

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 668**

51 Int. Cl.:

A01N 65/03

(2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2019** **E 19173064 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3566580**

54 Título: **Uso de un extracto o de una fracción de extracto de alga roja agarofita como elicitador/estimulador de defensa vegetal y aplicación de dicho extracto o de dicha fracción de extracto**

30 Prioridad:

07.05.2018 FR 1870542

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2024

73 Titular/es:

**SOCIETE D'ETUDE ET D'EXPLOITATION
D'ALGUES ET PRODUITS MARITIMES
(SETEXAM) (100.0%)
Km 7, Route de Tanger
14000 Kenitra, MA**

72 Inventor/es:

**LEBBAR, MOHAMED SALIM;
FAUGERON-GIRARD, CÉLINE y
GLOAGUEN, VINCENT**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 958 668 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 un extracto o de una fracción de extracto de alga roja agarofita como elicitador/estimulador de defensa vegetal y aplicación de dicho extracto o de dicha fracción de extracto

5

[0001] La presente invención se refiere al uso de extractos, en particular de extractos naturales, o de fracciones de extractos de algas rojas agarofitas como estimuladores de defensa natural en las plantas terrestres. Se refiere también a los procedimientos de obtención de estos extractos o fracciones de extractos.

10

[0002] La presente invención consiste en la recuperación de extractos de algas rojas agarofitas y su uso como elicitores o estimuladores de defensas naturales que tienen la capacidad de provocar que la planta exprese resistencia de cara al estrés biótico.

15

[0003] El uso de productos químicos, tales como los pesticidas, en el sector agrícola está sujeto a una limitación impuesta en Francia por el plan Ecophyto 2. El objetivo es reducir a la mitad el uso de productos químicos fitofarmacéuticos como los pesticidas de aquí a 2025, manteniendo al mismo tiempo los rendimientos agrícolas, lo que sugiere la elaboración y la aplicación de métodos alternativos como el uso de elicitores que permitirán alcanzar las ambiciones del plan Ecophyto y reducir los riesgos e impactos vinculados al uso de los pesticidas.

20

[0004] Los elicitores son moléculas de señalización que inician el reconocimiento de un microorganismo patógeno en la planta. Son capaces de ligarse de manera específica a los receptores de membranas. Después de la interacción entre el elicitador y el receptor específico, se observa, a nivel celular, una cascada de eventos de señalización. Existe una gran variedad de receptores de membranas y cada uno puede acoger un elicitador bien definido (Benhamou, N., y Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable.: I. Principes de la résistance induite. Phyto-protection 92, 1).

25

[0005] En este sentido, según la interacción, se observará:

30

- una despolarización de membranas, la activación de proteínas G, proteínas quinasas, la liberación intracelular de iones de calcio;
- la expresión de genes de defensa que participa en la vía de biosíntesis de fitohormonas, enzimas, proteínas del estrés, inhibidores de proteasas, metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano, incluidas las fitoalexinas;

35

- la acumulación de formas activas del oxígeno o FAO, moléculas muy activas que presentan una actividad antimicrobiana directa, implicadas también en las reacciones de hipersensibilidad y en el refuerzo de la pared celular.

40

[0006] La acumulación de FAO es un evento que pone en marcha la producción de radicales libres normalmente presentes en la planta en bajas cantidades. En el momento de una agresión, este equilibrio se rompe y la sobreproducción de radicales libres es tóxica para el patógeno, pero también para la planta porque pueden dañar moléculas como el ADN, proteínas, ciertas enzimas y los lípidos de membranas. Esto puede provocar la necrosis de la zona atacada por el patógeno (reacción hipersensible). Con el fin de minimizar este efecto negativo de las FAO, la planta posee enzimas que canalizan su perimetro de acción incluida la peroxidasa. El estallido oxidativo se acompaña por lo tanto habitualmente de una producción de peroxidasas, enzimas que desactivan las FAO, como el H₂O₂, lo que constituye por lo tanto potencialmente un marcador de defensa de la planta.

45

[0007] Los eventos de señalización varían de una planta a otra en términos de intensidad y de orden de aparición y desempeñan un papel importante en la transducción de la señal de estrés. Según la naturaleza del elicitador, se ponen en marcha diferentes respuestas con el fin de resistir al patógeno. Entre estas respuestas, se puede observar un refuerzo parietal. Una papila se sintetiza en el lugar donde entran los organismos patógenos.

50

[0008] La aposición rápida y localizada de compuestos fenólicos, de sílice, de callosa, de proteínas, de glicoproteínas (HRGP), de suberina o de lignina permite espesar la pared celular (Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Le-courieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., y Pugin, A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions 19, 711-724; Senthil-Kumar, M., y Mysore, K. S. (2013). Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. Annual Review of Phytopathology 51, 407-427).

55

60

[0009] La producción de lignina en la zona agredida se efectúa con ayuda de enzimas catalíticas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) que es indispensable para la biosíntesis de fenilpropanoides.

65

[0010] La planta posee un arsenal variado que le permite defenderse y adaptarse al tipo de estrés al cual es sometida. El tipo de resistencia inducida por los elicitores es la resistencia sistémica adquirida. Es una resistencia generalizada al conjunto de la planta. Permite una defensa optimizada contra el patógeno y contra nuevos ataques potenciales. Permite particularmente que la planta esté en estado de espera constante mientras

el efecto del estimulador de defensas naturales esté activo. Es un método preventivo que induce resistencia en la planta y reduce considerablemente el tiempo de respuesta ante el ataque de un patógeno. La estrategia adoptada es proporcionar a la planta un elicitor en una baja concentración, con el fin de reducir considerablemente el tiempo de respuesta ante una agresión. (Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., y Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593; Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 287-294).

