

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 853**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/44** (2006.01)  
**A01G 7/06** (2006.01)  
**A01P 21/00** (2006.01)  
**C05F 11/00** (2006.01)  
**C05G 5/00** (2010.01)  
**C05F 11/10** (2006.01)  
**A01G 22/20** (2008.01)  
**A01G 22/05** (2008.01)  
**A01G 22/00** (2008.01)  
**A23B 7/154** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015** **E 19159509 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3513656**

54 Título: **Procedimiento para aumentar el contenido de aminoácido en las plantas**

30 Prioridad:

**28.02.2014 JP 2014038981**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.02.2024**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)**  
**15-1, Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**LANG, YAQIN;**  
**CHEN, YANG;**  
**KONDO, SATORU y**  
**SUZUKI, SHUNJI**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 958 853 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

Procedimiento para aumentar el contenido de aminoácido en las plantas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para proporcionar una mejora en el contenido de aminoácido esencial y/o ácido  $\gamma$ -aminobutírico en una hortaliza de fruto, un árbol frutal, o una planta de grano.

10 **Antecedentes de la técnica**

Con el fin de mejorar el crecimiento de cultivos y la calidad de frutas o frutos secos, se utilizan fertilizantes químicos, fitohormonas y similares. Sin embargo, todavía adolecen de problemas no resueltos referidos a su influencia sobre el medio ambiente y el coste. Se espera que los aminoácidos sean ingredientes medioambientalmente respetuosos y económicos de composiciones para la aplicación agrícola u hortícola. Por ejemplo, se conoce un agente estimulante de la formación de yemas florales que utiliza prolina como principio activo (documento de patente nº 1), un agente vegetal que proporciona resistencia al estrés de temperatura elevada que contiene un aminoácido de cadena ramificada, tal como valina o leucina (documento de patente nº 2), un fertilizante líquido estimulador del crecimiento vegetal que contiene 18 tipos de aminoácido (documento de patente nº 3), un agente de efecto alelopático vegetal y/o potenciador de la producción de fitoalexina que contiene un subproducto de fermentación de aminoácidos o un subproducto de fermentación de ácidos nucleicos (documento de patente nº 4), etc. Se ha informado de que la hidroponía de tabaco en una disolución acuosa que contiene ácido glutámico, ácido aspártico y fenilalanina incrementa el contenido de aminoácidos, clorofilas y carotenoides en las hojas (documento no de patente nº 1).

El fertilizante líquido estimulador del crecimiento vegetal anteriormente mencionado (documento de patente nº 3) contiene 0,05% de isoleucina y la concentración del mismo en un líquido que debe pulverizarse es de 0.019 a 0,076 mM. Además, el documento de patente nº 4 describe que un tratamiento de semillas de arroz con isoleucina 0.2 a 20 mM estimuló la producción de las momilactonas A y B.

Es conocido que el ácido jasmónico, que es un tipo de fitohormona, presenta acciones fisiológicas, incluyendo aquellas para la topogénesis (formación de flor, formación de tubérculo) y acciones de activación de la transcripción de genes que responden a tensiones tales como los daños por insectos y enfermedades ("New Science of Phytohormones"). Asimismo se ha informado de que un tratamiento de los frutos o bayas, tales como las de los tomates y las fresas, con jasmonato de metilo, estimula la aparición del fruto o la coloración (documentos no de patente nº 2 y nº 3).

Es conocido que, en la transducción de señales del ácido jasmónico, (+)-7-iso-JA-Ile consistente en ácido jasmónico e isoleucina unidos entre sí, constituye el tipo activo (documentos no de patente nº 4 a nº 6).

Respecto a la relación con la isoleucina y el ácido jasmónico, se ha informado de que la infección por *Phelipanche aegyptiaca*, que es un parásito vegetal, en *Arabidopsis thaliana* cultivada sobre un medio de agar resultó suprimida por el tratamiento de la planta con una mezcla de isoleucina y jasmonato de metilo, mientras que un tratamiento con isoleucina sola resultó ineficaz (documento no de patente nº 7). Se ha demostrado además que el tratamiento de plántulas de alubias de Lima de inmersión en una disolución de un complejo de leucina o isoleucina y ácido 1-oxoindán-4-carboxílico o ácido 1-hidroxiindán-4-carboxílico induce la síntesis de sustancias volátiles implicadas en la resistencia a insectos, y un complejo de un aminoácido y ácido jasmónico es un producto intermedio de la ruta de transducción de señales de octadecanoides (documento no de patente nº 8).

Se ha informado además de que, mediante el tratamiento de las hojas de cebada mediante inmersión en una disolución de inducción de estrés de presión osmótica (D-sorbitol, D-manitol, polietilenglicol-6000 y cloruro sódico) se incrementa el ácido jasmónico y el complejo de ácido jasmónico y un aminoácido (documento no de patente nº 9).

Asimismo existe un informe referente a las influencias de los aminoácidos de cadena ramificada y similares sobre el crecimiento y estado nutricional del tomate, así como el crecimiento, supervivencia y proliferación de *Bemisia tabaci* (documento no de patente nº 10). La concentración de isoleucina utilizada para el tratamiento descrito en dicho informe es de 0.012 a 0.035 mM.

Se ha informado además de que fertilizantes mixtos que contienen diversos aminoácidos, ingredientes traza y fitohormonas incrementan la proporción de frutos y el rendimiento de cultivo de frutos de las plantas (documento de patente nº 5). La concentración de isoleucina utilizada para el tratamiento descrito en dicho informe es de 1.1 a 4.3 nM.

Se ha informado además de que los fertilizantes de pulverización foliar que contienen diversos aminoácidos, ingredientes traza, xantina, etc. presentan un efecto de incremento de los frutos de plantas, un efecto de incremento del contenido de sacáridos y similares (documento de patente nº 6), y de que los fertilizantes de pulverización foliar que contienen ingredientes traza y diversos aminoácidos incrementan el rendimiento de cultivo de la col china

(documento de patente nº 7). Se ha informado además de que el ácido glutámico incrementa las antocianinas de la manzana (documento no de patente nº 11) y de que la fenilalanina incrementa las antocianinas de la uva (documento no de patente nº 12). Se ha informado además de que la metionina estimula la coloración de los frutos (documento de patente nº 8).

Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha informado de varios resultados referentes a efectos de la isoleucina y otros aminoácidos sobre plantas, aunque no se conoce que la aplicación de una disolución de alta concentración de isoleucina mediante rociado estimule la floración y la aparición de frutos en plantas, la coloración de frutos recolectados, y similares.

Además, se ha informado de que, al examinar las influencias de la sustitución de cada uno de los 20 tipos de aminoácido de 20% del nitrógeno de nitrato en una disolución de nutrientes sobre el crecimiento de acelgas chinas en hidroponía, la isoleucina incrementó el contenido de nitrógeno y fósforo de las partes terrestres (brotes) de la planta, aunque no resultó eficaz sobre el crecimiento (peso de masa radicular) (documento no de patente nº 13). Ana G. Pérez et al: "Biosynthesis of Strawberry Aroma Compounds through Amino Acid Metabolism", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 50, nº 14, (1-7-2002), páginas 4037-4042, XP055394334, divulga la maduración *in vitro* de fresas que comprenden pedúnculos de inmersión en una disolución que contiene 0.1 M de L-isoleucina. El suministro a la fresa de L-isoleucina dio como resultado un aumento de 7 veces en la suma de 2-metilbutanoato ésteres, y una producción doble de 2-metilbutil ésteres. El documento JP S49 91829 A divulga un procedimiento para mejorar el dulzor del fruto cítrico, que comprende pulverizar la hoja o el fruto con una disolución que contiene 0.2% (15.2 mM) de isoleucina. Wilchem: "Flower'n'Fruit Maker Brochure" (2013-05-15), páginas 1 a 4, XP055394344, divulga un fertilizante de aminoácidos, para por ejemplo la aplicación foliar, que contiene, entre otros: 0.9% de isoleucina, 5.2% de ácido glutámico y 1.6% de ácido aspártico que se aplica de manera foliar a árboles frutales a una tasa de 3 a 5 l de fertilizante diluido en 400 a 1000 l de agua por ha. Es divulgado además que la isoleucina mejora la calidad del fruto e incrementa la producción, siendo el ácido glutámico un precursor respecto a los aminoácidos mediante transaminación y el ácido aspártico es una fuente de nitrógeno. El documento KR 2013 0095524 A divulga una composición antimarchitamiento que contiene 0.69% de isoleucina que se pulveriza sobre plantas diluido 100 a 1000 veces en agua (isoleucina 0.005 a 0.053 mM). Es divulgado además que la isoleucina acelera la coloración de los frutos. El documento US 2013/303377 A1 divulga un procedimiento para influir sobre los procesos vitales de las plantas que utiliza una composición que contiene L-aminoácidos individuales seleccionados de entre glutamina, asparagina, histidina y combinaciones las mismas con glutamina, asparagina, histidina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico, en el que dicha influencia se refiere a, entre otros, aumentar el número de frutos, mejorar la coloración del fruto, aumentar el rendimiento de un fruto coloreado en una primera recolección.

#### Referencias de la técnica anterior

##### Documentos de patente

- Documento de patente nº 1: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2003-48803.
- Documento de patente nº 2: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2012-197249.
- Documento de patente nº 3: patente surcoreana abierta al público nº 2013-107406.
- Documento de patente nº 4: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2012-10694.
- Documento de patente nº 5: patente china abierta al público nº 102627498.
- Documento de patente nº 6: patente china abierta al público nº 102285823.
- Documento de patente nº 7: patente china nº 101891520.
- Documento de patente nº 8: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2007-259714.

##### Documentos no de patente

- Documento no de patente nº 1: Wu, X-P. et al., Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(3):357-361
- Documento no de patente nº 2: Liu, L., Journal of Experimental Botany, 2012, 63(16):5751-5761
- Documento no de patente nº 3: Concha, C.M. et al., Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 70:433-444
- Documento no de patente nº 4: Fonseca, S. et al., Plant Biology, 2009, 12:539-547
- Documento no de patente nº 5: Fonseca, S. et al., Nature Chemical Biogogy, 2009, 5:344:350
- Documento no de patente nº 6: Wasternack, C., Annals of Botany, 2013, 111:1021-1058
- Documento no de patente nº 7: Nun, N.B. et al., Phytoparasitica, 2009, 37 (5) : 485-488
- Documento no de patente nº 8: Krumm, T. et al., FEBS Letters, 1995, 377 (3) : 523-529
- Documento no de patente nº 9: Kramell, R. et al., Journal of Plant Growth Regulation, 1995, 14(1):29-36
- Documento no de patente nº 10: Pang, S-T. et al., Chinese Journal of Eco-Agriculture, Apr. 2013, 21(4):465-473
- Documento no de patente nº 11: Wang, L.J., Journal of Fruit Science, 2006, 23(2):157-160
- Documento no de patente nº 12: Qu, J.G. et al., Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2006, 22(2):299-305
- Documento no de patente nº 13: Wang, H-J. et al., Pedosphere, 2007, 17(5):595-600

### Divulgación de la invención

Objetivo que debe conseguir la invención

5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para proporcionar una mejora en el contenido de aminoácido esencial y/o ácido  $\gamma$ -aminobutírico en una hortaliza de fruto, un árbol frutal, o una planta de grano, en el que el aminoácido esencial incluye por lo menos uno de triptófano, lisina, treonina, valina, leucina e histidina.

10 Medios para conseguir el objetivo

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de conseguir el objetivo anteriormente indicado, y se llevó a cabo la presente invención.

15 Se consigue el objetivo rociando una disolución que comprende 1.0 a 75 mM de isoleucina sobre una hortaliza de fruto, un árbol frutal, o una planta de grano.

### Breve descripción de los dibujos

20 Las figuras 1 a 22 a continuación no muestran el efecto reivindicado actualmente.

Las figuras 1 a 10, 12 a 14 y 16 a 19 representan unos procedimientos adicionales fuera del alcance de la presente invención (ver ejemplos).

25 La figura 1 incluye fotografías que representan la floración y apariencia de los frutos en plantas tomateras pulverizadas con isoleucina (fotografías que muestran morfologías de las plantas). Las flechas señalan los frutos.

30 La figura 2 representa el cambio en el número de frutos coloreados de tomate 'cherry' (Micro-Tom). El eje vertical indica el número de frutos coloreados por planta.

La figura 3 representa el cambio en el número de tomates cherry aparecidos (Micro-Tom). El eje vertical indica el número medio de frutos por planta.

35 La figura 4 es un diagrama que representa el número de días requerido para la primera aparición de frutos en plantas de tomate (Momotaro) pulverizadas con diversos compuestos.

40 La figura 5 representa la coloración de tomate (Momotaro) pulverizado con diversos compuestos. La figura 5a representa el número de frutos coloreados, en la que el eje vertical indica el número de frutos coloreados por cada cuatro masas radiculares, y la figura 5b incluye fotografías de frutos producidos a partir de floración del mismo día (aparición de los frutos).

45 La figura 6 representa el número de frutos recolectados de plantas del tomate (Momotaro) pulverizadas con diversos compuestos. El eje vertical indica el número de frutos por cada cuatro masas radiculares.

La figura 7 representa el cambio en el número de frutos coloreados de plantas de tomate cherry (Suncherry Pure) pulverizadas con isoleucina o prolina. El eje vertical indica el número de frutos coloreados por planta.

50 La figura 8 representa el cambio en el número de plantas de tomate cherry aparecidas (Suncherry Pure) que han sido pulverizadas con isoleucina o prolina. El eje vertical indica el número de frutos por planta.

55 La figura 9 representa una comparación de las capacidades antioxidantes de plantas de tomate cherry (Suncherry Pure) pulverizadas con isoleucina o prolina. El eje horizontal indica la cantidad de antioxidante con una capacidad de eliminar radicales libres equivalente a la de catequina en 100 g de muestra (peso fresco).

