismo, para aumentar la vida útil de una planta cortada, por ejemplo, flores cortadas.

13. Una composición fitofarmacéutica para mejorar la tolerancia a la sequía en una planta, que comprende (i) ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo como ingrediente activo y (ii) al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable seleccionado de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos.

14. La composición fitofarmacéutica de la reivindicación 13, que comprende un ingrediente activo adicional seleccionado de fitohormonas, herbicidas, fungicidas, plaguicidas, fertilizantes, estimulantes, reguladores del crecimiento de las plantas y combinaciones de los mismos.

15. Un método para mejorar la tolerancia de una planta a sobrecarga por sequía, que comprende

- proporcionar una composición fitofarmacéutica que comprende ácido β -ciclocítrico o una sal del mismo, y al menos un excipiente fitofarmacéuticamente aceptable seleccionado de modificadores del pH, agentes humectantes y combinaciones de los mismos, y

- aplicar dicha composición fitofarmacéutica a la planta antes, simultáneamente o después de la exposición de la planta a una sobrecarga por sequía, seleccionándose dicha sobrecarga por sequía del grupo que consiste en sequía meteorológica, sequía hidrológica, escasez o eliminación de riego, el trasplante de la planta, el traslado de la planta y la distribución de la planta.

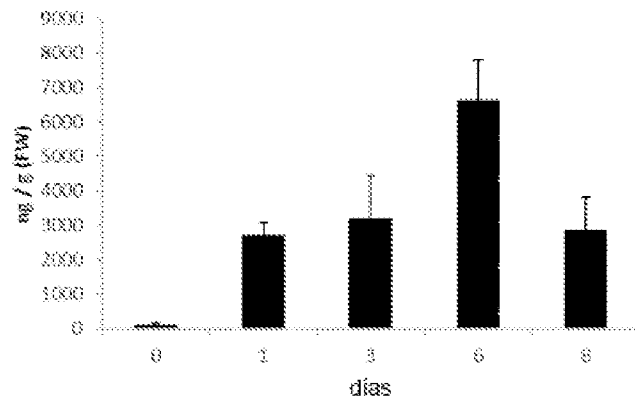


FIGURA 1A

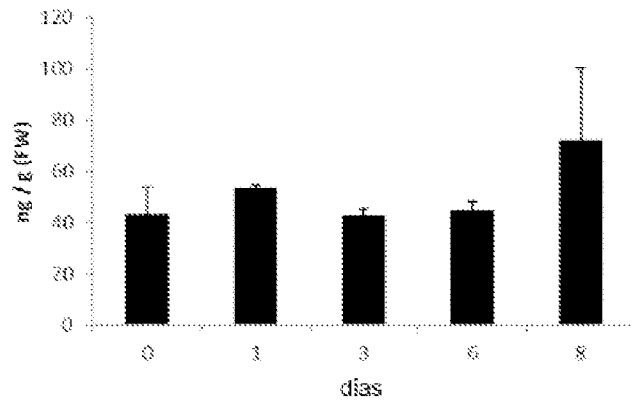


FIGURA 1B

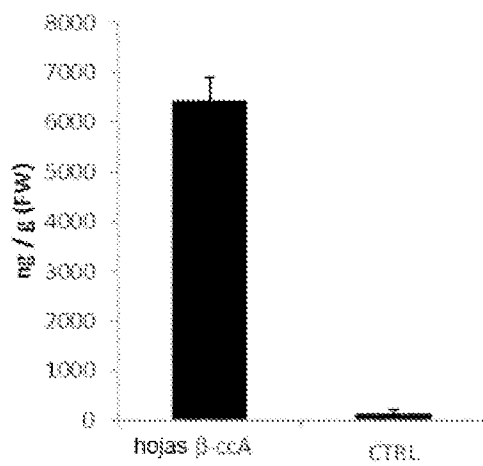


FIGURA 1C

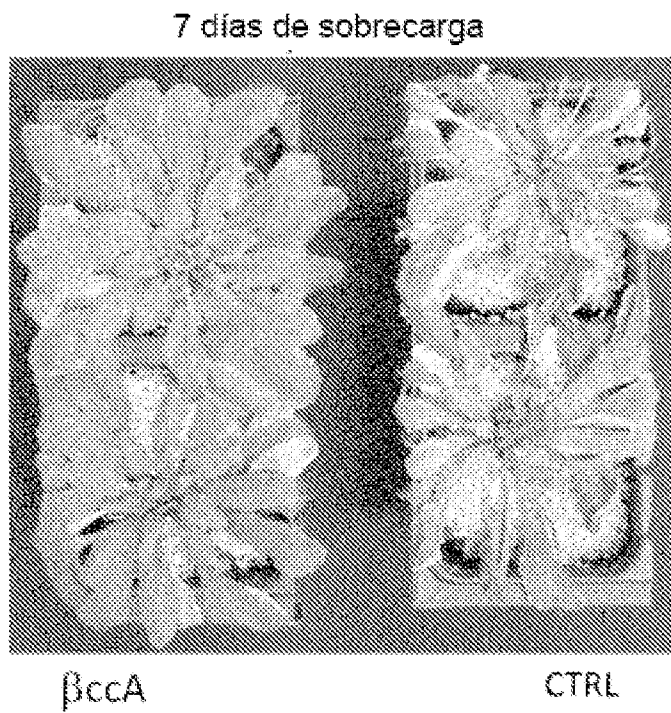


FIGURA 2A

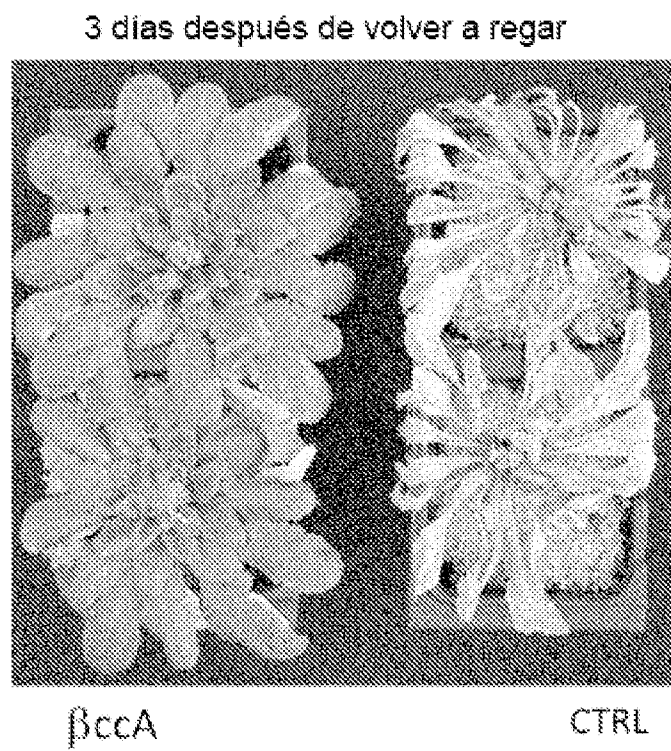


FIGURA 2B

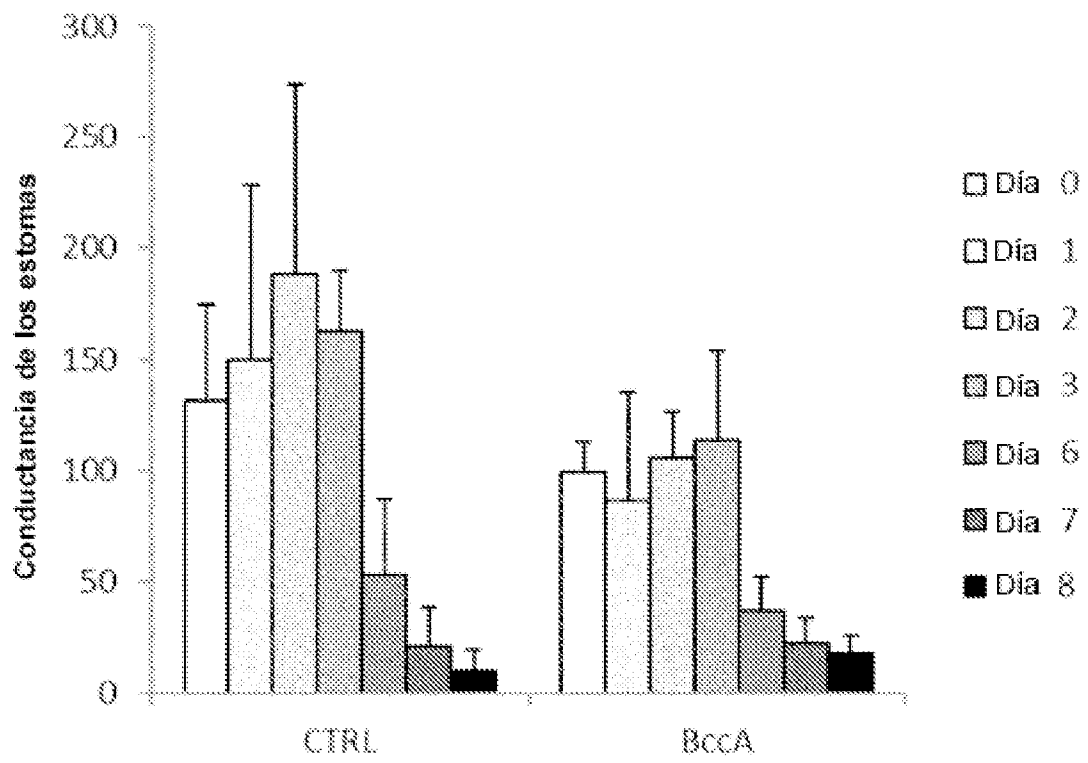