[0011] Se puede distinguir los elicitores de origen biótico, de los estreses abióticos como los metales pesados, ciertos detergentes, ciertos antibióticos, las radiaciones UV. Es frecuente encontrar elicitores bióticos en las algas. De hecho, las algas rojas, verdes y pardas poseen polisacáridos parietales variados y específicos capaces de actuar como elicitores bióticos como tales o de una forma despolimerizada (Vera, *Marine Drugs*, 2011, 9, 2514-2525). En particular, las algas rojas ricas en carragenanos (es decir carragenofitas) poseen carragenanos cuyos derivados de oligosacáridos tienen propiedades elicitoras (US 20100173779 A1 y US 20110099898 A1). Hay que destacar que los carragenanos se diferencian de los agares por la ausencia de L-galactosa y 3,6 anhidro-L-galactosa exclusiva a los agares. Ciertas algas verdes poseen ulvanes que, una vez despolimerizados, actúan como elicitores (WO2005094588 A1). En cuanto a las algas pardas, estas últimas son ricas en laminarina que es un glucano de reserva que actúa como elicitor (WO 1994000993 A1). Existen oligoagares de grado de polimerización (DP)₄ obtenidos por despolimerización enzimática y capaces de elicitar el alga roja *Gracilaria* (Weinberger, F., Friedlander, M. y Hoppe, H.-G. (1999). Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 35, 747-755).

[0012] La empresa solicitante ahora ha descubierto los glúcidos y fragmentos de glúcidos de algas rojas agarofitas como las de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria* que presentan una actividad elicitora. La recuperación de estas sustancias de origen natural se efectúa para realizar una aplicación biológica respetuosa con el medio ambiente. Estas sustancias naturales no necesitan una despolimerización previa para activar su carácter elicitor; son activas como tales. Además, estas sustancias elicitoras son hidrosolubles, lo que refuerza su carácter natural.

[0013] La invención se refiere así particularmente a los extractos de moléculas naturalmente presentes en *Gelidium sesquipedale* y capaces de provocar un aumento de ciertos marcadores de elicitación, tales como la callosa, los compuestos fenólicos, las actividades enzimáticas de la peroxidasa y de la fenilalanina amonio liasa (PAL). La invención permite mejorar la resistencia sistémica adquirida y/o la resistencia sistémica inducida acelerando su establecimiento y asegurando una defensa generalizada en la planta.

[0014] La solicitud de patente japonesa JP 2014091709 describe agentes que favorecen el crecimiento de las plantas que consisten en agua tratada con un alcalino obtenido después del tratamiento alcalino de un alga roja y del lavado del agua de tratamiento obtenida en el momento de un proceso de fabricación de agar. Se trata de una aplicación diferente a la de la presente invención, estos agentes que se presentan contienen minerales procedentes del agua de mar de una manera bien equilibrada, y tales minerales participan en el crecimiento de la planta.

[0015] Antonio Ramkissoo, Adesh Ramsuhag y Jayaray Jayaraman, J. *Appl. Phycol* (2017) 29:3235-3244 describen la actividad fitoelicitadora de extractos de tres especies de algas del Caribe que provoca la disminución de los síntomas de infecciones patógenas en las plantas de tomate. Los extractos obtenidos son las mezclas complejas de moléculas. Por el contrario, la presente invención se refiere a extractos o fracciones de extractos que contienen oligosacáridos bien definidos, nunca mencionados en el artículo citado. Además, según este artículo, el extracto se pulveriza a una concentración de 0,5 %, o de 5 g/L. Según la presente invención, los extractos/fracciones de extractos se aplicaban en concentraciones mucho más favorables para las plantas, que están entre 1 y 10 mg/l, o aproximadamente 1000 veces más bajas. Esto viene a corroborar la novedad y el interés de los extractos/las fracciones de extractos según la presente invención. La patente FR 2605185 A1 describe un procedimiento para cultivar una planta que comprende el uso de un oligosacárido que acelera el crecimiento de una planta. La patente US 2015/0351408 A1 describe un procedimiento para elaborar un bioestimulante según el cual se tritura el alga fresca, se lava, se trata con un ácido, luego con KOH, se separa y se recupera la fase líquida, luego se le agrega leonardita americana hidrolizada, y se seca para obtener un polvo. Weinberger *et al.*, *Journal of Phycology*, vol. 37, nº 3, junio de 2001, 418-426, describen la preparación, por hidrólisis enzimática parcial de agarosa, de fracciones de neoagarosacáridos con un grado de repetición de disacárido que oscila entre 1 (neoagarobiosa) y más de 8 (neoagarohexadecaosa). XIUJUAN WANG *et al.*, *Journal of Applied Phycology*, vol. 25, nº 6, 12 de marzo de 2003, 1895-1902, describen la mejora de la salud de un alga no terrestre, el alga roja marina *Pyropia haitanensis* mediante agarooligosacáridos. La patente WO 03/041679 A2 describe el uso de un extracto hidroalcohólico de alga roja para la preparación de una composición alimentaria o cosmética, destinada a inducir la síntesis de proteínas del estrés en el momento que se producen restricciones físicas sobre las células. La patente CN105732734 A se refiere al alga roja *Palmaria palmerte*, especie no agarofita, la cual se somete a una extracción con fluido supercrítico (CO₂) para la obtención de floridosida.

[0016] El objeto de la presente invención es en primer lugar el uso como elicitador/estimulador de defensa en las plantas terrestres de un extracto o de una fracción de extracto de por lo menos un alga roja agarofita, dicho extracto o dicha fracción de extracto contiene al menos un oligosacárido que tiene de 2 a 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente, y polisacáridos que tienen más de 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente pudiendo ser contenidos que no superen el 0,01 % en peso respecto a los oligosacáridos/polisacáridos totales.

[0017] Se ha definido aquí un oligosacárido como un compuesto que contiene de 2 a 50 unidades de osa y un polisacárido como un compuesto que contiene más de 50 unidades de osa.

[0018] Se utiliza también a continuación la expresión "grado de polimerización" (DP) para expresar este número de unidades de osa.