La figura 10 incluye fotografías que representan un daño por insolación de plantas de tomate cherry (Suncherry Pure) pulverizadas con prolina (morfologías de plantas).

60 La figura 11 incluye fotografías (aparición de frutos) que representan una coloración de frutos de tomate (Suncherry Pure) pulverizados con isoleucina y un gráfico que muestra resultados del análisis de carotenoides de los mismos. El eje vertical del gráfico indica el contenido relativo de carotenoides.

65 La figura 12 incluye gráficos que representan la expresión de los genes *LOX* y *JAR1* que participan en la síntesis del ácido jasmónico observada en tomates cherry (Suncherry Pure) pulverizados con isoleucina. El eje vertical indica la cantidad de expresión relativa.

La figura 13 incluye gráficos que representan la expresión de los genes de respuesta de ácido jasmónico *PI* y *MYC2* observados en tomates cherry (Suncherry Pure) pulverizados con isoleucina. Los ejes verticales indican la cantidad de expresión relativa.

5 La figura 14 representa la expresión de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides observada en tomates cherry (Suncherry Pure) pulverizados con isoleucina. Los ejes verticales indican la cantidad de expresión relativa.

10 La figura 15 incluye gráficos que representan la expresión de los genes *LOX*, *JAR1*, *PI* y *MYC2* observados en tomates cherry (Suncherry Pure) pulverizados con isoleucina a diversas concentraciones. Los ejes verticales indican la cantidad de expresión relativa.

15 La figura 16 incluye gráficos que representan la expresión de los genes *LOX*, *JAR1*, *PI* y *MYC2* observados en tomate cherry (Caddy) pulverizados con isoleucina a diversas concentraciones. Los ejes verticales indican la cantidad de expresión relativa.

La figura 17 incluye gráficos que representan la expresión de los genes *LOX* y *Psy* observados en pimiento (Anaheim) pulverizados con isoleucina. Los ejes verticales indican la cantidad de expresión relativa.

20 La figura 18 representa el número de racimos recolectados de frutos coloreados de tomate de tamaño intermedio (Tsukutshuku-shi) pulverizados con isoleucina.

25 La figura 19 representa la expresión del gen *LOX* observado en pimiento (pimiento morrón, Frupryd EX) pulverizado con líquido de producción secundaria de fermentación de isoleucina. El eje vertical indica la cantidad de expresión relativa.

La figura 20 representa el contenido de antocianina de callos de uva tratados con isoleucina. El eje vertical indica la cantidad de antocianina ( $\mu\text{moles/g}$  de peso seco de callos).

30 La figura 21 representa el contenido de antocianina de frutos de uva pulverizados con isoleucina.

La figura 22 representa el contenido de antocianina de frutos de manzana pulverizados con isoleucina.

### 35 Formas de realización para poner en práctica la invención

A continuación en la presente memoria se explica la presente invención en detalle.

40 La composición utilizada en el procedimiento de la presente invención es una disolución que comprende 1.0 a 75 mM de isoleucina a modo de un principio activo. La isoleucina es preferentemente L-isoleucina. Los aminoácidos a los que se hace referencia a continuación en la presente descripción son L-aminoácidos, a menos que se indique lo contrario. La isoleucina puede ser isoleucina purificada o isoleucina de purificación gruesa, o la isoleucina puede ser un subproducto de cultivo (líquido de fermentación) o fermentación que contiene isoleucina, o un producto de fraccionamiento que contiene isoleucina de cualquiera de ellos.

45 La composición utilizada en el procedimiento de la presente invención puede contener un ingrediente arbitrario además de isoleucina, con la condición de que el efecto de la presente invención no se degrade. Entre los ejemplos de dicho ingrediente se incluyen portador, ajustador del pH, componente fertilizante para potenciar el efecto fertilizante, tal como minerales, ingrediente agroquímico, ligante y relleno. A modo de estos ingredientes, pueden utilizarse ingredientes utilizados habitualmente para productos químicos agrícolas, fertilizantes, con la condición de que no se degrade el efecto de la presente invención.

50 La composición puede contener además un aminoácido diferente de la isoleucina.

55 Cuando la composición utilizada en el procedimiento de la presente invención se rocía sobre una planta, es rociada preferentemente sobre una superficie de hoja y/o fruto tal como se indica a continuación. Puede añadirse un agente dispersante con el fin de potenciar la potencia dispersiva de la composición sobre una superficie de hoja o fruto, y puede añadirse dicho ingrediente a modo de tensioactivo con el fin de potenciar la permeabilidad de la isoleucina en la planta. Entre los ejemplos del agente dispersivo se incluyen, por ejemplo, Applauch BI<sup>TM</sup> (Kao), Mix Power<sup>TM</sup> (Syngenta Japan), Squash<sup>TM</sup> (MARUWA Biochemical). Como tensioactivo, puede utilizarse cualquiera de los tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos y tensioactivos anfólicos. Entre los ejemplos se incluyen alquil éteres de polioxietileno, alquil aril éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno de ácido graso, ésteres de sorbitano de ácido graso, ésteres de polioxietilén sorbitano de ácido graso, polímeros de oxietileno, polímeros de oxipropileno, ésteres de polioxietilén ácido alquilfosfórico, sales de ácido graso, sales de éster de ácido alquilsulfónico, sales de ácido alquilsulfónico, sales de ácido alquilarilsulfónico, sales de ácido alquilsulfónico, sales de éster de ácido alquilsulfónico, ésteres de polioxietilén ácido alquilsulfónico, sales de amonio

cuaternario, oxialquilaminas, lecitina y saponina. Además, puede utilizarse como un agente auxiliar según se requiera, gelatina, caseína, almidón, agar, alcohol polivinílico y alginato sódico.

5 En el momento de utilización de la composición, la composición en forma de sólido o polvos puede disolverse en un disolvente, tal como agua y alcohol. La composición en forma de líquido puede diluirse con un disolvente, tal como agua y alcohol en el momento de utilización de la misma. Entre los ejemplos del alcohol se incluyen etanol, metanol y alcohol isopropílico.

10 La composición utilizada en el procedimiento de la presente invención puede prepararse a partir de un producto en venta que puede estar en forma de sólido o disolución. Sin embargo, cuando es una disolución, la concentración de isoleucina es de 1.0 mM respecto a la concentración saturada. La solubilidad de la isoleucina en agua es de aproximadamente 0.3 M (40.2 g/l (20°C), 41.2 g/l (50°C)).

15 La concentración de isoleucina en el momento de la aplicación de la composición es de 1 a 75 mM, preferentemente de 1.0 a 50.0 mM, más preferentemente de 1.0 a 20.0 mM, más preferentemente de 5.0 a 10.0 mM. Aunque el contenido de isoleucina de la composición no se encuentra particularmente limitado, 1% en peso o superior, preferentemente de 50% o superior, más preferentemente de 70% o superior, en términos de peso seco (sin disolvente), y un contenido de isoleucina en la disolución de utilización dentro del intervalo ejemplificado anteriormente son seleccionados en vista de evitar daños por impurezas, tales como los daños por sales, y la alteración del efecto de la isoleucina.

20 La composición utilizada en la presente invención presenta una acción de mejora del contenido de aminoácidos esenciales y/o de ácido  $\gamma$ -aminobutírico, en el que el aminoácido esencial es por lo menos uno de triptófano, lisina, treonina, valina, leucina e histidina. Por lo tanto, la composición puede ser utilizada para la mejora en el contenido de aminoácidos esenciales y/o de ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y puede, en consecuencia, mejorar el rendimiento de cultivo de una planta y/o la calidad de los cultivos en un periodo de tiempo corto.

25 El objetivo de la aplicación de la composición utilizada en el procedimiento de la presente invención no se encuentra particularmente limitado en tanto cualquiera de las acciones mencionadas anteriormente se exponga para el objetivo con isoleucina, e incluye una hortaliza de fruto (hortalizas, cuyos frutos son utilizados como alimentos), árboles frutales, y plantas de grano antes de la floración. Por supuesto, el objetivo puede ser una hortaliza de fruto, un árbol frutal, o una planta de grano tras la floración, pero resulta preferido habitualmente un objetivo como el que se describe anteriormente antes de la floración.

30 Los ejemplos de una hortaliza de fruto incluyen tomate (incluyendo el tomate cherry), oca, berenjena, pimiento, pepino, melón, pepino amargo, calabaza japonesa, melón oriental, chayote, sandía, fresa, soja, judía adzuki, haba, guisante, cacahuate, caupí, altramuza, trébol y alfalfa.

35 Los ejemplos de un árbol frutal incluyen árboles frutales tales como membrillo chino, pera blanca china, peral, membrillo, níspero común, baya de junio, shipova, manzano, cerezo americano, albaricoquero, ciruelo, cerezo, guindo, endrino, ciruelo japonés, melocotonero, almendro, ginkgo, castaño, nogal, pacana, akebi, higuera, caqui japonés, zarza, kiwi, oleastro, morera, arándano rojo, arándano rojo de montaña, granada, vid de tara, espino cerval de mar, grosellero, azufaifo, cerezo de arbusto japonés, arándano, grosellero rojo, uva, zarzamora, arándano azul, papayo, *Schisandra nigra*, frambueso, cerezo veloso ("downy cherry"), los del género *Citrus*, *Fortunella* o *Poncirus*, olivo, níspero y arrayán.

Una planta de grano es una planta, cuyas semillas son utilizadas como alimentos, y los ejemplos de la misma incluyen trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, mijo, avena, centeno, triticale y trigo sarraceno.

40 Las variedades de la hortaliza de fruto no se encuentran particularmente limitadas y entre los ejemplos del tomate (incluyendo el tomate cherry) se incluyen, por ejemplo, Momotaro, Roma, Oju, First Tomato, Akairomarutama, Yellow Carol, Paruche, Mini Carol, Micro-Tom y Suncherry Pure.

45 Entre los ejemplos de pimiento se incluyen Anaheim, pimiento morrón, pimiento verde, guindilla (Takano tsume), pimiento verde Manganji, pimentón, habanero, jolokir y jalapeño.

Las variedades del árbol frutal no se encuentran particularmente limitadas, y los ejemplos para uva incluyen, por ejemplo, cabernet Sauvignon, chardonnay, tempranillo, pinot noir, muscat, koshu, kaiji, kyoho, y pione.

50 Entre los ejemplos de manzana se incluyen Tsugaru, Fuji, Golden Delicious, Kougyku, Kokko, Mutsu, Ohrin, y Johnna Gold.

55 Las plantas preferidas a las que se aplica la presente invención son plantas frutales, que incluyen hortalizas de fruto y árboles frutales. Particularmente preferidas son las plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae*, *Vitaceae* o *Rosaceae*, y resultan especialmente preferidos el tomate, el pimiento, la uva y la manzana.

La disolución que contiene 1.0 a 75 mM de isoleucina puede prepararse disolviendo la composición en un disolvente, y diluir la disolución resultante como se requiera.

5 Como cuerpo de planta al que la composición utilizada en el procedimiento de la presente invención es rociada, se prefiere una hoja o el fruto. Resulta particularmente preferida la aplicación foliar. La aplicación foliar se refiere a que la composición puede rociarse a por lo menos una superficie de hoja, y la composición puede ser rociada a otras partes además de a una superficie de hoja. Lo mismo se aplicará al fruto.

10 La composición puede ser rociada sobre un fruto recolectado.

Además de la mejora en el contenido de aminoácido esencial y/o de ácido  $\gamma$ -aminobutírico rociando la composición sobre un fruto, puede fomentarse la maduración después de la recolección. El fomento de la maduración después de la recolección incluye el fomento de la coloración, el incremento del contenido de licopeno, el incremento del contenido de azúcares y el incremento del contenido de aminoácidos, tal como el contenido de ácido glutámico.

15 Los aminoácidos, cuyo contenido es mejorado según la invención, incluyen los aminoácidos esenciales triptófano, lisina, treonina, valina, leucina, e histidina.

20 Aunque la cantidad de la composición que debe rociarse no se encuentra limitada particularmente, es habitualmente de 6.5 a 3000 g/ha, preferentemente de 6.5 a 2000 g/ha, más preferentemente de 13 a 800 g/ha, todavía más preferentemente de 65 a 400 g/ha, desde el punto de vista de la cantidad de isoleucina.

25 Cuando la composición se aplica en el fruto recolectado, la cantidad habitualmente es de 0.002 a 0.3 g/g (fruto), preferentemente de 0.002 a 0.2 g/g (fruto), más preferentemente de 0.004 a 0.08 g/g (fruto), todavía más preferentemente 0.02 a 0.04 g/g (fruto), en términos de cantidad de isoleucina.

30 El tiempo de aplicación de la composición a una planta puede ser determinado de manera adecuada dependiendo del efecto esperado. El número de veces de aplicación no se encuentra limitado particularmente, y puede ser aplicada una vez, o dos o más veces.

35 Aunque el procedimiento de rociado para rociar la composición no se encuentra limitado particularmente, es deseable pulverizar la composición de manera que la composición se extienda sobre la parte terrestre completa de la planta, que incluye el follaje y los frutos, preferentemente superficies de hoja y/o frutos. Cuando la composición se rocía manualmente, es rociada preferentemente con una boquilla de pulverización para la composición que apunta a la superficie de hoja sobre el lado inferior de la hoja. Cuando se utiliza un pulverizador de barra ("boom sprayer"), el volumen de la disolución que debe ser rociada es de manera deseable 100 l o superior, preferentemente 200 a 3000 l, más preferentemente 300 a 2000 l, por 1 ha. Puede utilizarse asimismo el pulverizador electrostático así denominado o la boquilla de pulverización electrostática que promueve la adhesión de la disolución rociada a los cuerpos de planta que utiliza electricidad estática.