FIGURA 2C

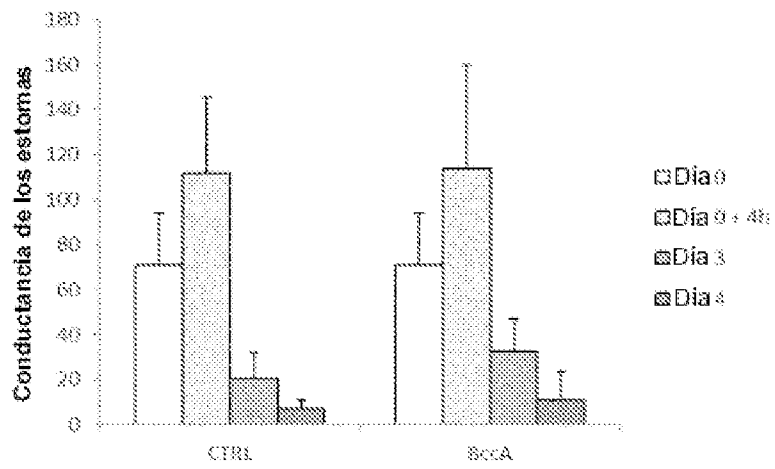


FIGURA 3A

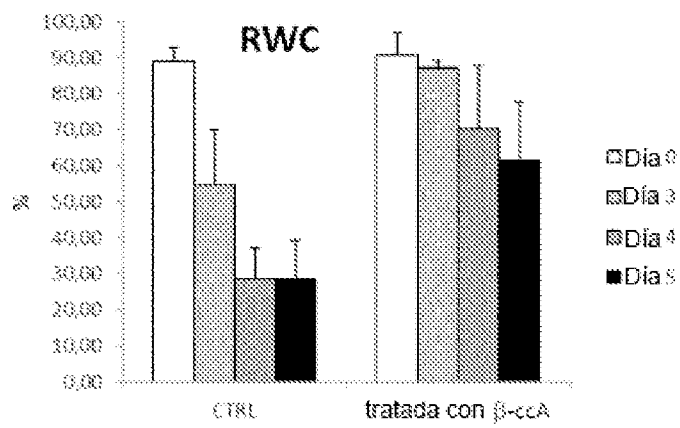


FIGURA 3B

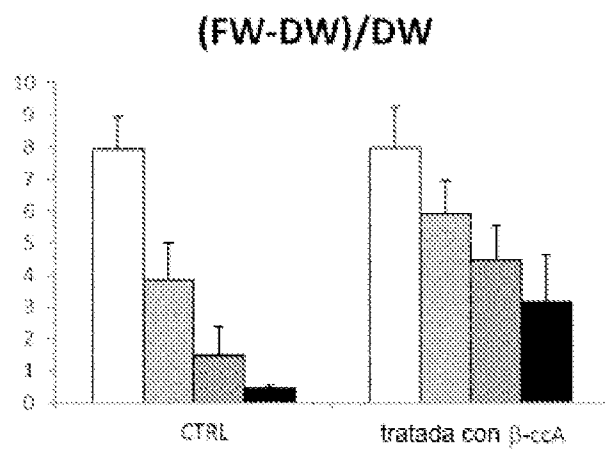


FIGURA 3C



β -CCA

CTRL

FIGURA 4

5 días de sobrecarga

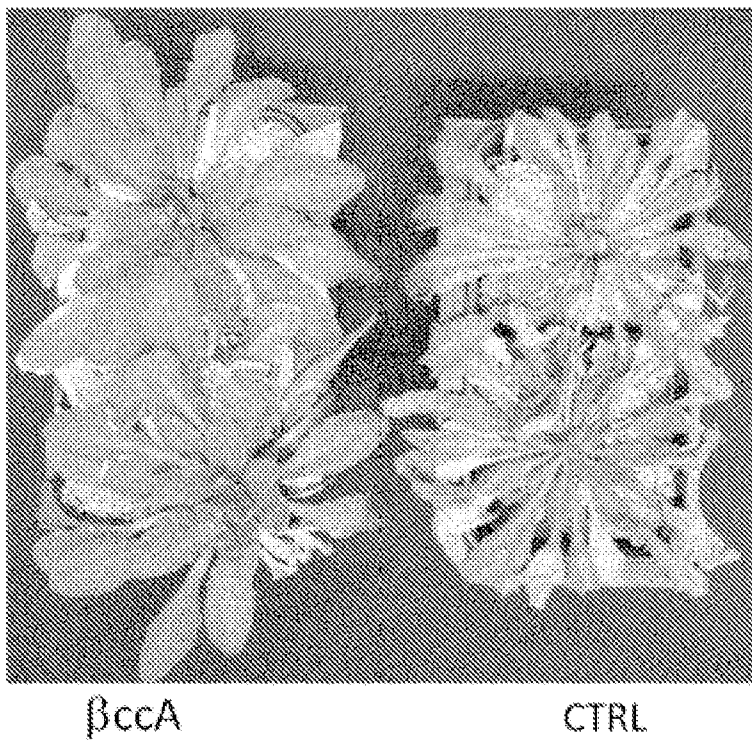


FIGURA 5A

3 semanas después de volver a regar