[0019] Las algas rojas agarofitas se pueden seleccionar entre las de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*, y pueden particularmente ser *Gelidium sesquipedale*.

[0020] En particular, el extracto o la fracción de extracto puede contener, como oligosacárido(s), al menos un oligosacárido nativo o sustituido elegido entre:

- un (Gal)*n*-glicerol con Gal = unidad de galactosa y $2 \leq n \leq 4$;
- un disacárido constituido por dos unidades de hexosa;
- un disacárido constituido por dos unidades de ácido galacturónico.

[0021] El extracto o la fracción de extracto puede también contener al menos un monosacárido, nativo o sustituido por glicerol o un metilo, el o los monosacáridos pudiendo ser elegidos entre floridosida/isofloridosida (Gal-glicerol), 3,6-anhidrogalactosa, ácido galacturónico, hexosas o pentosas.

[0022] Dicho extracto puede consistir en un extracto:

- por una solución acuosa alcalina con pH básico, particularmente por sosa a 0,1-10 % en peso, preferiblemente 2-5 % en peso, seguido de una neutralización con un ácido y con una eliminación al menos parcial de los polisacáridos que tengan más de 20 unidades de osa conectadas entre sí de manera covalente, por ejemplo mediante precipitación del filtrado con etanol; o
- por una solución hidroalcohólica, el alcohol habiéndose eliminado posteriormente; o
- por un alcohol como el etanol, el alcohol habiéndose eliminado posteriormente,

un extracto que puede también ser: una de las fases acuosas obtenidas por las filtraciones efectuadas en el momento del procedimiento de extracción del agar a partir de un alga roja agarofita respectivamente después del tratamiento alcalino de las algas, después del aclarado con agua del residuo así obtenido, después de la neutralización con ácido del residuo obtenido en el momento de este aclarado, después del aclarado con agua del residuo obtenido en el momento de esta neutralización; o el extracto obtenido mediante la extracción en caliente del residuo obtenido en mismo tiempo que el gel de agar en el momento de una extracción en caliente/filtración del residuo obtenido después de este último aclarado con agua; y el jugo de sinéresis obtenido después de la congelación-descongelación y/o por prensado mecánico de este gel de agar, y una fracción de extracto resulta del fraccionamiento de un extracto por ultrafiltración o por cromatografía de exclusión estérica, dicho extracto o dicha fracción de extracto puede entonces haber sido concentrado, deshidratado o liofilizado.

[0023] El extracto o la fracción de extracto puede haberse preparado mediante un procedimiento según el cual se ha realizado una extracción acuosa, alcohólica o hidroalcohólica, en caliente, de dicha o dichas algas rojas agarofitas, con una eliminación ulterior del alcohol en el caso de una extracción alcohólica o hidroalcohólica,

dicha extracción pudiendo ser una extracción acuosa alcalina, en particular una extracción acuosa alcalina, según la cual se obtiene, después de dicho tratamiento alcalino y por filtración, por una parte, una fase acuosa (A1) y por otra parte un residuo (R1);

luego se puede efectuar un aclarado con agua destilada de dicho residuo (R1) para obtener después de la filtración por una parte una fase acuosa (A2) y por otra parte un residuo (R2);

luego se puede efectuar una neutralización con ácido de dicho residuo (R2) para obtener, después de la filtración, por una parte una fase acuosa (A3) y por otra parte un residuo (R3);

luego se puede efectuar un aclarado con agua destilada de dicho residuo (R3) para obtener, después de la filtración, por una parte, una fase acuosa (A4) y, por otra parte, un residuo (R4);

luego se puede efectuar una extracción en caliente y una filtración de dicho residuo (R4) para obtener por una parte un residuo (R5) y, por otra parte, un gel de agar;

luego se puede realizar una extracción con agua caliente de dicho residuo (R5) para obtener una fase acuosa (A5);

luego se puede realizar una congelación-descongelación y/o prensado mecánico de dicho gel de agar para obtener, por una parte, un jugo de sinéresis (JS) y un gel de agar puro;

dichas fases acuosas (A1) a (A5) y dicho jugo de sinéresis (JS) representan cada una también un extracto deseado,

dicho extracto puede ser sometido a un tratamiento con etanol para obtener por una parte, un extracto etanólico (EE) y por otra parte un precipitado, dicho extracto etanólico siendo sometido a un fraccionamiento por ultrafiltración o por exclusión estérica que permite aislar una fracción de extracto que contiene al menos un oligosacárido que tiene de 2 a 50 unidades de osa conectadas entre ellas de manera covalente, y los polisacáridos que tienen más de 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente pudiendo ser contenidos que no superen 0,01 % en peso respecto a los oligosacáridos/polisacáridos totales, dicho extracto o dicha fracción de extracto puede entonces haber sido concentrado, deshidratado o liofilizado.

[0024] El extracto o la fracción de extracto según la invención puede encontrarse en un medio acuoso, o puede presentarse en forma de polvo.

[0025] La invención también se refiere a un procedimiento para estimular la defensa natural en una planta terrestre, caracterizado por el hecho de que consiste en aplicar sobre el conjunto de la planta o sobre una parte de ésta, comprendiendo el aparato vegetativo, el sistema radicular, los frutos, las semillas y las simientes de dicha planta, o incluso sobre el suelo o el sustrato de cultivo de la planta, una cantidad eficaz para estimular las defensas naturales, de dicha planta, del extracto o de la fracción de extracto tal como se define según la presente invención, en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos.

[0026] Se puede tratar las plantas de utilidad agronómica, de grandes cultivos, incluidas las oleaginosas como el girasol o la soja, las proteaginosas como el garbanzo, los cereales como el maíz o el trigo, los árboles frutales como los perales, los manzanos, los nectarinos, las plantas hortícolas como los rosales, las plantas de pradera, y las plantas de horticultura como el tomate, el melón, la lechuga o las espinacas.