40 Cuando la composición utilizada en el procedimiento de la presente invención es rociada sobre las superficies de hoja y/o frutos, la composición puede mezclarse con un fertilizante para la aplicación foliar utilizado habitualmente en agricultura.

45 Cuando se cultiva una planta, las cantidades y los procedimientos de aplicación de fertilizante basal y fertilizante adicional que se deben aplicar al suelo pueden ser similares a los utilizados en esta parte de la zona según el tipo de planta que debe cultivarse. Cuando se cultiva una planta, la densidad de cultivo puede ser una densidad recomendada en esa parte de la zona según el tipo de planta que debe cultivarse. Sin embargo, cuando la composición es rociada sobre las superficies de hoja y/o frutos, el surco (el espacio interhilera) es preferentemente de 20 cm o más ancho de manera que los materiales rociados puedan alcanzar asimismo fácilmente las hojas inferiores.

### Ejemplos

55 A continuación en la presente memoria, la presente invención se explica con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos.

#### **Ejemplo 1 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre el tomate cherry (Micro-Tom).**

60 Se sembraron tres semillas de tomate cherry (Micro-Tom) en compost contenido en una maceta (diámetro superior de 10.5 cm x altura de 8.8 cm) y se cultivaron en un Biotrón a una temperatura de 23°C bajo un periodo de luz de 14 horas (6:00 a 20:00) y un periodo de oscuridad de 10 horas (20:00 a 6:00). Como compost, se utilizó una mezcla de Kumiai Nippi Engei Baido n° 1 (Nihon Hiryo) y vermiculita en una proporción de 3:1 (proporción en volumen).

65 Después de 3 semanas, se dejó una masa radicular y las otras se redujeron. Entre un mes después de la siembra y la recolección, se aplicó adicionalmente una disolución diluida 300 veces de fertilizante líquido Hyponex

(N:P:K=6:10:5, Hyponex Japan) como fertilizante del suelo, mediante irrigación a una frecuencia de una vez a la semana en un volumen de 100 ml por cada masa radicular (maceta).

5 Después de crecer uniformemente las plantas de cinco masas radiculares y empezar a aparecer las yemas florales, se pulverizó agua (Con) o disolución acuosa de L-isoleucina 10 mM sobre las plantas completas una vez a la semana. El volumen pulverizado fue de 5 ml por cada masa radicular.

10 A continuación, se investigó, para cada masa radicular, la floración, la aparición de fruto, la coloración (cambio de color) del fruto y el número de frutos aparecidos.

10 i) Floración y aparición de fruto

15 Los estados de floración y aparición de fruto en las plantas se muestran en la figura 1. La floración y la aparición de fruto de las plantas de tomate pulverizadas con Ile se produjo antes y el número de flores y frutos en la misma asimismo fue superior en comparación con las plantas de Con.

20 ii) Coloración de los frutos

20 La investigación del número de frutos que cambiaban de color a naranja o rojo se llevó a cabo cada cinco días después de la aparición de frutos en las plantas de tomate y se muestran los resultados en la figura 2. La coloración de los frutos de las plantas de tomate pulverizadas con Ile se inició antes y el número de frutos en el mismo punto temporal era más elevado que en los observados para Con. Estos resultados demuestran que la pulverización de Ile presenta un efecto de estimulación de la coloración de los frutos de tomate y pudo fomentarse el crecimiento de las plantas de tomate.

25 iii) Número de frutos producidos

30 Los resultados de la investigación del cambio con el tiempo del número de frutos aparecidos en plantas de tomate se muestran en la figura 3. El día 82º después de la siembra, se recolectaron los frutos de tomate. El número de frutos recolectados de las plantas de tomate pulverizadas con Ile fue superior en 20% al de "Con". Se considera que este resultado se debe al incremento de la proporción entre el número de flores y el número de frutos inducido por la pulverización con Ile; asimismo mejoró el rendimiento de cultivo del tomate.

35 **Ejemplo 2 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre el tomate (Momotaro).**

40 Se sembraron tres semillas de tomate (Momotaro Fight) en compost contenido en una maceta y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1, con la condición de que el cultivo se lleve a cabo en un invernadero (temperatura diurna de 25°C (6:00 a 20:00) y temperatura nocturna de 15°C (20:00 a 6:00)). El compost y la aplicación de fertilizante fueron los mismos o se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

45 Después de 3 semanas, quedaba una masa radicular y las demás se redujeron. Al aparecer un racimo de flores del primer nivel, se fijó un soporte y tras aparecer un racimo del segundo nivel, se llevó a cabo el pinzado (pinzado de la yema terminal).

50 Tras crecer uniformemente las plantas de cuatro masas radiculares y empezar a aparecer yemas florales, se pulverizaron las plantas completas cada dos semanas con agua (Con.), disolución acuosa de L-isoleucina 10 mM (Ile), disolución acuosa de glutamato monosódico 10 mM (GluNa), disolución acuosa de urea 5 mM (Urea) o disolución acuosa de fenilalanina (Phe). Se ajustó el volumen pulverizado según el crecimiento de las plantas, siendo de 15 a 30 ml por cada masa radicular. La concentración de urea era de 5 mM, por lo que la cantidad de nitrógeno proporcionada por la urea era la misma que la proporcionada por cada uno de los aminoácidos.

55 A continuación, el día de primera fructificación, se investigó la coloración de los frutos y el número de frutos producidos para cada masa radicular.

60 i) Día de primera aparición de fruto

60 Los días de primera aparición de fruto (días en los que cada planta daba fruto por primera vez) de las tomatas pulverizadas con cada disolución se muestran en la figura 4. Se observó la aparición de fruto en las tomatas pulverizadas con Ile, GluNa, urea, agua y Phe en el orden indicado. Mientras que la tomatas pulverizada con agua fructificó por primera vez el día 69º después de la siembra, la tomatas pulverizada con Ile fructificó por primera vez el día 55º después de la siembra. Las tomatas pulverizadas con GluNa y las tomatas pulverizadas con urea fructificaron por primera vez el día 56º y el día 63º después de la siembra, respectivamente; es decir, antes que las tomatas pulverizadas con agua (Con.). Además, la fructificación de la tomatas pulverizada con Phe fue la más tardía y se observó el día 83º después de la siembra. Tal como se ha indicado anteriormente, la pulverización con Ile fue la que más aceleró la fructificación de la tomatas.

ii) Coloración de los frutos

Los números de frutos que cambiaban de color a naranja o rojo el día 107º después de la siembra de las tomatas se muestran en la figura 5a. Los números fueron de 4 para la tomatas pulverizada con Ile, 1 para las pulverizadas con urea y GluNa y de 0 para las pulverizadas con agua (Con.) y Phe, y de esta manera, la tomatas pulverizada con Ile mostró el número más elevado de frutos coloreados. Además, el color de los frutos obtenido de flores que aparecieron el mismo día en comparación con tomatas pulverizadas con agua (Con.) e Ile. Como resultado, el fruto de la tomatas pulverizada con agua era verde, pero el fruto de la tomatas pulverizada con Ile ya había cambiado a rojo, es decir, cambió de color antes (figura 5b). Tal como se ha indicado anteriormente, el efecto de estimulación de la coloración del fruto del Ile asimismo se observó para el tomate Momotaro.

iii) Número de frutos

Tras el cultivo durante 3 meses después de la siembra, se recolectaron los frutos de tomate. Se muestra el número de los mismos en la figura 6. El número de frutos recolectados era de 8 para la tomatas pulverizada con agua (Con.), de 16 para la pulverizada con Ile, de 8 para la pulverizada con Phe, de 10 para la pulverizada con urea y de 14 para la pulverizada con GluNa. Tal como se ha indicado anteriormente, el efecto de incremento de la aparición de tomates de la pulverización de Ile asimismo se observó para el tomate Momotaro y asimismo mejoró el rendimiento de cultivo.

**Ejemplo 3: efecto de la isoleucina sobre el tomate cherry (Suncherry Pure).**

Se sembraron tres semillas de tomate cherry (Suncherry Pure, Tokita Seed) en compost contenido en una maceta y se cultivaron de la misma manera que la indicada en el ejemplo 1, con la condición de que el cultivo se llevase a cabo en un invernadero, tal como en el ejemplo 2. El compost y la aplicación de fertilizante fueron los mismos o se llevaron a cabo de la misma manera que la indicada en el ejemplo 1.

Un mes después de la siembra, cada plántula se plantó permanentemente en una maceta de 9.0 cm de longitud (diámetro superior de 9 cm, altura de 20 cm, diámetro inferior de 6.4 cm) y se cultivó hasta la recolección. Respecto a la aplicación de fertilizante, se aplicó adicionalmente una disolución diluida 200 veces de Vegetable Life A (Otsuka Chemical) como fertilizante mediante irrigación en un volumen de 100 ml por cada masa radicular (maceta) cada dos días desde un mes después de la siembra hasta la recolección.

Después de crecer uniformemente las plantas de cuatro masas radiculares y empezar a aparecer las yemas florales, se pulverizó agua (Con) o disolución acuosa de L-isoleucina 10 mM (Ile) o disolución acuosa de prolina 10 mM (Pro) sobre las plantas completas una vez a la semana. El volumen pulverizado se modificó según el crecimiento de las plantas, siendo de 15 a 30 ml por cada masa radicular.

A continuación, se investigó, para cada masa radicular, la coloración de los frutos, el número de frutos, el contenido de aminoácidos del zumo de los frutos, el contenido de azúcares y acidez del zumo de los frutos y la capacidad antioxidante del zumo de los frutos.

i) Coloración de los frutos

El número de frutos que había cambiado de color se muestra en la figura 7. El número de frutos que había cambiado de color fue, en orden de mayor a menor: tomatas pulverizadas con Ile, con Pro y con agua (Con.). El efecto de estimulación de la coloración de los frutos del tomate de la pulverización con Ile asimismo se confirmó en el presente ejemplo.

ii) Número de frutos

Los resultados de la investigación sobre el número de frutos de las tomatas llevada a cabo con el tiempo se muestran en la figura 8. En un estadio temprano, el número de frutos producidos fue más elevado, en orden decreciente, en plantas pulverizadas con Pro, con Ile, y con agua, aunque el número de frutos producidos de las tomatas pulverizadas con Ile se incrementó en la parte intermedia del cultivo y superó el número de frutos producidos por la tomatas pulverizada con Pro. Respecto al rendimiento de cultivo final, el número de frutos producidos por tomatas pulverizadas con Ile y Pro fue superior en 16% y 9%, respectivamente, al de tomatas pulverizadas con agua (Con.).

iii) Análisis de aminoácidos de frutos

Se obtuvieron frutos maduros de cada una de las plantas de tomate cherry pulverizadas con agua, Ile o Pro y se analizó el contenido de aminoácidos de cada uno. Se obtuvieron dos piezas de fruta del racimo de flores de segundo nivel de una masa radicular, es decir, un total de 8 piezas de fruta de cada grupo de ensayo. Se obtuvo el zumo de los frutos exprimiendo cada pieza de fruta y el zumo de los frutos se diluyó 10 veces con HCl 0.02 N y se sometió a filtración con un filtro. Se midió el contenido de aminoácidos del filtrado obtenido. La medición de los

aminoácidos se llevó a cabo con un analizador de aminoácidos de alta velocidad L-8800 (Hitachi) siguiendo el manual de este instrumento. Se calcularon las cantidades de los aminoácidos ( $\mu\text{moles/ml}$ ) en cada zumo de frutos y se utilizaron las medias para ocho piezas de fruta como las cantidades de aminoácidos del grupo de ensayo correspondiente.

5 Los resultados se muestran en la tabla 1. En los frutos de las tomateras pulverizadas con Ile, las cantidades de ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), ácido aspártico (Asp), prolina (Pro) y metionina (Met) se redujeron, mientras que las cantidades de alanina (Ala), ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ -ABA), isoleucina (Ile), leucina (Leu), valina (Val), serina (Ser), glicina (Gly), treonina (Thr), lisina (Lys), histidina (His), cisteína (Cys), arginina (Arg), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) se incrementaron en comparación "Con". Mediante la pulverización con Ile, se incrementaron muchos tipos de aminoácido esencial, incluyendo aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos aromáticos.

15 Los aminoácidos de cadena ramificada y los aminoácidos aromáticos sirven de materiales de partida de la síntesis de muchos metabolitos secundarios vegetales, tales como fenilpropanoides, flavonoides y alcaloides. El aminoácido funcional,  $\gamma$ -ABA, asimismo se incrementó. Estos resultados sugieren que el metabolismo secundario de los frutos resultó activado por la pulverización con Ile. Puede esperarse que el valor nutricional del tomate se incremente mediante el incremento de los aminoácidos esenciales y el aminoácido funcional,  $\gamma$ -ABA.

20 Tabla 1: análisis de los aminoácidos de los frutos de tomate obtenidos con la pulverización con Ile o Pro ( $\mu\text{moles/ml}$ )

	Total	Glu	Asp	Gln	Asn	Pro	Met	Phe	Ala
Con.	20.56	7.21	1.62	1.59	0.61	0.35	0.13	0.5	3.42
Ile	20.25	6.46	1.33	1.1	0.55	0.33	0.09	0.5	4.51
Pro	21.13	7.76	1.75	1.57	0.63	0.39	0.14	0.38	3.79

	$\gamma$ -ABA	Ile	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	His	Cys	Arg	Tyr	Trp
Con.	5.48	0.17	0.32	0.17	0.59	0.25	0.28	0.29	0.17	0.15	0.11	0.045	0.034
Ile	6.42	0.23	0.39	0.21	0.67	0.35	0.3	0.33	0.19	0.21	0.14	0.082	0.06
Pro	4.46	0.15	0.29	0.18	0.61	0.24	0.27	0.27	0.17	0.08	0.13	0.185	0.072

iv) Análisis del contenido de azúcares y de la acidez

25 Se obtuvieron frutos de tomate maduros de plantas de tomate cherry de cada grupo experimental de la manera indicada en iii), anteriormente, y se obtuvo el zumo de los frutos mediante exprimido de cada fruto. Se analizó el contenido de glucosa, el contenido de fructosa y la acidez de cada zumo de frutos. El análisis de glucosa y fructosa se llevó a cabo para una disolución diluida 20 veces de zumo de frutos mediante la utilización de un kit de reactivos de análisis alimentario: F-Kit (kit sacarosa (sucrosa)/D-glucosa/D-fructosa (Roche)) y espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter) siguiendo los manuales del kit y del instrumento. Se llevó a cabo el análisis de la acidez mediante la utilización de un medidor de acidez de bolsillo (PAL-AC1, ATAGO).