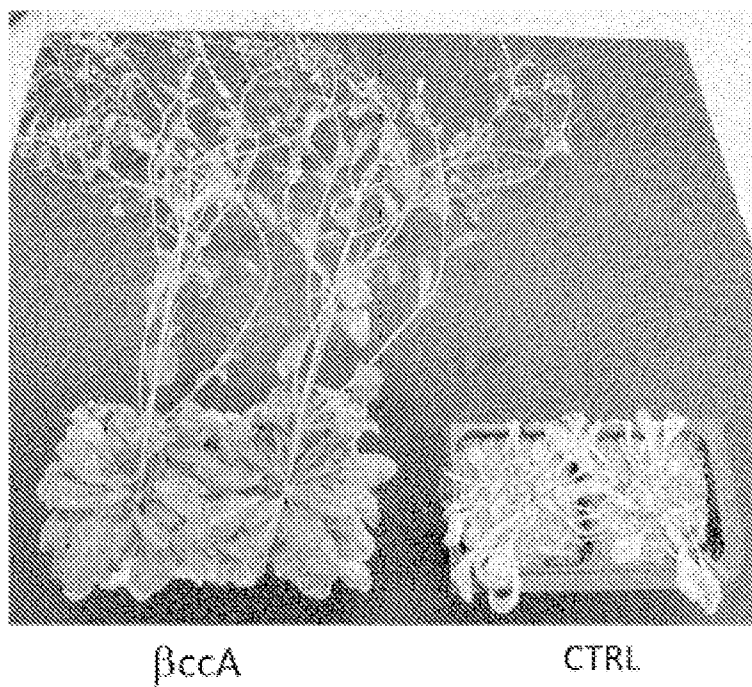


FIGURA 5B

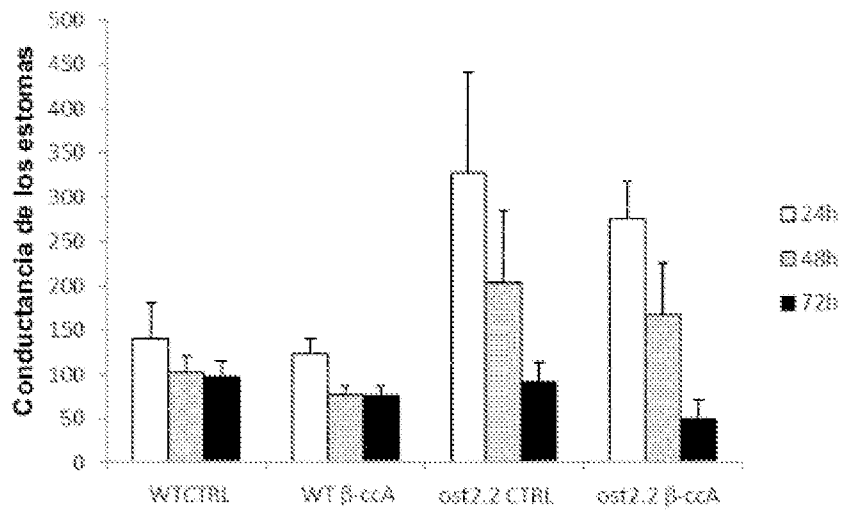


FIGURA 6A

RWC

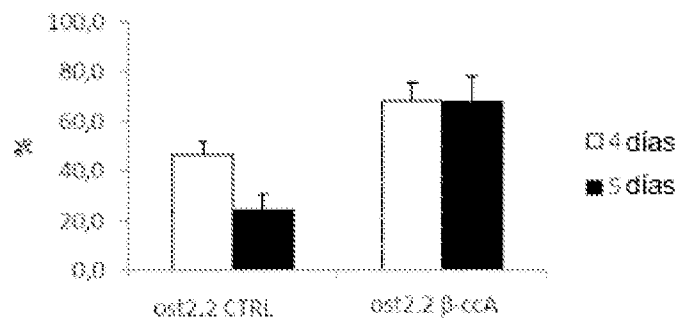


FIGURA 6B

Permeabilidad de la membrana

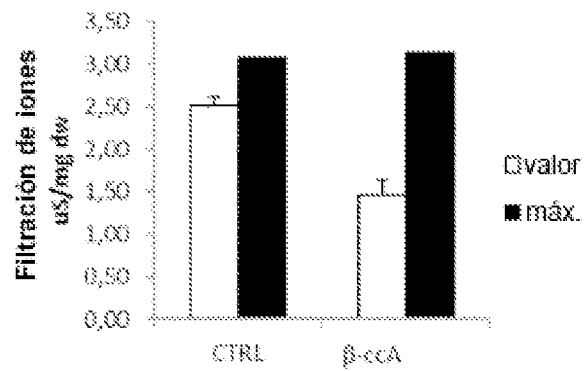


FIGURA 6C

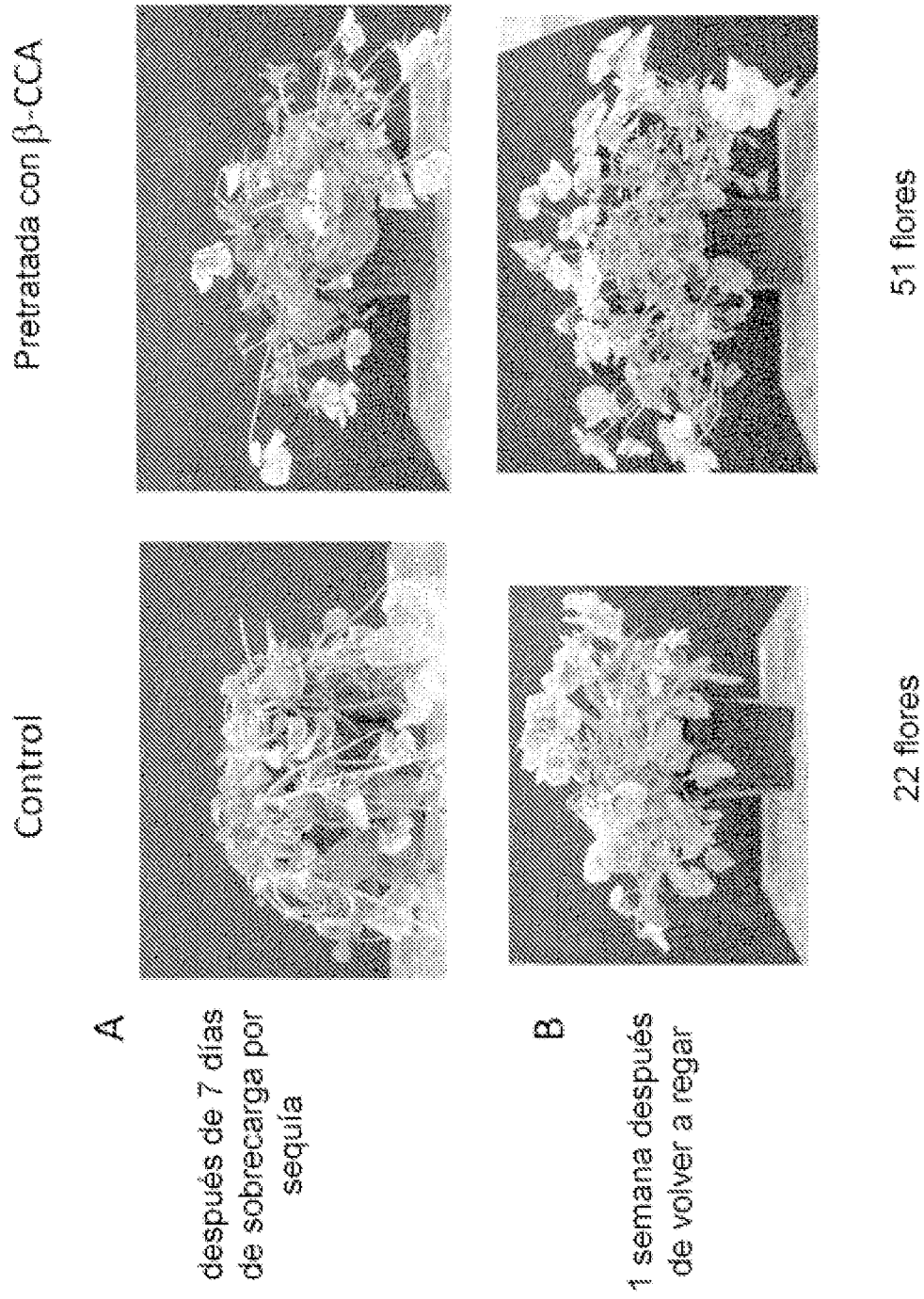


FIGURA 7

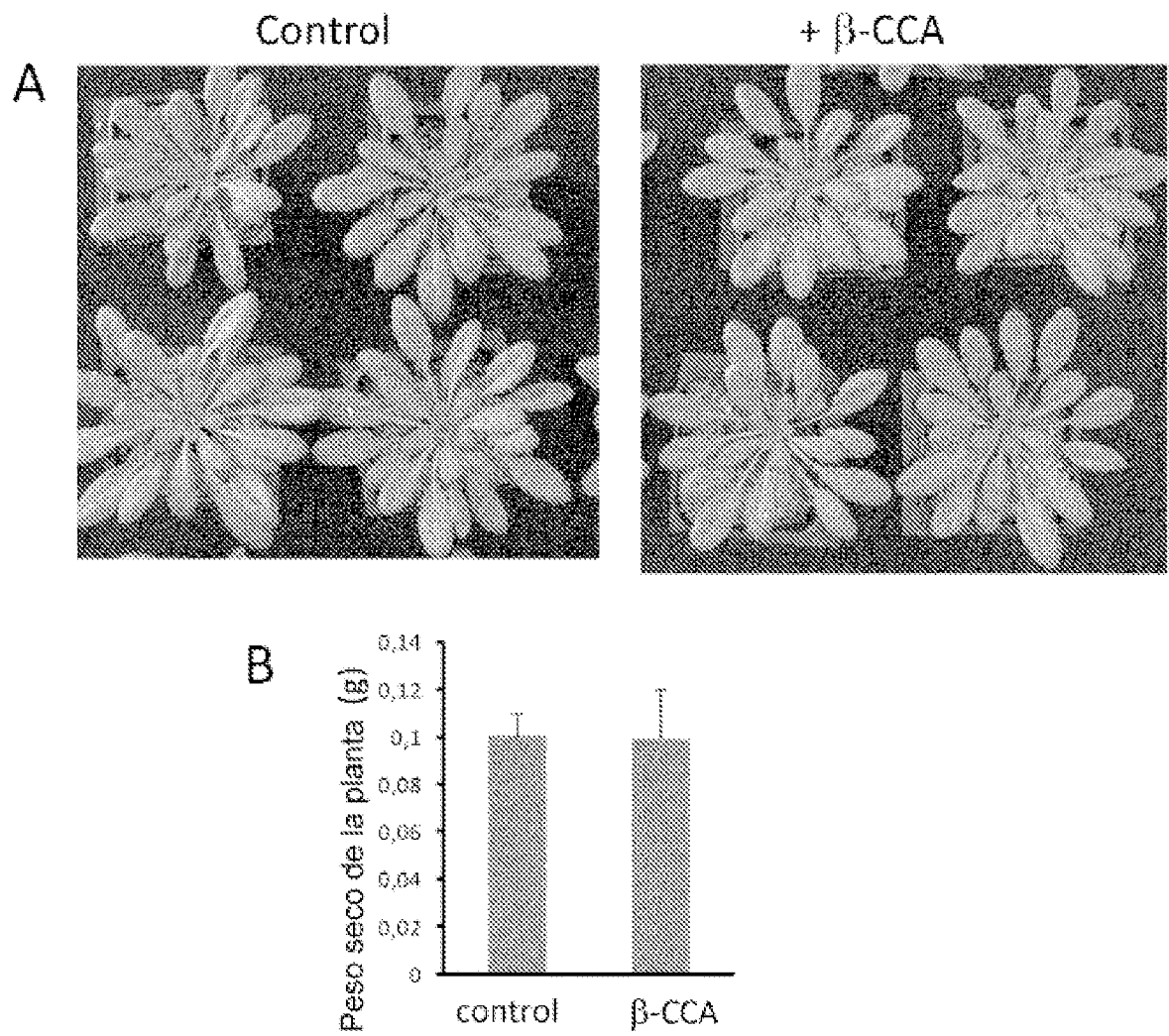


FIGURA 8