[0027] Se puede aplicar el extracto líquido o la fracción de extracto líquido a la planta o parte de planta o semillas o simientes o al suelo o sustrato en una concentración de oligosacárido(s) de 0,0001 a 100 g/L, preferiblemente de 1 a 10 mg/L. Se puede igualmente aplicar el extracto o la fracción de extracto en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos en una proporción de 1 a 1000 g de oligosacáridos por hectárea.

[0028] La aplicación se puede efectuar de 1 a 20 veces, preferiblemente de 3 a 5 veces por año de cultivo.

[0029] La invención se refiere igualmente a una composición para la implementación del procedimiento según la invención, caracterizada por el hecho de que consiste en un extracto o fracción de extracto como se define anteriormente obtenido a partir de *Gelidium sesquipedale*, en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos y en su caso incorporado en un producto fitosanitario o fertilizante o con al menos un adyuvante elegido entre tensioactivos, dispersantes, agentes conservantes, antiaglomerantes, oligoelementos, enmiendas, elementos correctores de carencias, fungicidas, insecticidas, herbicidas, hormonas de crecimiento.

Ejemplo 1: Obtención de un extracto alcalino y fraccionamiento

[0030] 100 g de algas secas *Gelidium sesquipedale* se mezclan a 1500 mL de una solución de sosa a 2 % en peso/volumen y se agitan durante 1 hora a 70-80 °C. Se neutraliza con ayuda de ácido sulfúrico a 1 % en volumen.

[0031] A continuación, la mezcla se filtra a través de una tela de Nylon con una porosidad de 53 µm. Las partículas insolubles se retienen en el filtro y se eliminan.

[0032] La fracción polisacáridica de grado de polimerización superior a aproximadamente 50 se elimina mediante precipitación con 3 volúmenes de etanol.

[0033] La fracción etanólica contiene particularmente los oligosacáridos y monosacáridos. A continuación, el etanol se elimina mediante evaporación rotativa para obtener una solución acuosa del extracto.

Ejemplo 2: Fraccionamiento del extracto del ejemplo 1 mediante ultrafiltración

[0034] El filtrado (o solución acuosa del extracto) obtenido se fracciona por ultrafiltración sobre una membrana con una porosidad de 5 kDa en primer lugar con el fin de eliminar los compuestos con masas superiores o iguales a 5000 Da (incluidos los polisacáridos) y contenidos en el retenido.

[0035] El permeado se recupera y se somete a una ultrafiltración sobre una membrana de 1000 Da, lo que permite la obtención de fracciones enriquecidas con oligosacáridos en el retenido-1000 Da.

[0036] Las fracciones se caracterizaron mediante ensayos colorimétricos de las osas según el método de Dubois *et al.* (DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356) los ácidos urónicos (Blumenkrantz, N., y Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489), los compuestos fenólicos (método de Singleton V L & Rossi J A Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58, 1965), las proteínas (Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254). Luego, la composición de monosacáridos se establece por CG después de la obtención de los derivados de acetatos de alditol según Stevenson, T.T., y Furneaux, R.H. (1991). Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research* 210, 277-298. El contenido de materia seca del extracto se determina mediante pesaje después de la liofilización.

Tabla 1

Composiciones determinadas por ensayos colorimétricos (% másico)						
Fracción	% Ácidos urónicos	% Osas neutras	% compuestos fenólicos	% Proteínas	mg SO ₄ /mg osa	% inorgánico
Re 5 kDa	1,6	51,4	3,2	1,3	1,8	39
Pe 5 kDa	0,4	38,6	0,4	0,8	1,6	40,7
Re 1 kDa	0,8	81,3	0,9	2,2	0,5	14,3
Pe 1 kDa	0,4	29,9	0,1	0,4	1	45,4
Re: retenido Pe: permeado						

[0037] Los ensayos colorimétricos revelan un predominio de glúcidos. Las fracciones poseen también proteínas, compuestos fenólicos y ácidos urónicos pero en proporciones inferiores a esta en osas neutras. Los glúcidos presentes tienen funciones de sulfatos cuya proporción difiere según la fracción.

Tabla 2

Composición de monosacáridos (% molar)										
Fracción	3,6 An-Gal	Gal	Xyl	Glc	Man	Fuc	Hha	Gal A	Glc A	6-O-Me-Gal
Re 5 kDa	43	12	18	ND	1	1	2	10	5	3
Pe 5 kDa	20	44	12	2	7	11	ND	2	1	1
Re 1 kDa	28	25	29	1	1	5	ND	4	7	ND
Pe 1 kDa	37	25	20	4	5	9	ND	ND	ND	ND
3,6 An-Gal: 3,6 anhidrogalactosa; Gal: galactosa; Xyl: xilosa; Glc: Glucosa; Man: manosa; Fuc: fucosa; Rha: ramnosa; Gal A: ácido galacturónico; Glc A: ácido glucurónico; 6-O-Me-Gal: 6-O-metil-galactosa ND: no detectado Re: retenido Pe: permeado										

[0038] Se observa en la composición de monosacáridos deducida del análisis CG que la galactosa es mayoritaria particularmente en su forma 3,6 anhidrogalactosa.

Tabla 3

Rendimiento másico	
Fracción	Porcentaje másico con respecto a la masa de algas inicial (% MS)
Re 5 kDa	5,2
Pe 5 kDa	32,8
Re 1 kDa	5,8
Pe 1 kDa	26,4

[0039] Los rendimientos másicos reflejan una distribución de masa del retenido y del permeado resultantes de la ultrafiltración a 5 kDa desigual y se puede observar que los compuestos cuyo tamaño es superior a 5 kDa representan 5 % de la masa seca inicial en algas y que 33 % de la masa de la biomasa seca inicial se recuperan en el permeado y contienen por lo tanto los compuestos de tamaño inferior a 5 kDa.