35 Los resultados se muestran en la tabla 2. El contenido de glucosa y el contenido de fructosa de los frutos de las tomateras pulverizadas con Ile eran prácticamente iguales a los de "Con". Los frutos de las tomateras pulverizadas con Pro mostraron el contenido de glucosa y el contenido de fructosa más bajos.

Respecto a la acidez, los frutos de las tomateras pulverizadas con Pro mostraron una acidez ligeramente incrementada.

40 Tabla 2: contenido de glucosa, contenido de fructosa y acidez de los frutos del tomate

Tratamiento	Glucosa (g/l)	Fructosa (g/l)	Acidez (%)
Con.	13.4	13.3	0.46
Ile	13.3	13.3	0.46
Pro	12.3	12.2	0.47

v) Capacidad antioxidante

45 Se extrajeron los polifenoles del fruto del tomate y se investigaron las capacidades antioxidantes del mismo.

50 Se obtuvieron frutos del tomate maduros a partir de plantas de tomate cherry de cada grupo experimental de la manera indicada en iii), tal como se ha indicado anteriormente. Los frutos se congelaron en nitrógeno líquido y después se molieron y se introdujeron 0.5 g de los polvos en un tubo de 2 ml y se extrajeron dos veces con 1.0 ml de metanol al 70%. El líquido del extracto se evaporó por completo mediante la utilización de un evaporador centrífugo y el residuo se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de metano al 70% a fin de preparar una muestra. Se midió la capacidad

antioxidante de la muestra como capacidad de eliminación de radicales libres de la misma mediante la utilización del procedimiento del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), en referencia a Lamien-Meda A. et al., *Molecules* 13(3):581-594, 2008. A 50 µl de la muestra se añadieron 700 µl de metanol y 750 µl de DPPH 0.02 mg/ml (ALFA AESAR) y se mezclaron suficientemente. A continuación, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la absorbancia de la misma a 517 nm. Se preparó una curva de calibración mediante la utilización de soluciones 0, 0.2, 1, 2 y 4 µg/ml de catequina en lugar de la muestra. La capacidad medida de eliminación de radicales libres se convirtió en cantidad (mg) de catequinas con una capacidad de eliminación de radicales libres equivalente a la de 100 g (peso fresco) de muestra. Los resultados se muestran en la figura 9. Como resultado, se encontró que los frutos de las tomateras pulverizadas con lle mostraban una capacidad antioxidante más elevada que los frutos de las tomateras pulverizadas con agua (Con.) o con Pro.

vi) Otros

Mientras que se observaron manchas negras de daño por insolación en las hojas de las tomateras pulverizadas con Pro, no se observó daño por insolación en las tomateras pulverizadas con lle (figura 10).

A partir de los resultados indicados anteriormente, se encontró que la pulverización con lle puede mejorar el rendimiento de cultivo y la calidad del tomate en un corto periodo de tiempo.

**Ejemplo 4 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre la coloración y síntesis de carotenoides del tomate**

Se pulverizó una disolución acuosa de isoleucina 10 mM (lle) sobre piezas de fruta inmadura de sustancialmente el mismo tamaño, obtenidas de racimos de flores del mismo nivel de tomateras cultivadas de la manera indicada en el ejemplo 3 y se investigó la coloración de los frutos.

Los frutos se introdujeron en dos vasos de vidrio de 100 ml, seis en cada uno. Se pulverizó 1 ml de agua (Con.) sobre los frutos en un vaso y se pulverizó 1 ml de una disolución de lle sobre los frutos en el otro vaso. A continuación, se cerraron los vasos con envoltorio plástico y se dejaron durante 5 horas y después se retiró el envoltorio y se dejaron los frutos en reposo. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente y la pulverización con agua y disolución de lle se llevó a cabo dos veces en total en un intervalo de una semana.

La apariencia de tres piezas de fruta de entre las seis de cada grupo se registró al inicio del ensayo, y 27, 32 y 34 días después del inicio del ensayo. En torno al día 27, los frutos pulverizados con lle empezaron a cambiar de color, mientras que los frutos de "Con.", pulverizados con agua, se mantenían verdes. En torno al día 34, los frutos pulverizados con lle cambiaron de color a un color rojo totalmente maduro, mientras que los frutos pulverizados con agua todavía presentan un color naranja semimaduro. Los resultados se muestran en la figura 11a.

Además, se midió el contenido de carotenoides de los tres frutos restantes mediante los procedimientos siguientes en tomo al día 27 después del inicio del ensayo (figura 11b). Se extrajeron las semillas de los frutos del tomate, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero. La muestra molida (0.5 mg) se introdujo en un tubo de 2 ml, se añadió 1 ml de cloroformo y se llevó a cabo la extracción en un agitador (Micro & Shaker, IUCHI) durante 10 minutos con vibración. La mezcla de extracción se centrifugó durante 5 minutos (8000 rpm) y la capa de cloroformo, como capa inferior, se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió nuevamente cloroformo (0.5 ml) al primer tubo, se llevó a cabo la extracción de la misma manera y se extrajo por completo la capa de cloroformo y se transfirió al segundo tubo que contenía el extracto de cloroformo anteriormente mencionado. A continuación, se evaporó el cloroformo del extracto obtenido, mediante la utilización de un evaporador centrífugo. A continuación, se preparó una disolución de muestra mediante la adición de 0.5 ml de cloroformo al residuo para disolverlo y se analizaron los carotenoides contenidos en la disolución de muestra. Para la medición de los carotenoides, la muestra de extracción se diluyó 100 veces con cloroformo y se midió la absorbancia de la misma a la longitud de onda de extinción de los carotenoides (480 nm) mediante la utilización de un espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter). Se muestran los resultados en la figura 11b.

Tal como se muestra en la figura 11, se encontró que el contenido de carotenoides de los frutos del tomate pulverizados con lle era superior al de los frutos tratados con agua, basándose en una evaluación visual (figura 11a) y una evaluación basada en la cuantificación de los carotenoides (figura 11b). Estos resultados revelan que la síntesis de carotenoides y la coloración de los frutos resultaban estimulados por la pulverización con lle de los frutos.

**Ejemplo 5 (únicamente de referencia): relación entre la pulverización con isoleucina y con ácido jasmónico**

Se pulverizó una disolución acuosa de isoleucina 10 mM (lle) o de agua (Con.) sobre hojas de plantas de tomate cherry (Suncherry Pure) cultivadas de la manera indicada en el ejemplo 3 y se analizó la expresión de genes relevantes al ácido jasmónico. Tres horas después de la aplicación foliar, se recogieron hojas de la misma parte y se aisló el ARN mediante la utilización del sistema SV Total RNA Isolation System™ (Promega) según el manual del kit. Mediante la utilización de la mezcla maestra de qPCR RT ReverTraAce™ (TOYOBO), se sintetizaron cadenas de ADNc primario a partir del ARN extraído.

i) Análisis de los genes implicados en la síntesis del ácido jasmónico

- 5 Se analizó la expresión del gen de 13-lipooxigenasa (*LOX*) situado cadena arriba de la ruta de biosíntesis del ácido jasmónico y el gen para la síntesis de JA-Ile de JA e Ile (*JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)*). Se llevó a cabo PCR en tiempo real mediante la utilización de los ADNc anteriormente indicados como molde y los cebadores mostrados en la tabla 3. Las cantidades de expresión de los genes se representan como cantidades de expresión relativa con respecto a la del gen actina. Se muestran los resultados en la figura 12.
- 10 La expresión del gen *LOX* y del gen *JAR1* en las hojas de tomatara pulverizadas con Ile fue significativamente más elevada que en hojas de tomatara pulverizada con agua (Con.).

Tabla 3: cebadores para PCR en tiempo real

Nombre de cebador	Secuencia (5'-3')	SEC ID nº
Cebadores para el tomate		
Actin-F	CACCATTGGGTGTGAGCGAT	1
Actin-R	GGGCGACAACCTTGATCTTC	2
JAR-F	GTGTTGACTAAAGATGCTGGG	3
JAR1-R	GGTAAAAGATCACCATCAGCAA	4
LOX-F	CGGTTTTGTCCATGGCAAAG	5
LOX-R	ACCGTCAGGATCACCGATATC	6
PI-F	GTTGATGCCAAGGCTTGTACT	7
PI-R	CAACATGTGGTACATCCGGT	8
MYC2-F	AGGGTCGTCTAGTTCAGCAG	9
MYC2-R	TGGGCTTGAAGTGTACATCGCAA	10
Psy-F	TTGGGCTTGTGAGTGAAGC	11
Psy-R	TGTCGTTGCCTTGATTCAGG	12
Pds-F	TTGTGTTTGCCGCTCCAGTGGAT	13
Pds-R	GCGCCTTCGATTGAAGCCAAGTA	14
Zds-F	ATTATTACATTGAGGGACAAGGC	15
Zds-R	TCATCAGACAAGACTCAACTGAT	16
Cebadores para el pimiento		
LOX-F	AGACAAGCACTCCCTGAGGACC	17
LOX-R	AACTCTGGCCACCATGGCTCA	18
Psy-F	TGCTTTCGCTGCAGTGCCAGA	19
Psy-R	TGTCTAGCGCACAAACCGTCAAGG	20

ii) Análisis de genes que responden al ácido jasmónico.

- 20 Los resultados del análisis de PCR en tiempo real de los genes que responden al ácido jasmónico y de los genes de inhibidor de proteasa (*PI*) y *MYC2*, realizado mediante la utilización de los ADNc anteriormente como moldes se muestran en la figura 13. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3. Mediante la pulverización de Ile, se incrementó la expresión de los genes *PI* y *MYC2*.

iii) Análisis de los genes implicados en la síntesis de carotenoides.

- 25 Se pulverizó una disolución acuosa de isoleucina 10 mM (Ile) o agua (Con.) sobre las superficies de las hojas de plantas de tomate cherry y se aisló el ARN a partir de las hojas 24 horas después. Mediante la utilización del ARN aislado, se analizó la expresión de los genes que participan en la biosíntesis de carotenoides, los genes de fitoeno sintasa (*Psy*), fitoeno desaturasa (*Pds*) y ζ-caroteno desaturada (*Zds*). Se llevó a cabo la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y el análisis de PCR en tiempo real de la manera indicada anteriormente. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.

Se muestran los resultados en la figura 14. En la tomatara pulverizada con Ile, se incrementó la expresión de *Psy*, *Pds* y *Zds*.

**Ejemplo 6 (únicamente de referencia): investigación de la concentración de isoleucina para la pulverización (I).**

- 40 Se cultivaron plantas de tomate cherry de la manera indicada en el ejemplo 3 y se pulverizaron 20 ml de una disolución acuosa de isoleucina 1 mM, 4 mM, 7 mM o 10 mM (Ile) sobre las superficies de las aguas y frutos de cada planta. Una semana después, se pulverizó nuevamente Ile de la misma manera, se recogieron las hojas 3 horas después, y se analizó la expresión de los genes *LOX*, *JAR1*, *PI* y *MYC2* de la manera indicada en el ejemplo 5. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.

Se muestran los resultados en la figura 15. La expresión de los genes se incrementó sustancialmente de una manera dependiente de la concentración de Ile.

5 **Ejemplo 7 (únicamente de referencia): investigación de la concentración de isoleucina para la pulverización (II).**

Se cultivaron tomateras (variedad: Caddy, Tokita Seed) en una sala Biotrón de la manera indicada en el ejemplo 1. Tres semanas después de la siembra, se pulverizaron 3 ml de agua o de una disolución acuosa de isoleucina 0.01 mM, 0.1 mM, 50 mM o 100 mM (Ile) sobre las superficies foliares de cada planta; se llevó a cabo el muestreo a partir de las hojas del segundo follaje y se analizó la expresión de los genes *LOX*, *JAR1*, *PI* y *MYC2* de la manera indicada en el ejemplo 5.

Se muestran los resultados en la figura 16. Se estimuló la expresión de los genes mediante pulverización de 50 mM de Ile.

Basándose en dicho resultado, junto con los resultados del ejemplo 6, se consideró que la concentración de Ile era preferentemente no inferior a 0.5 mM y no superior a 75 mM.

20 **Ejemplo 8 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre el pimiento.**

Se pulverizó una disolución acuosa de isoleucina 10 mM (Ile) sobre plantas de pimiento (variedad, Anaheim), que asimismo pertenecen a la familia *Solanaceae*, como el tomate, y se llevó a cabo el análisis de la expresión génica. Las plantas del pimiento se cultivaron en un invernadero de la manera indicada en el ejemplo 2.

Se pulverizó Ile una vez a la semana y después de la segunda pulverización, se recogieron hojas de las plantas del pimiento. Se llevó a cabo la extracción del ARN, la síntesis de ADNc y PCR en tiempo real de la manera indicada en el ejemplo 5 para analizar la expresión génica. Se analizó la expresión del gen *LOX* mediante la utilización de hojas recogidas 3 horas después de la segunda pulverización y se analizó la expresión del gen *Psy* mediante la utilización de hojas recogidas 24 horas después de la segunda pulverización. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.