[0040] La ultrafiltración a 1 kDa efectuada sobre el permeado recuperado en el momento de la ultrafiltración a 5 kDa permite la obtención de un nuevo permeado y de un retenido con una distribución próxima a la obtenida para la ultrafiltración a 5 kDa.

[0041] La ultrafiltración a 1 kDa permite también eliminar en el permeado los compuestos inorgánicos y los mono y disacáridos.

Ejemplo 3: Obtención de un extracto acuoso o alcohólico o hidroalcohólico

[0042] 100 g de algas secas se mezclan con 1 L de agua o etanol o una mezcla de agua-etanol (20/80 v/v) y se agitan durante 1 hora a 50-60 °C. Luego la mezcla se filtra a través de tela de Nylon con una porosidad de 53 µm. Las partículas insolubles se retienen en el filtro y se eliminan.

Tabla 4

Porcentaje de osas neutras de la fracción	
Fracción	% ON
Extracción H ₂ O	15,2
Extracción H ₂ O / EtOH	54
Extracción EtOH	1,5

Tabla 5

Porcentaje másico de la fracción con respecto a la masa de alga seca inicial	
Fracción	Porcentaje másico (% materia seca)
Extracción H ₂ O	1,83
Extracción H ₂ O / EtOH	0,49
Extracción EtOH	0,19

[0043] La extracción con agua o con etanol permite recuperar fracciones que contienen glúcidos que oscilan entre 1 y 15 % en masa de la fracción.

[0044] La extracción efectuada con una mezcla agua/etanol permite recuperar una fracción que contiene 52-54 % en osas. Los rendimientos másicos de las extracciones efectuados con agua, con etanol o con ayuda de un solvente agua-etanol no sobrepasan el 2 % con respecto a la masa de algas secas.

Ejemplo 4: Fraccionamiento del extracto del ejemplo 1 mediante cromatografía de exclusión estérica

[0045] La solución acuosa del extracto obtenida en el ejemplo 1 se fracciona mediante cromatografía de exclusión estérica en una columna que tiene, como fase estacionaria, un gel de poliácridamida con un umbral de exclusión de 100-1800 Da. La fase móvil es agua ultrapura desgasificada; el caudal es de 0,18 ml.min⁻¹. Las fracciones recogidas son de 1,8 ml. Se analizan por CCF y se reúnen aquellas que contienen glúcidos y que presentan el mismo perfil: se obtienen tres fracciones F1, F2 y F3.

[0046] Estas fracciones se caracterizaban mediante ensayo colorimétrico, CG y ESI-MS.

Tabla 6

La tabla 6 a continuación proporciona el rendimiento másico.	
Fracción	Porcentaje másico con respecto a la masa de algas inicial (% materia seca)
F1	3,4
F2	3,2
F3	1,8

[0047] Las fracciones F1 y F2 representan cada una un 3-4 % en peso de la masa de algas inicial y la fracción F3 representa un 1,8 %.

Tabla 7

La tabla 7 a continuación, proporciona las composiciones determinadas mediante ensayos colorimétricos.						
Fracción	% Ácidos urónicos	% Osas neutras	% Fenoles	% Proteínas	moles SO ₄ / mol osa	% inorgánico
(% másico/fracción)						
F1	2,1	32,0	2,0	4,7	0,5	17
F2	0,9	15,4	0,7	0,6	0,1	0,3
F3	0,5	9,6	0,3	0,6	0,3	1

[0048] Los ensayos colorimétricos muestran una preponderancia de glúcidos. Las fracciones contienen también proteínas, compuestos fenólicos y ácidos urónicos y las osas recuperadas son sulfatadas en particular en las fracciones F1 y F3.

- 5 [0049] La tabla 8 a continuación proporciona la composición de monosacáridos (% molar) de las fracciones F1, F2 y F3.

Tabla 8

Fracción	3,6 An-Gal	Gal	Xyl	Glc	Man	Fuc	Gal A
F1	40,2	18,6	8,2	2,0	18,1	7,9	5,0
F2	38,1	8,9	5,9	2,0	16,4	8,2	20,5
F3	3,2	86,3	3,5	3,1	3,8	ND	ND

3,6 An-Gal: 3,6 anhidrogalactosa; Gal: galactosa; Xyl: xilosa; Glc: glucosa; Man: manosa; Fuc: fucosa; Gal A: ácido galacturónico
ND: no detectado

- 10 [0050] Se observa en la composición de monosacáridos deducida del análisis CG que la galactosa es mayoritaria particularmente en su forma 3,6 anhidrogalactosa. Se nota también la presencia de xilosa, de glucosa, de manosa, de fucosa, de ácido galacturónico. Composición de las fracciones F1, F2 y F3 mediante espectrometría de ionización por electrospray (ESI):
Espectro ESI de la fracción F1:

15

Masa observada m/z	Masa teórica (MW)	DP	Compuesto identificado
170,97 = M - H + 2Na	125,99		Ácido isetiónico
161,05 = M - H	162,05	1	3,6 anhidrogalactosa
179,06 = M-H 203,06 = M - H + Na	180,06	1	Hexosa
277,1 = M-H + Na	254,1	1	Floridosida/isofloridosida
365,12 = M - H + Na	342,12	2	(Hexosa) ₂
393,22 = M - H + Na	370,22	2	(Ácido galacturónico) ₂

[0051] Se observa en el espectro en el modo negativo la presencia de 3,6 anhidrogalactosa y de hexosa (galactosa, manosa o glucosa) de DP1.

- 20 [0052] Se observa en el espectro en el modo positivo la presencia de hexosa de DP1, de ácido isetiónico, de floridosida/isofloridosida, de hexosa de DP2, de ácido galacturónico DP2.