Se muestran los resultados en la figura 17. La expresión de los genes *LOX* y *Psy* de las plantas de pimiento pulverizadas con Ile era más elevada que la observada para Con.

Debido a que la ruta del ácido jasmónico y la ruta de los carotenoides resultaron activadas por la pulverización con Ile asimismo en plantas de pimiento, que pertenecen a la familia *Solanaceae* al igual que la planta del tomate, pueden esperarse de manera general efectos similares de la pulverización con Ile para las plantas solanáceas.

40 **Ejemplo 9 (únicamente de referencia): efecto de estimulación de la coloración y efecto de incremento del número de racimos recolectables de la isoleucina en tomateras fructificantes de tamaño de fruto intermedio.**

Para el ensayo, se utilizaron tomateras fructificantes de tamaño de fruto intermedio en la segunda mitad de su crecimiento (variedad, Tsukutsuku-shi) que se cultivaron en un invernadero y fructificación del nivel 12. Se seleccionaron 12 masas radiculares contiguas de las tomateras, 6 de ellas se utilizaron para el grupo de no tratamiento (control) y las 6 masas radiculares restantes se utilizaron para el grupo de tratamiento de Ile. Como fruto utilizado para el ensayo, se seleccionaron 10 racimos de cada uno de frutos sustancialmente no colorados de entre los niveles 9 y 10 de plantas del grupo de no tratamiento y del grupo de tratamiento de isoleucina (Ile), y se etiquetaron. Para el grupo de tratamiento de Ile, se pulverizó una disolución acuosa de Ile que contenía Ile 3 mM y un agente de dispersión (Squash al 0.2%, MARUWA Biochemical) sobre los frutos y hojas objetivo de la planta completa, y las plantas del grupo de no tratamiento no se pulverizaron con ninguna sustancia. El volumen total de disolución pulverizada sobre las plantas de 6 masas radiculares fue de 600 ml. Tras el tratamiento, se confirmó la coloración de los frutos del tomate y se recolectaron de cada racimo los días 11, 8 y 27.

En el momento en que sustancialmente la totalidad de los frutos se habían coloreado (madurado), o muchos frutos estaban a punto de madurar en exceso (aunque la parte superior del fruto todavía no estuviese colorada), se recolectaban los frutos. El número de racimos recogido el día 11 después del tratamiento fue de 3 para el grupo de no tratamiento y de 7 para el grupo de tratamiento de Ile. El número de racimos recogido el día 18 después del tratamiento fue de 4 para el grupo de no tratamiento y de 3 para el grupo de tratamiento de Ile. El número de racimos recogido el día 27 después del tratamiento fue de 3 para el grupo de no tratamiento y de 1 para el grupo de tratamiento de Ile (figura 18). Tal como se observa a partir de dichos resultados, se aceleró la coloración del fruto del tomate en el grupo de tratamiento de Ile y se sugiere que Ile estimuló la coloración del fruto del tomate. Entre los frutos recogidos de 10 racimos, el total de 85 frutos del grupo de no tratamiento incluía 15 frutos no coloreados, mientras que el total de 86 frutos del grupo de tratamiento de Ile incluía sólo 8 frutos inmaduros, lo que significa que la pulverización con Ile reduce el número de frutos no coloreados.

**Ejemplo 10 (únicamente de referencia): efecto de líquido de producción secundaria mediante fermentación de isoleucina sobre el pimiento (pimiento morrón).**

5 La expresión del gen *LOX* en la ruta del ácido jasmónico se investigó en una planta del pimiento (pimiento morrón, variedad: Frupyred EX) pulverizada con un líquido de producción secundaria mediante fermentación de isoleucina (Ile). Se pulverizó una disolución diluida de líquido de producción secundaria mediante fermentación de Ile (concentración de Ile, 2.34% (p/v)) sobre hojas de la planta de pimiento morrón y se investigó la expresión del gen *LOX* de la manera indicada en el ejemplo 5. La concentración del líquido de producción secundaria de fermentación de Ile pulverizado era de 3.8 mM. Se muestran los resultados en la figura 19. Asimismo se observó una inducción de la expresión del gen *LOX* similar a la observada con una concentración similar de Ile, con el líquido de producción secundaria mediante fermentación de Ile.

**Ejemplo 11 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre la uva.**

15 (1) Efectos de la isoleucina y diversos aminoácidos sobre la coloración de células en cultivo de uva.

Una estirpe celular (VR, número de gestión RPC00003) derivada de uva europea (*Vitis vinifera* L.) y almacenada en el Institute of Physical and Chemical Research, BioResource Center se subcultivó en medio agar-MS. Se transfirieron los callos de VR de subcultivo a medio agar-MS que contenía una disolución 5 mM de un aminoácido diferente y se cultivaron. Para el control positivo, se utilizó ácido abscísico (ABA), del que se conoce el efecto de estimulación de la coloración, a una concentración de 100 µM (Jeong et al., Plant Science 167:247-252, 2004). El 5º día después de la transferencia, se liofilizaron los callos y se molieron y se extrajo la antocianina de los mismos mediante la utilización de una disolución de HCl al 1%/MeOH. Se midió la absorbancia de los extractos a 530 nm y se midió el contenido de antocianina mediante la utilización de cianidín-3-glucósido como sustancia estándar. Se determinó el contenido relativo de antocianina que se había acumulado en los callos de cada grupo de tratamiento de aminoácido, respecto al contenido de antocianina de los callos del control positivo, que se consideró que era 100%.

30 Se muestran los resultados en la tabla 4. Los callos tratados con isoleucina (Ile) mostraron el contenido de antocianina más elevado.

Tabla 4: análisis del contenido de antocianina de callos de uva tratados con aminoácidos

Aminoácido	Pro	Ile	Asp	Glu	Ser	Asn	Gln	Gly	His	Arg
Contenido relativo de antocianina	27%	76%	11%	4%	38%	38%	18%	23%	29%	9%

Aminoácido	Val	Met	Ala	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Lys	Try
Contenido relativo de antocianina	6%	42%	7%	4%	40%	6%	30%	35%	15%	0%

35 (2) De la manera indicada anteriormente se midieron los contenidos de antocianina de los callos de uva tratados con isoleucina y prolina, respectivamente. Se muestran los resultados en la figura 20. La coloración de los callos de uva resultó estimulada por el tratamiento con isoleucina (Ile) de 1 mM o superior. Aunque asimismo se observó coloración en el grupo de tratamiento de prolina (Pro), el efecto fue más débil que el del tratamiento de Ile.

40 (3) Efecto de la isoleucina sobre la coloración de las uvas.

Para el ensayo, se utilizaron plantas Cabernet Sauvignon que habían sido cultivadas en un campo de cultivo experimental y habían iniciado el envero. Se recogieron ocho racimos de frutos de la uva de cada una de dos masas radiculares, es decir, en total se recogieron 16 racimos de frutos y se pulverizaron sobre ellos 6.25 ml en cada racimo de Applauch BI al 0.1% (Kao, control), 1 g/l de ácido abscísico (ABA) + Applauch BI al 0.1% (control positivo) o isoleucina 10 mM + Applauch BI al 0.1%. Las muestras se recogieron 4 veces y se recogieron de 4 racimos en cada tiempo. Se extrajo la antocianina contenida en el pericarpio con una disolución mixta de agua y acetona (1:2) del pericarpio y se midió el contenido de antocianina de la manera indicada anteriormente. Se muestran los resultados en la figura 21. Se demostró que el tratamiento de los frutos de la uva con Ile incrementaba el contenido de antocianina del pericarpio.

**Ejemplo 13 (únicamente de referencia): efecto de la isoleucina sobre la coloración de la manzana.**

55 Se recogieron frutos de manzana (variedad: Tsugaru) a punto de madurar (antes de la coloración), se lavaron con agua corriente seguido de agua destilada y se sumergieron en agua (control) y en soluciones acuosas de isoleucina (Ile) de diversa concentración durante 15 minutos. A cada disolución de tratamiento se le añadió Applauch BI (Kao) al 0.1%. Los grupos de tratamiento consistían en los grupos siguientes:

- 60 i) Control (agua)  
ii) Ile 1 mM

- iii) lle 5 mM
- iv) lle 10 mM
- v) jasmonato de metilo 0.4 mM (MeJA)
- vi) lle 10 mM + Amisoft™ 1 mM (tensioactivo aniónico, glutamato de cocoilo sódico).

5

Tras el tratamiento, los frutos se secaron al aire y se dejaron en reposo en un incubador. Las condiciones consistían en una temperatura constante de 20°C, condiciones de iluminación de 120  $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  obtenidas con 9 lámparas fluorescentes de 40 W y condiciones de luz diurna de 16 horas de periodo de luz y 8 horas de periodo de oscuridad cada día.

10

Se evaluó el color del pericarpio de los frutos de manzana mediante la medición del contenido de antocianina. Se recogió pericarpio (0.5 g) de un fruto de cada grupo de tratamiento y se sumergió en 5 ml de ácido fórmico al 2% a 4°C durante 24 horas para extraer la antocianina. Se analizó el contenido de antocianina del extracto mediante cromatografía líquida. Debido a que la mayor parte de la antocianina de la manzana consiste en galactósidos de cianidina, se calculó la concentración de antocianina como concentración de galactósido de cianidina.

15

Se muestran los resultados en la figura 22. Puede observarse que al tratar los frutos de manzana con lle, se detectan contenidos de antocianina más elevados los días 10 y 15 después del tratamiento que en el grupo de control.

20

Aplicabilidad industrial

La composición utilizada en el procedimiento de la presente invención presenta la acción para la mejora en el contenido de aminoácido esencial y/o ácido  $\gamma$ -ABA.

25

Sobre la base de los efectos como se describe anteriormente, la composición utilizada en el procedimiento de la presente invención puede mejorar el rendimiento del cultivo y/o la calidad de las plantas en un periodo corto de tiempo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para proporcionar una mejora en el contenido de aminoácido esencial y/o ácido  $\gamma$ -aminobutírico, que comprende rociar una disolución que comprende 1.0 a 75 mM de isoleucina sobre una hortaliza de fruto, un árbol frutal, o una planta de grano, en el que el aminoácido esencial es por lo menos uno de triptófano, lisina, treonina, valina, leucina e histidina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la isoleucina es L-isoleucina.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la disolución que comprende isoleucina es una disolución que comprende isoleucina purificada, un líquido de fermentación o un subproducto de fermentación de isoleucina, o un producto de fraccionamiento de estos que comprende isoleucina.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disolución es rociada sobre una hortaliza de fruto o un árbol frutal.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la planta pertenece a la familia *Solanaceae*, *Vitaceae* o *Rosaceae*.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la planta es tomate, pimiento, uva o manzana.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la disolución es rociada sobre una superficie de hoja y/o un fruto.