[0053] Espectros ESI de la fracción F2

Masa observada m/z	Masa teórica (MW)	DP	Compuesto identificado
170,97 = M - H + 2Na	125,99		Ácido isetiónico
161,05 = M - H	162	1	3,6 anhidrogalactosa
253,06 = M - H + Na	180	1	Hexosa
277,1 = M - H + Na	254	1	Floridosida/isofloridosida
365,12 = M - H + Na	342	2	(Hexosa) ₂
439,16 = M - H + Na	418	2	Derivado de floridosida: (Hexosa) ₂ -glicerol
527,17 = M - H + Na	504	3	(Hexosa) ₃
601,21 = M - H + Na	578	3	Derivado de floridosida: (Hexosa) ₃ -glicerol
689,22 = M - H + Na	666	4	(Hexosa) ₄
763,26 = M - H + Na	140	4	Derivado de floridosida: (hexosa) ₄ -glicerol

25

[0054] Se observa en el espectro en el modo negativo la presencia de 3,6 anhidrogalactosa y de hexosa de DP1. En el espectro en el modo positivo, se nota la presencia de hexosa de DP1 a 4, de ácido isetiónico, de floridosida/isofloridosida, de derivados de floridosida de DP2 es decir 2 hexosas y una función de glicerol, DP3 es decir 3 hexosas y una función de glicerol y DP4 es decir 4 hexosas y una función de glicerol.

30

[0055] Espectro ESI modo positivo de la fracción F3:

Masa observada m/z	Masa teórica (MW)	DP	Compuesto identificado
170,07 = M - H + 2Na (trazas)	125,99		Ácido isetiónico
277,1 = M - H + Na	254	1	Floridosida/isofloridosida
439,16 = M - H + Na	416	2	Derivado de floridosida (Hexosa) ₂ -glicerol
601,21 = M - H + Na	578	3	Derivado de floridosida (Hexosa) ₃ -glicerol

[0056] Se observa en el espectro en el modo positivo la presencia de ácido isetiónico, de floridosida/isofloridosida y de derivados de floridosida de DP2 y DP3.

- 5 [0057] Espectro MS/MS de los picos correspondientes a la masa de 253 Da atribuida a la floridosida/isofloridosida (M-H):

m/z teórico (Chen. <i>et al.</i> 2014)	m/z experimental
59,51	59,01
71,37	71,01
87,38	89,02
101,21	101,02
119,27	119,03
125,23	125,02
161,22	161,04

- 10 [0058] Juanjuan Chen, Dandan Song, Qijun Luo, Tong Mou, Rui Yang, Haimin Chen, Shan He, y Xiaojun Yan (2014). Determination of Floridoside and Isofloridoside in Red Algae by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Analytical Letters Volumen 47, páginas 2307-2316.

- 15 [0059] Se destaca que los picos del espectro teórico de fragmentación (MS/MS) del floridosida/isofloridosida corresponden a los obtenidos de forma experimental. Esto muestra la presencia de floridosida/isofloridosida en las fracciones F1 a F3.

[0060] Espectro MS/MS del pico correspondiente a la masa de 416 Da atribuida al derivado de la floridosida de DP2 (M-H):

- 20 [0061] El pico m/z en 416 correspondiente al derivado DP2 de la floridosida está presente y después de la fragmentación (pérdida de una hexosa), los picos del espectro de fragmentación del pico m/z en 253 experimental aparecen. Esto revela la presencia de derivados de floridosida en DP2 (pico correspondiente a una masa de 416 Da) en las fracciones F2 y F3. Después de la fragmentación de una hexosa se encuentra el espectro de fragmentación de la floridosida/isofloridosida.

- 25 [0062] Los espectros MS/MS del pico correspondiente a la masa de 601 Da atribuida al derivado de la floridosida de DP3 (M-H):

m/z experimental	Masa observada (MW)	DP	Compuesto identificado
277,09 = M - H + Na	254	1	Floridosida/isofloridosida
439,15 = M - H + Na	416	2	Derivado de floridosida: (Hexosa) ₂ -glicerol
601,19 = M - H + Na - glicerol	578	3	Derivado de floridosida: (Hexosa) ₃ -glicerol

- 30 [0063] La fragmentación del pico en 601 revela la presencia de derivados de floridosida en DP3 en las fracciones F2 y F3.

[0064] Resumen de los análisis de espectrometría ESI:

Familia	DP	MW	F1	F2	F3
Ácido isetiónico		125,99	(+)	(+)	(+)trazas
3,6-AnGal	1	162,05	H	H	
	1	180,06	(+)/(+)	(+)/(+)	
	2	342,12	(+)	(+)	
Hexosa Gal.Man.Glc	3	504,17		(+)	

	4	666,22		(+)	
Ácido galacturónico	2	370,22	(+)		
	1	254,10	(+)	(+)	(+)(-)
	2	416,16		(+)	(+)(-)
Floridosida/isofloridosida y: derivados	3	578,21		(+)	(+)(-)
	4	740,26		(+)	

Leyenda:

negrita Especies mayoritarias de la fracción

(+) Especie observada en el modo positivo

(-) Especie observada en el modo negativo

Ejemplo 5: Efecto de las fracciones del ejemplo 4 sobre la activación de los mecanismos de defensa en las plantas después de un estrés biótico

5 [0065] Se cultivan lotes de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* variedad Marmande). Se constituye un lote de plantas de 6 semanas, homogéneo (color, número de hojas). Las fracciones obtenidas según el ejemplo 4 se preparan en forma de solución de 1, 2 y 10 mg/L en Tween a 0,05 % en volumen. Se aplican en forma de pulverización foliar hasta que chorrean sobre las plántulas de tomates en T 0, T 2J y T 5J y se utilizan 4 plántulas por experimento.

10 [0066] 100 µL de una suspensión de esporas del hongo *Botrytis cinerea* a 10^5 - 10^6 esporas / mL de Tween a 0,05 % en volumen, se depositan en T 7J sobre las hojas. Las hojas se cosechan en T 14J, se congelan en el nitrógeno líquido y luego se conservan a -20 °C hasta su análisis.