Fig. 1

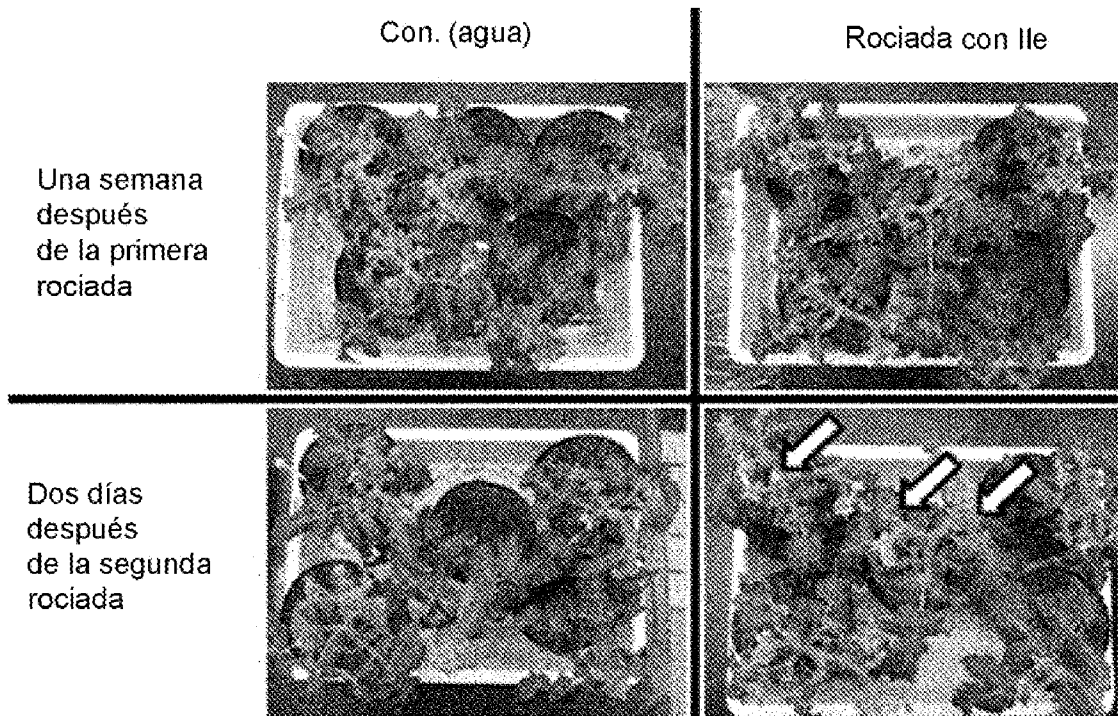


Fig. 2

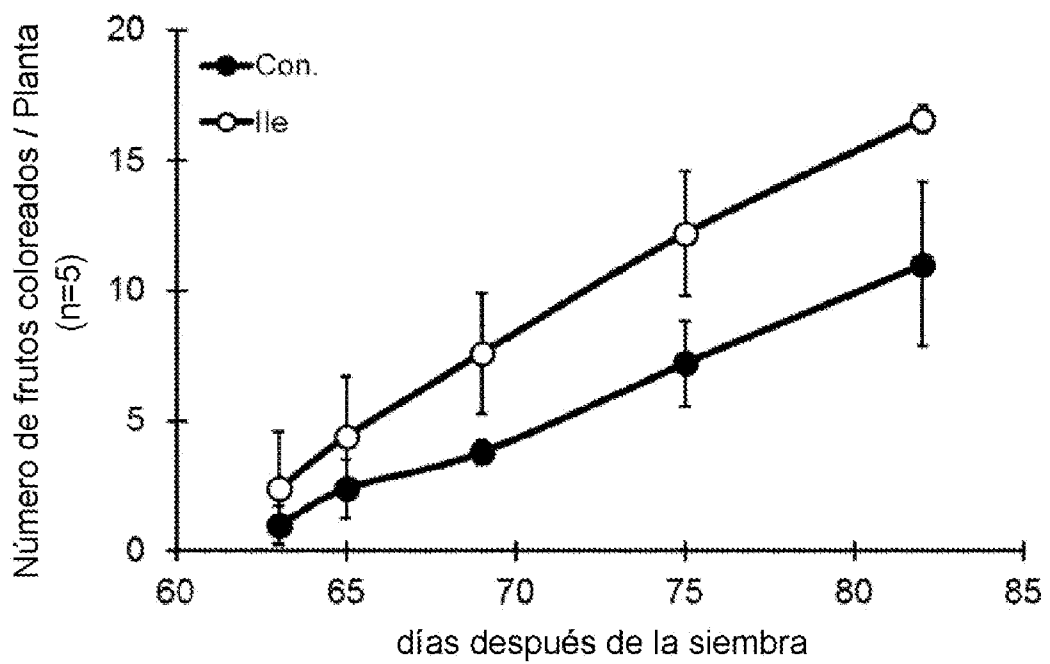


Fig. 3

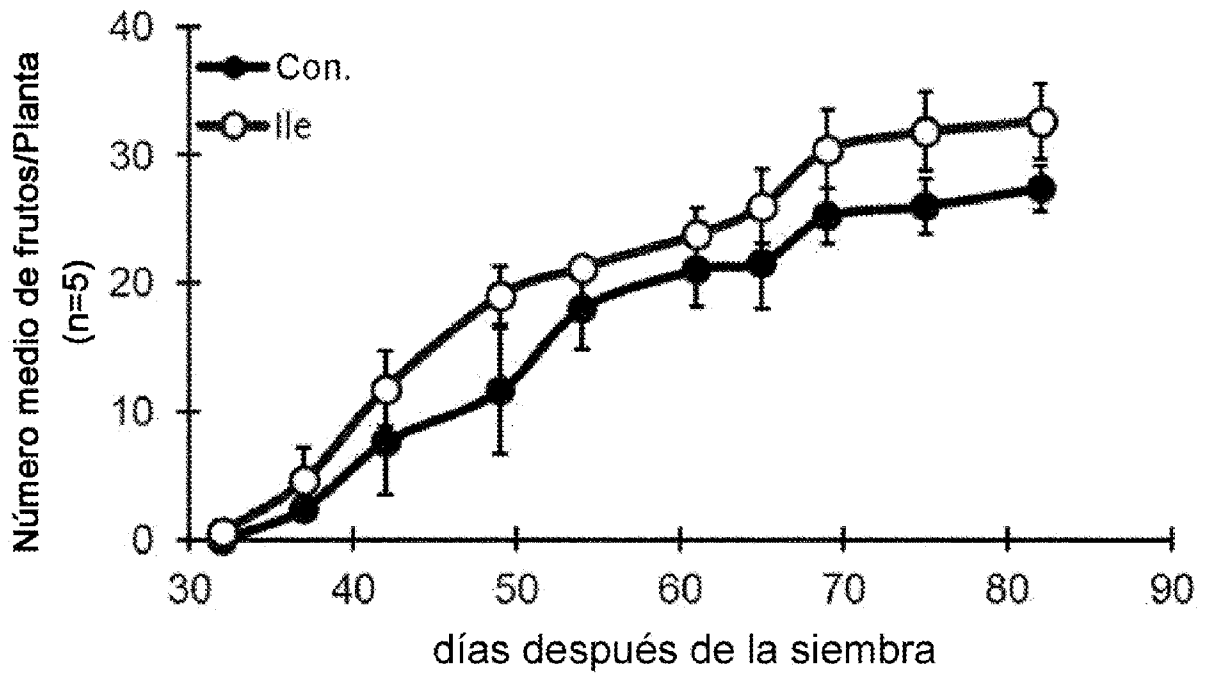


Fig. 4

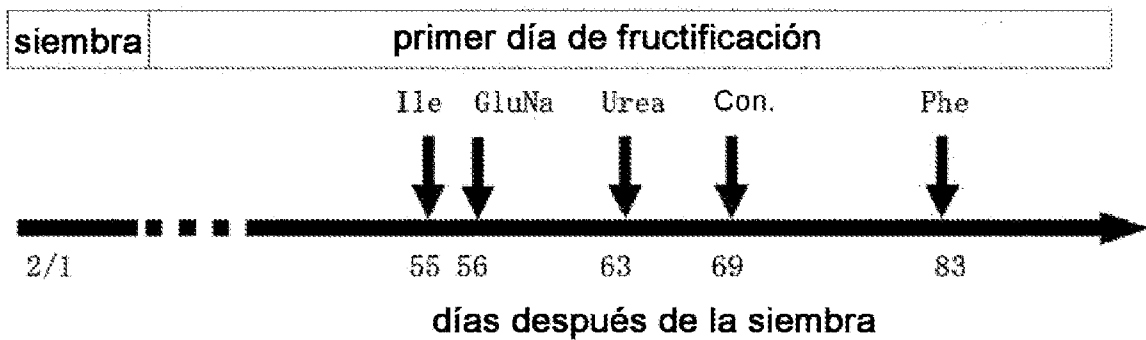


Fig. 5

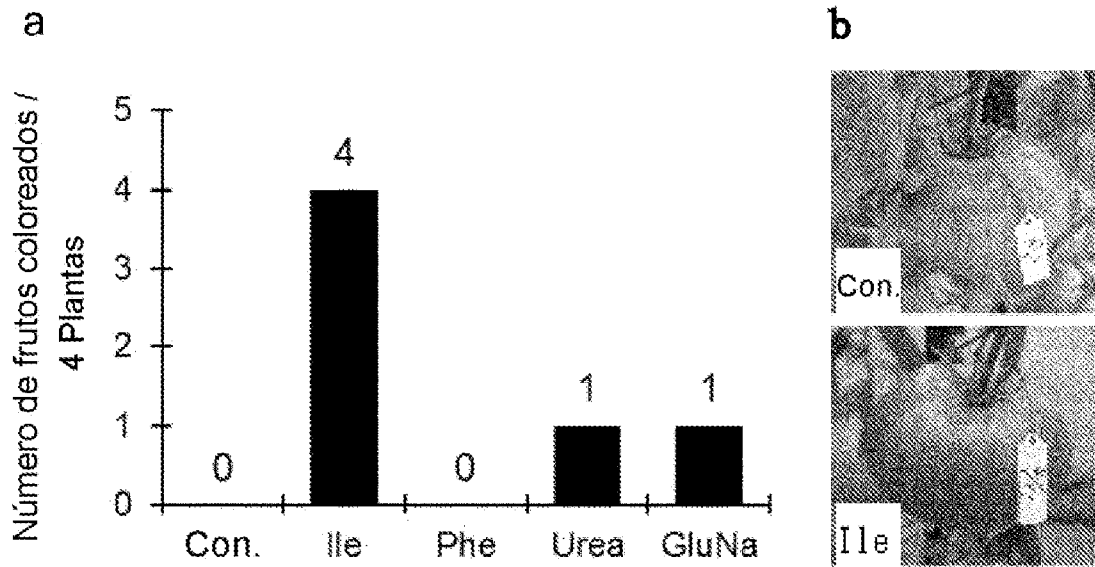


Fig. 6

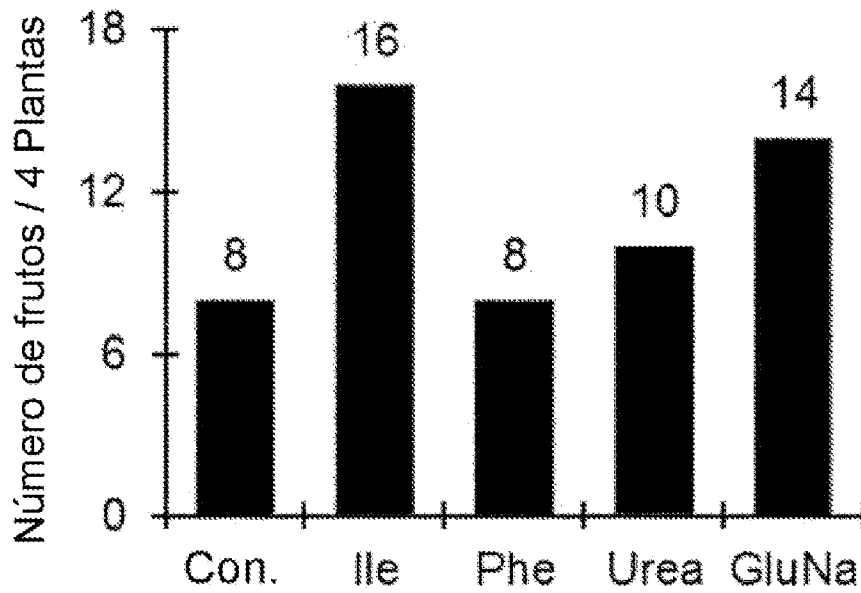


Fig. 7

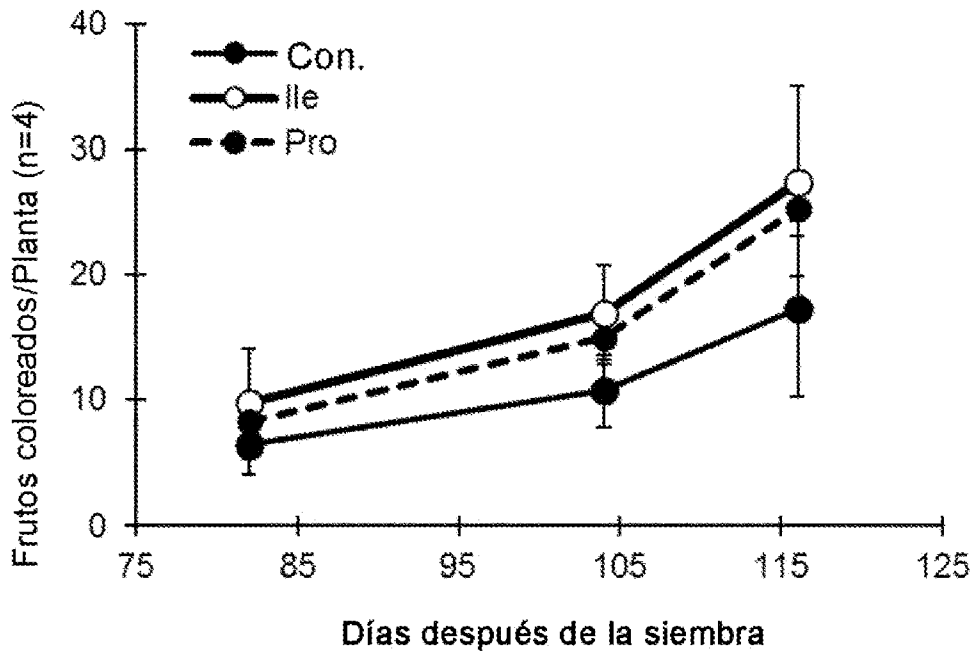


Fig. 8