15 [0067] Éste consiste en dosificar los marcadores de la elicitación tales como el contenido de callosa, el contenido de compuestos fenólicos, la actividad enzimática de la peroxidasa y de la fenilalanina-amonio-liasas.

[0068] Los resultados representan la media de tres cosechas diferentes e independientes (cuatro plantas por modalidad y por cosecha).

20 [0069] El contenido de callosa y el contenido de compuestos fenólicos se dosifican respectivamente según Hirano, Y., Pannatier, E. G., Zimmermann, S., y Brunner, I. (2004). Induction of callose in roots of Norway spruce seedlings after short-term exposure to aluminum. *Tree Physiology* 24, 1279-1283) y Singleton V L y Rossi JA Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58, 1965.

30 [0070] La actividad enzimática de la peroxidasa se determina según el método descrito por Shindler JS, Childs RE, Bradley WG. (1976) Peroxidase from human cervical mucus, the isolation and characterisation. *Eur J Biochem.*; 65(2) 325-331.; el de la PAL según Francini, A., Nali, C., Pellegrini, E., y Lorenzini, G. (2008). Characterization and isolation of some genes of the shikimate pathway in sensitive and resistant *Centaurea jacea* plants after ozone exposure. *Environmental Pollution* 151, 272-279.

[0071] Los resultados se expresan en porcentaje del control, el Tween a 0,05 % en volumen.

35 [0072] La fracción F3 aplicada sobre las plantas de tomate a una concentración de 1 mg/L provoca un aumento del contenido de callosa del doble que el control y para una concentración de 2 mg/L, el contenido de callosa se triplica. La fracción F1 a 1 mg/L provoca un aumento del contenido de compuestos fenólicos que aumenta alrededor de 50 % en comparación con el control.

40 Tabla 9: contenido de callosa expresado en porcentaje del control

Fracciones	Concentración (mg/L)		
	1	2	10
F1	118	170	159
F2	141	114	123
F3	109	291	159

Tabla 10: contenido de compuestos fenólicos expresado en porcentaje del control

Fracciones	Concentración (mg/L)		
	1	2	10

F1	143	149	154
F2	103	65	109
F3	120	97	102

[0073] Una concentración de la fracción F1 de 1 mg/L estimula la actividad de la peroxidasa en un 70 %. Una concentración de la fracción F1 de 2 mg/L refuerza la actividad enzimática de la fenilalanina-amonioliasa en un 82 %.

5

Tabla 11: actividad enzimática de la peroxidasa expresada en porcentaje del control

Fracción	Concentración (mg/L)		
	1	2	10
F1	154	169	157
F2	136	88	168
F3	135	114	81

Tabla 12: actividad enzimática de la PAL expresada en porcentaje del control

Fracción	Concentración (mg/L)		
	1	2	10
F1	182	134	37
F2	169	116	119
F3	86	100	108

10

[0074] Los resultados obtenidos permiten afirmar que las fracciones extraídas presentan efectivamente una actividad elicitora.

15

[0075] Se demuestra que las fracciones obtenidas según el ejemplo 2 tienen una actividad elicitora porque los marcadores de elicitación son más elevados en las plantas tratadas que en las plantas de control. Además, la respuesta de la planta es diferente según la fracción aplicada. Las tres fracciones provocan un aumento de la actividad de la peroxidasa de manera variable según la concentración aplicada a las plantas.

20

[0076] La enzima peroxidasa se sintetiza cuando la planta produce FAO para limitar el estrés oxidativo. Además, la enzima fenilalanina-amonioliasa, que participa en la vía de biosíntesis de los fenilpropanoides antimicrobianos pero también en la síntesis de ligninas y por lo tanto en el refuerzo de la pared de las células, ve su actividad estimulada.

25

[0077] El refuerzo de la pared comprende también la formación de callosa y de compuestos fenólicos, el contenido de estos últimos aumentado gracias a la aplicación de las fracciones aisladas de *Gelidium*. El estímulo de estas defensas naturales puede permitir frenar el patógeno y constituye una de las primeras señales de resistencia de la planta. La planta puede defenderse mejor en presencia de los extractos y fracciones según la invención.

30

[0078] Las fracciones elicitoras dotan a la planta de una mayor resistencia activando y fortaleciendo los marcadores de elicitación.

REIVINDICACIONES

1. - Uso como elicitador/estimulador de defensa en las plantas terrestres de un extracto o de una fracción de extracto de por lo menos un alga roja agarofita, dicho extracto o dicha fracción de extracto contiene al menos un oligosacárido que tiene de 2 a 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente, y polisacáridos que tienen más de 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente pudiendo ser contenidos que no superen 0,01 % en peso respecto a los oligosacáridos/polisacáridos totales.
2. - Uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** las algas rojas agarofitas son seleccionadas entre las de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*.
3. - Uso según la reivindicación 2, **caracterizado por el hecho de que** el alga roja agarofita es *Gelidium sesquipedale*.
4. - Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por el hecho de que** el extracto o la fracción de extracto contiene, como oligosacárido(s), al menos un oligosacárido nativo o sustituido elegido entre:
 - un (Gal)*n*-glicerol con Gal = unidad de galactosa y $2 \leq n \leq 4$;
 - un disacárido constituido por dos unidades de hexosa;
 - un disacárido constituido por dos unidades de ácido galacturónico.
5. - Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** el extracto o la fracción de extracto contiene además al menos un monosacárido nativo o sustituido por glicerol o por metilo.
6. - Uso según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** el o los monosacáridos son elegidos entre floridosida/isofloridosida (Gal-glicerol), 3,6-anhidrogalactosa, ácido galacturónico, hexosas o pentosas.
7. - Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por el hecho de que** dicho extracto consiste en un extracto:
 - por una solución acuosa alcalina con pH básico, particularmente mediante sosa a 0,1-10 % en peso, preferiblemente 2-5 % en peso, seguido de una neutralización con un ácido y de una eliminación al menos parcial de polisacáridos que tienen más de 50 unidades de osa conectadas entre sí de manera covalente; o
 - por una solución hidroalcohólica, habiéndose eliminado posteriormente el alcohol; o
 - por un alcohol como el etanol, habiéndose eliminado posteriormente el alcohol,
 un extracto que también puede ser: una de las fases acuosas obtenidas por las filtraciones efectuadas en el momento del procedimiento de extracción del agar a partir de un alga roja agarofita respectivamente después del tratamiento alcalino del alga, después del aclarado con agua del residuo así obtenido, después de la neutralización con ácido del residuo obtenido en el momento de este aclarado, después del aclarado con agua del residuo obtenido en el momento de esta neutralización; o el extracto obtenido por la extracción en caliente del residuo obtenido en el mismo tiempo que el gel de agar en el momento de una extracción en caliente/filtración del residuo obtenido después de este último aclarado con agua; y el jugo de sinéresis obtenido después de la congelación-descongelación y/o por prensado mecánico de este gel de agar, y una fracción de extracto resulta del fraccionamiento de un extracto por ultrafiltración o por cromatografía de exclusión estérica, dicho extracto o dicha fracción de extracto puede entonces haberse concentrado, deshidratado o liofilizado.
8. - Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por el hecho de que** el extracto o la fracción de extracto se preparó mediante un procedimiento según el cual se realizó una extracción acuosa, alcohólica o hidroalcohólica, en caliente, de dicha o dichas algas rojas agarofitas, con eliminación ulterior del alcohol en el caso de una extracción alcohólica o hidroalcohólica, dicha extracción pudiendo ser una extracción acuosa alcalina, en particular una extracción acuosa alcalina, según la cual se obtiene, después de dicho tratamiento alcalino y por filtración, por una parte, una fase acuosa (A1) y por otra parte un residuo (R1);
 - luego se puede efectuar un aclarado con agua destilada de dicho residuo (R1) para obtener después de la filtración por una parte una fase acuosa (A2) y por otra parte un residuo (R2);
 - luego se puede efectuar una neutralización con ácido de dicho residuo (R2) para obtener, después de la filtración, por una parte una fase acuosa (A3) y por otra parte un residuo (R3);
 - luego se puede efectuar un aclarado con agua destilada de dicho residuo (R3) para obtener, después de la filtración, por una parte, una fase acuosa (A4) y, por otra parte, un residuo (R4);
 - luego se puede efectuar una extracción en caliente y una filtración de dicho residuo (R4) para obtener por una parte un residuo (R5) y, por otra parte, un gel de agar;
 - luego se puede realizar una extracción con agua caliente de dicho residuo (R5) para obtener una fase acuosa (A5);

luego se puede realizar una congelación-descongelación y/o prensado mecánico de dicho gel de agar para obtener, por una parte, un jugo de sinéresis (JS) y un gel de agar puro; dichas fases acuosas (A1) a (A5) y dicho jugo de sinéresis (JS) representan cada uno también un extracto deseado, dicho extracto pudiendo ser sometido a un tratamiento con etanol para obtener por una parte, un extracto etanólico (EE) y por otra parte un precipitado, dicho extracto etanólico siendo sometido a un fraccionamiento por ultrafiltración o por exclusión estérica que permite aislar una fracción de extracto que contiene al menos un oligosacárido que tiene de 2 a 50 unidades de osa conectadas entre sí de manera covalente, y polisacáridos que tienen más de 50 unidades de osa ligadas entre sí de manera covalente pudiendo ser contenidos que no superen 0,01 % en peso respecto a los oligosacáridos/polisacáridos totales, dicho extracto o dicha fracción de extracto puede entonces haber sido concentrado, deshidratado o liofilizado.

9. - Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por el hecho de que** el extracto o la fracción de extracto se encuentra en un medio acuoso, o se presenta en forma de polvo.

10. - Procedimiento para estimular la defensa natural en una planta terrestre, **caracterizado por el hecho de que** consiste en aplicar sobre el conjunto de la planta o sobre una parte de ésta, incluido el aparato vegetativo, el sistema radicular, los frutos, las semillas y las simientes de dicha planta, o incluso sobre el suelo o el sustrato de cultivo de la planta, una cantidad eficaz para estimular las defensas naturales, de dicha planta, del extracto o de la fracción de extracto tal y como se definen en una de las reivindicaciones 1 a 9, en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos.

11. - Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado por el hecho de que** se tratan plantas de utilidad agronómica, de grandes cultivos, incluidas las oleaginosas como el girasol o la soja, las proteaginosas como el garbanzo, los cereales como el maíz o el trigo, los árboles frutales como los perales, los manzanos, los nectarinos, las plantas hortícolas como los rosales, las plantas de pradera, y las plantas de horticultura como el tomate, el melón, la lechuga o las espinacas.

12. - Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 y 11, **caracterizado por el hecho de que** se aplica el extracto líquido o la fracción de extracto líquido sobre la planta o parte de la planta o semillas o simientes o sobre el suelo o sustrato en una concentración de oligosacáridos de 0,0001 a 100 g/L, preferiblemente de 1 a 10 mg/L.

13. - Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado por el hecho de que** se aplica el extracto o la fracción de extracto en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos en una proporción de 1 a 1000 g de oligosacáridos por hectárea.

14. - Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado por el hecho de que** se efectúa la aplicación de 1 a 20 veces, preferiblemente de 3 a 5 veces por año de cultivo.

15. - Composición para la implementación del procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizada por el hecho de que** consiste en un extracto o fracción de extracto como se define en una de las reivindicaciones 3 a 8 y 9 en dependencia de las reivindicaciones 3 a 8, en estado líquido o en forma de polvo o de gránulos y en su caso incorporado en un producto fitosanitario o fertilizante o con al menos un adyuvante elegido entre tensioactivos, dispersantes, agentes conservantes, antiaglomerantes, elementos correctores de carencias, fungicidas, insecticidas, herbicidas, hormonas de crecimiento.