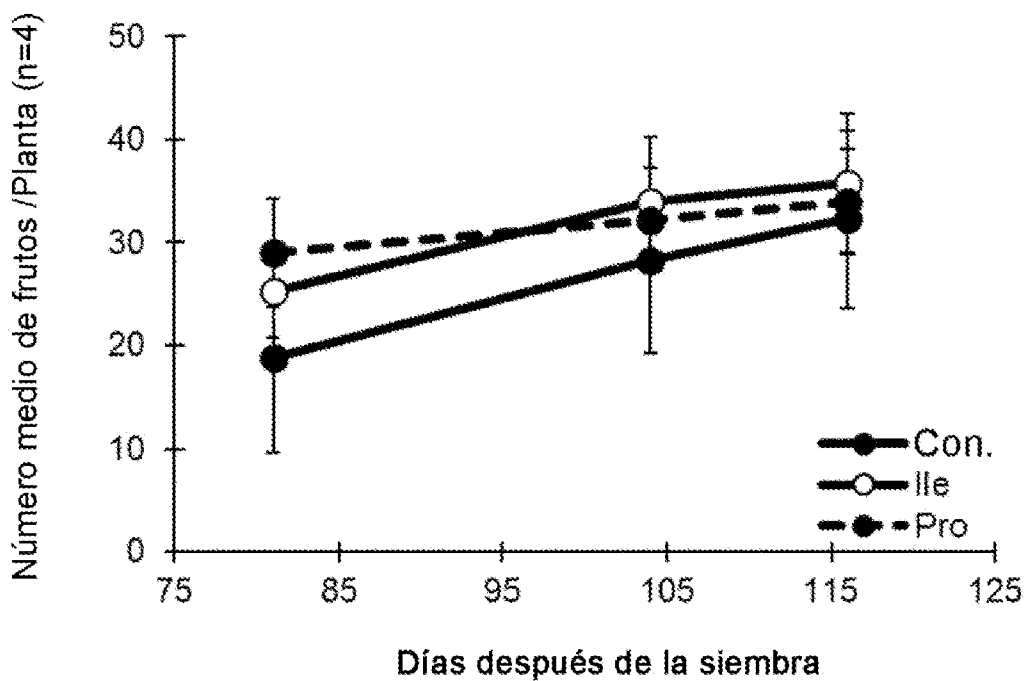


Fig. 9

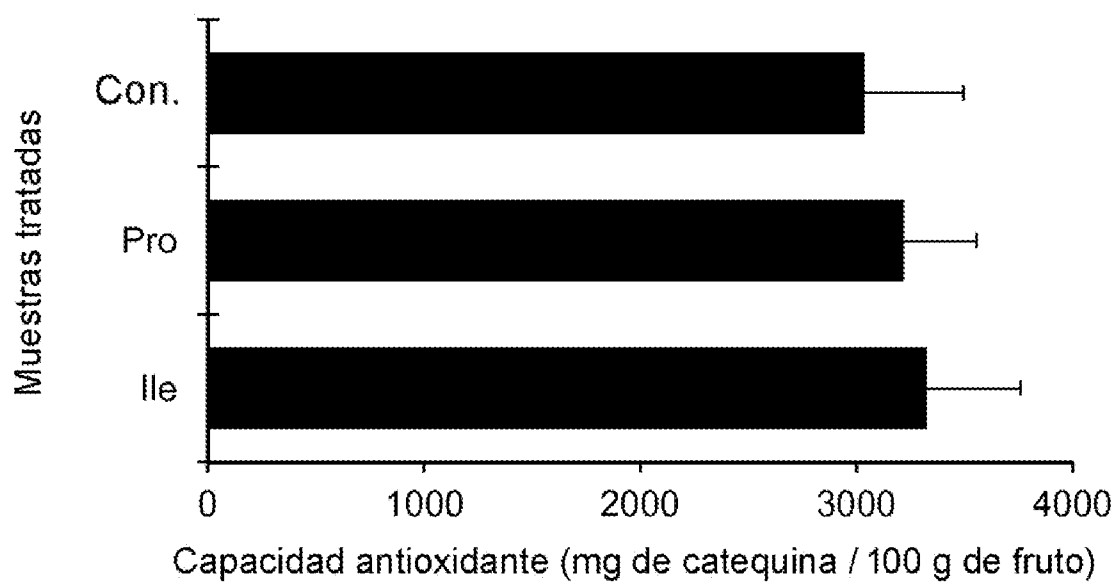


Fig. 10

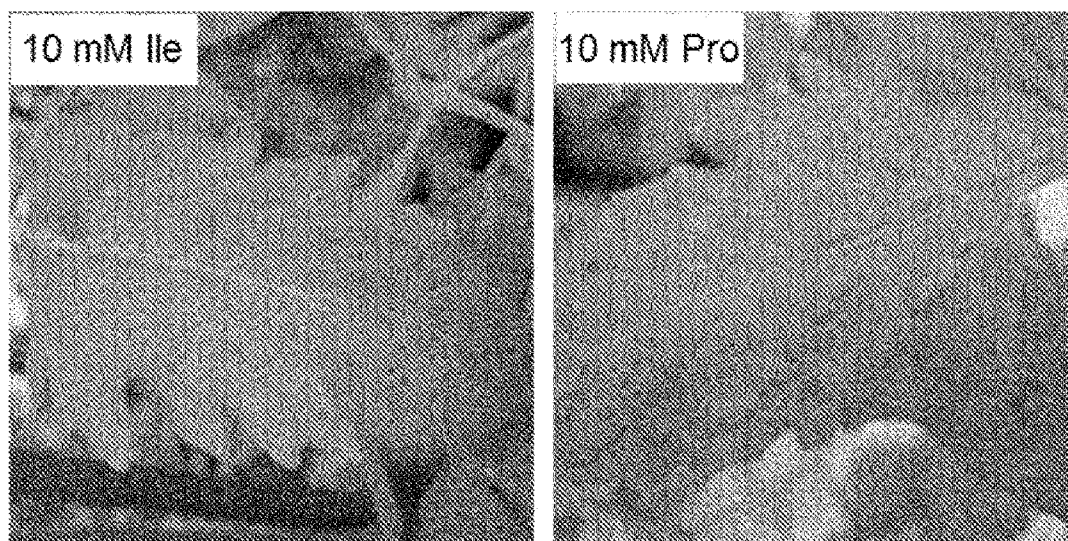


Fig. 11

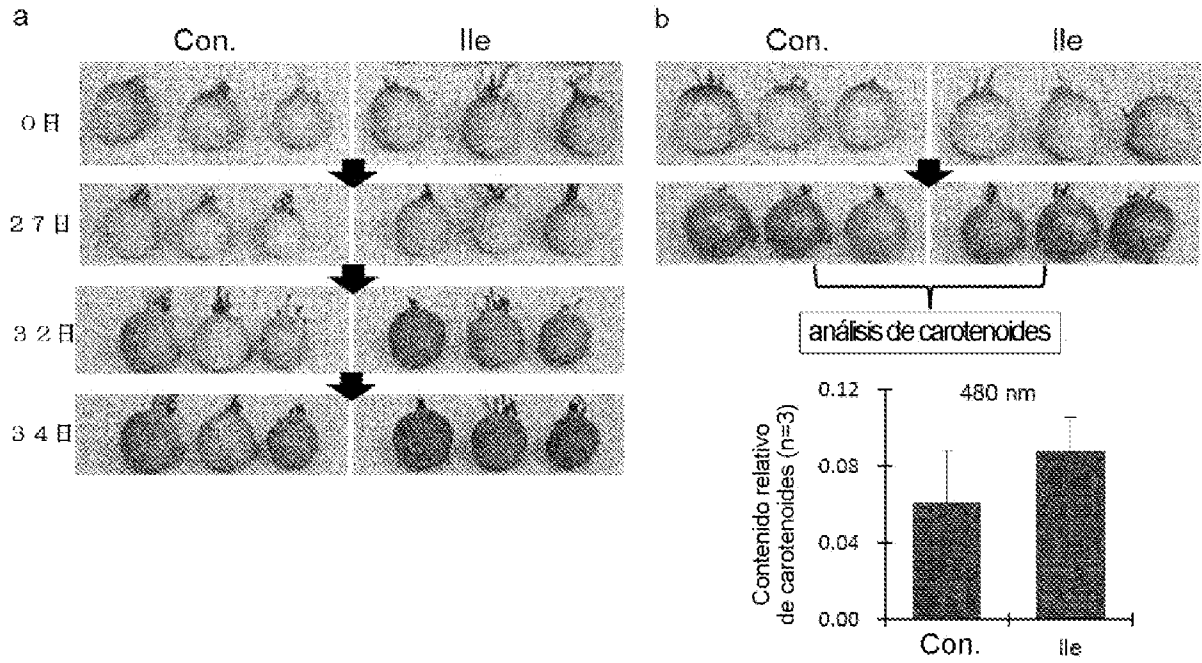


Fig. 12

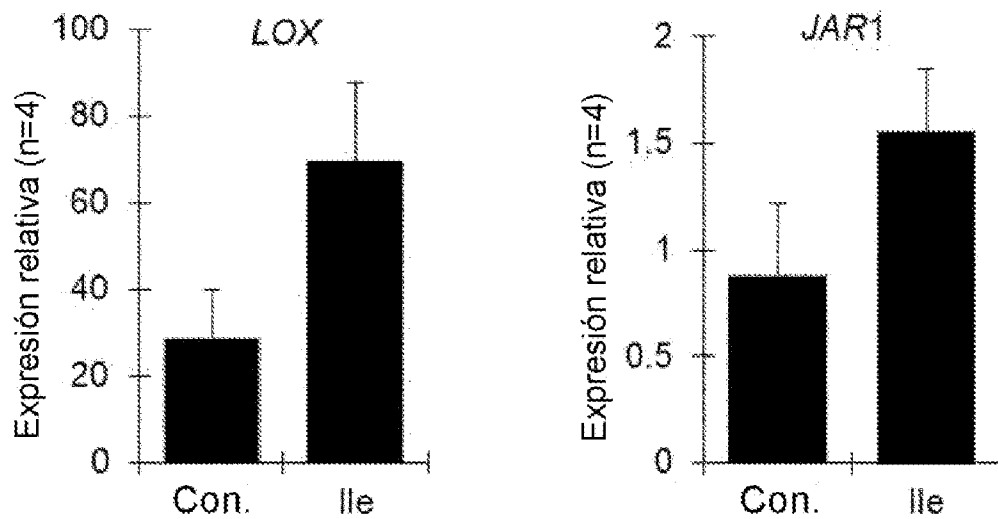


Fig. 13

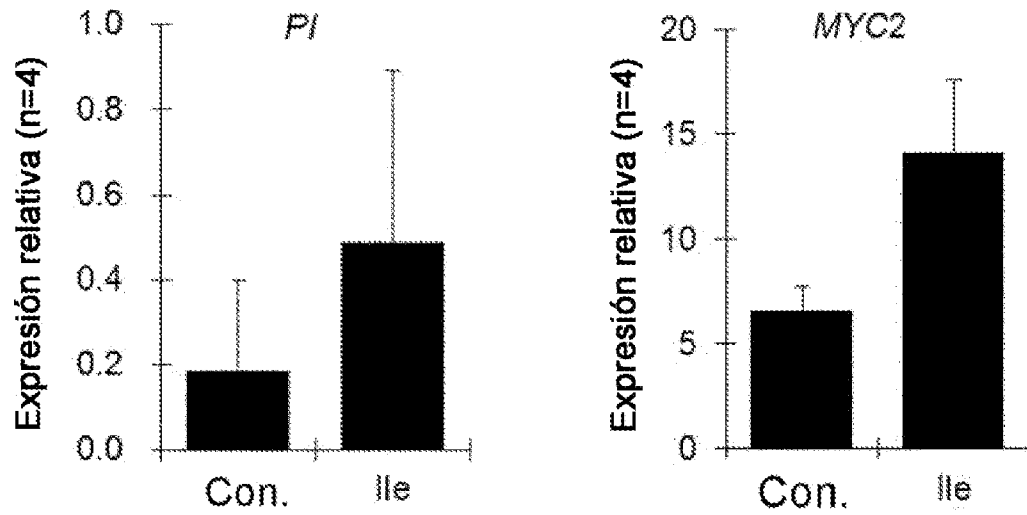


Fig. 14

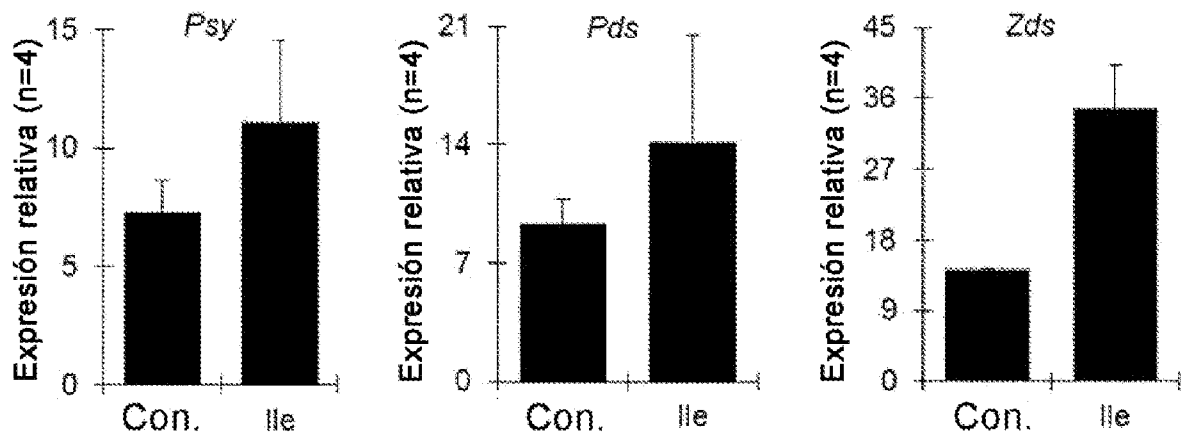


Fig. 15

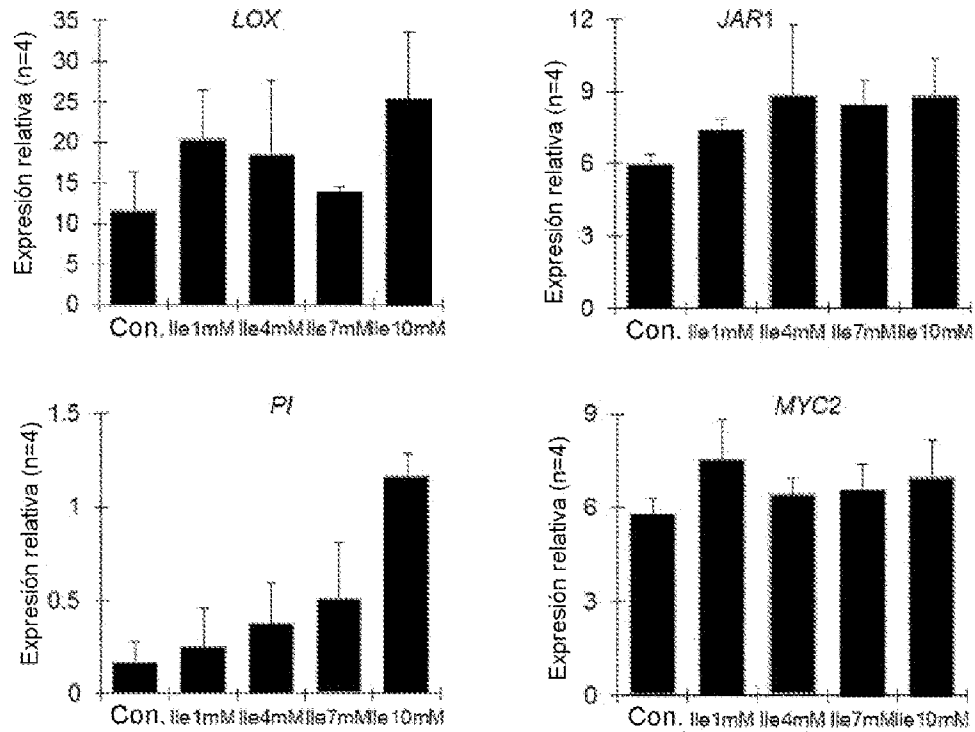


Fig. 16

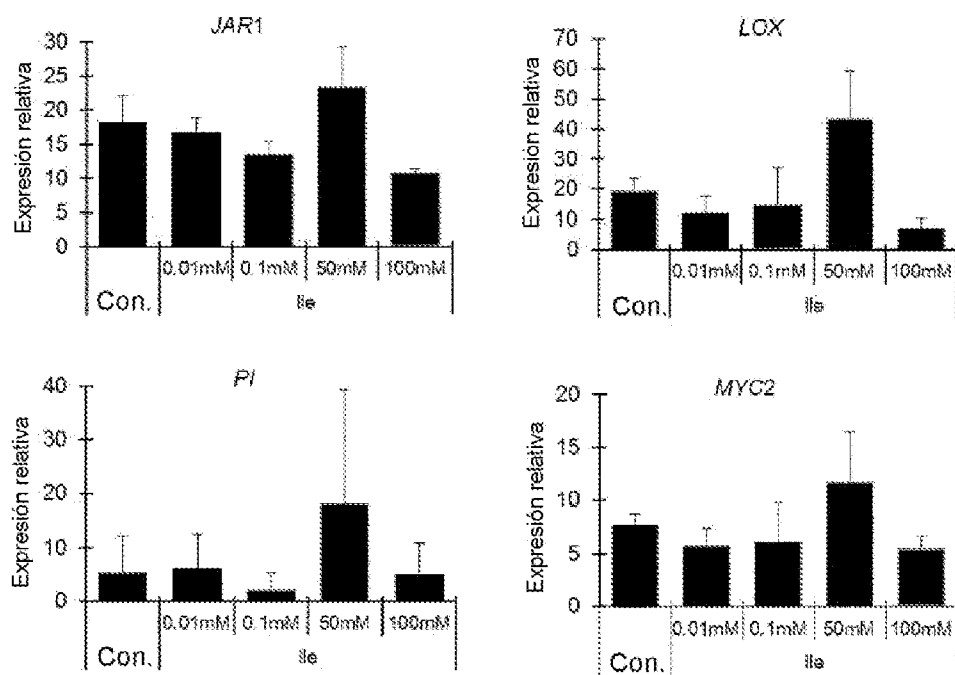


Fig. 17

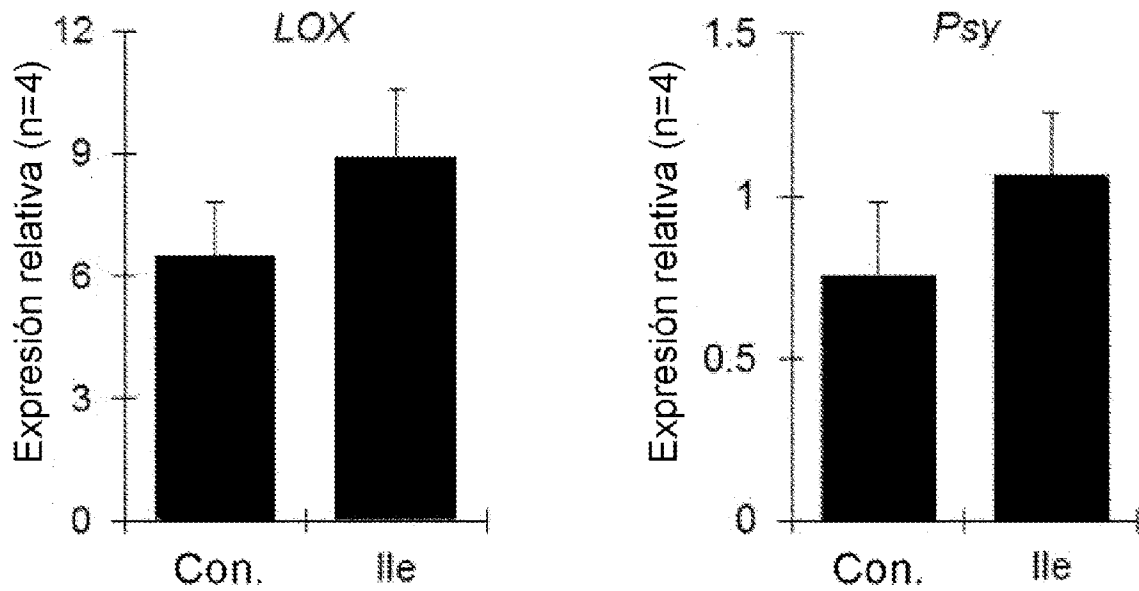


Fig. 18

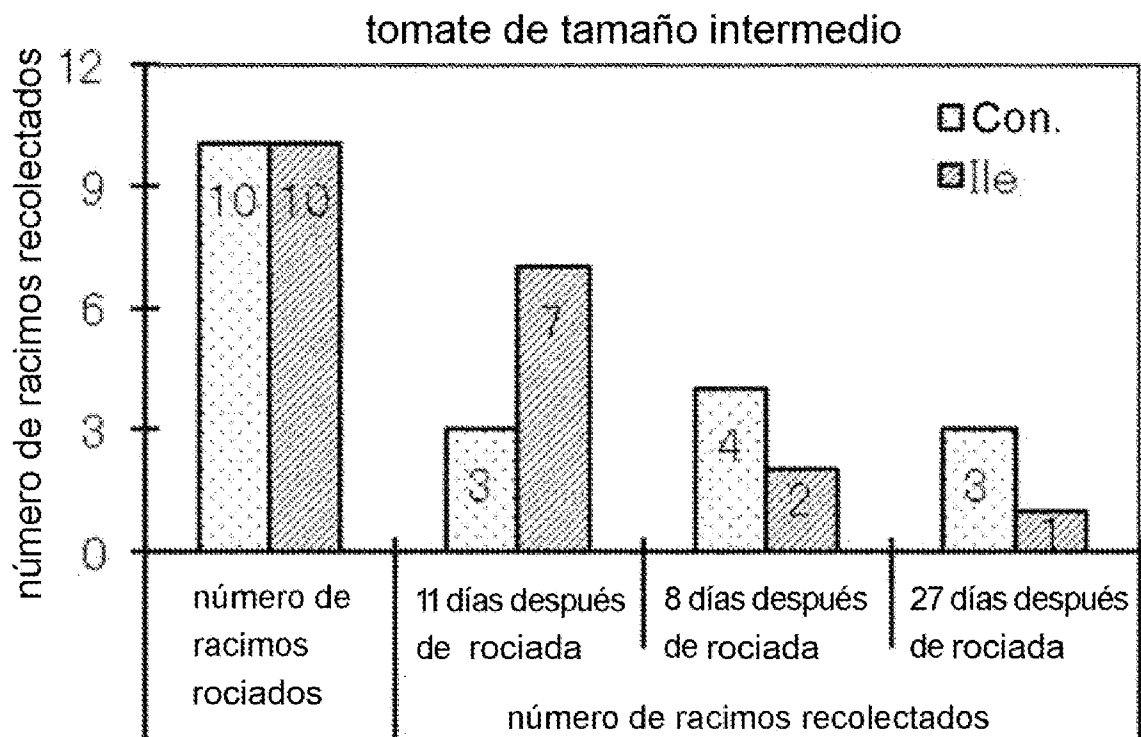


Fig. 19

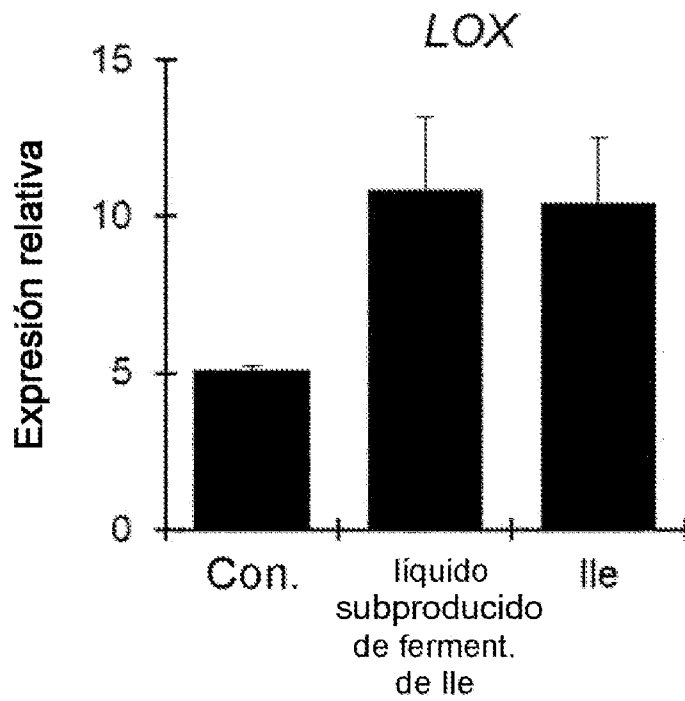


Fig. 20

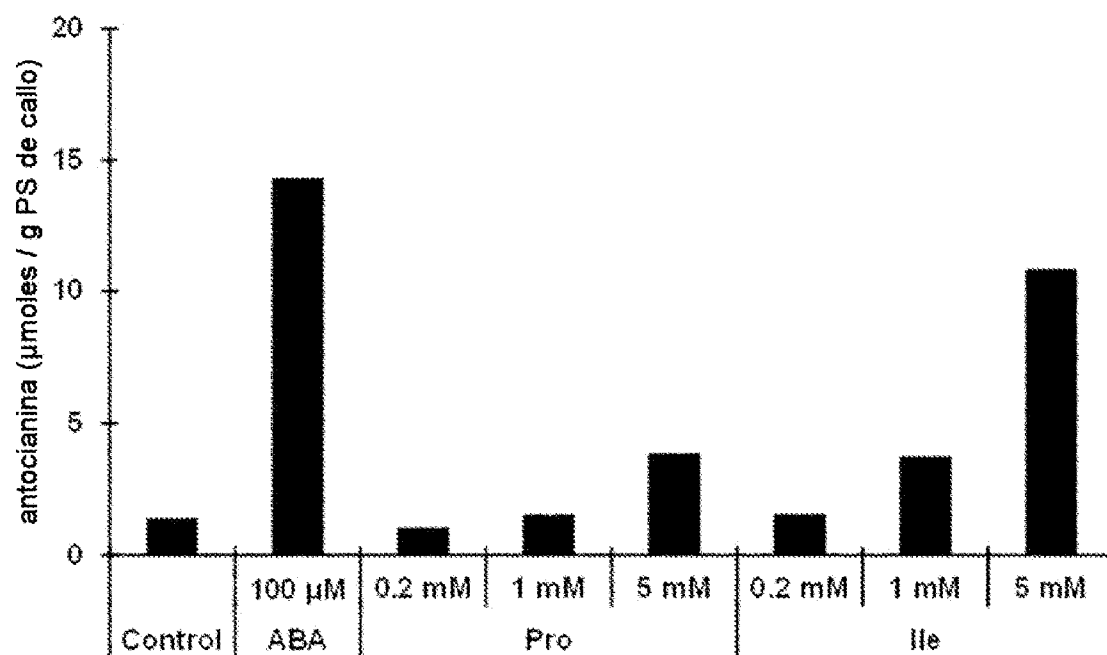


Fig. 21

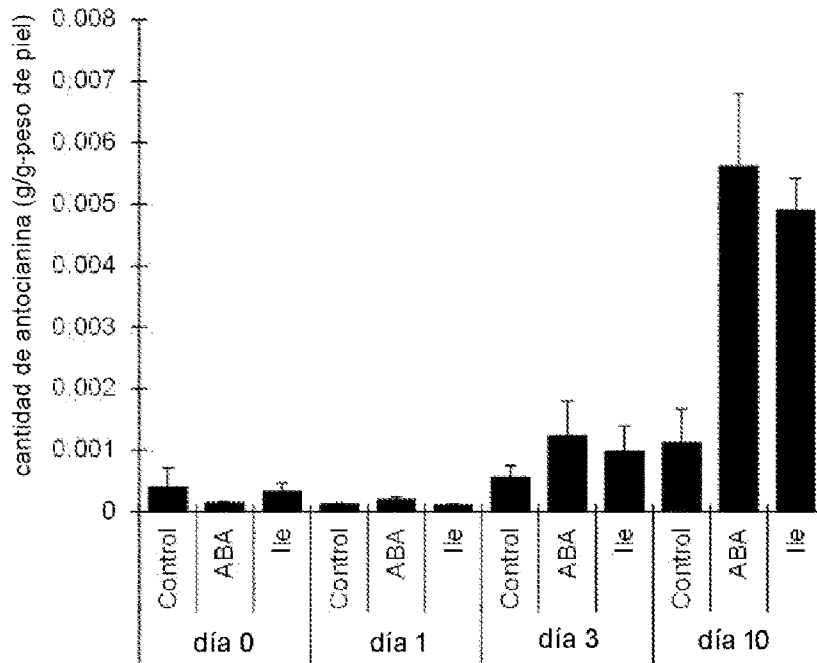


Fig. 22

