

USO DE UN SUERO ÁCIDO PARA ESTIMULAR LA GERMINACIÓN DE UNA PLANTA

La invención encuentra su aplicación en el campo agroecológico y agrícola y se refiere, en particular, a la estimulación de la germinación de un grano de polen de una planta, y/o a la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

La reproducción sexuada de una planta es un proceso importante en las plantas de flor que culmina en la formación de granos o de frutos. Esta producción sexuada se caracteriza por la unión de los gametos masculinos de una planta (presentes en el grano de polen) y de los gametos femeninos de una planta (óvulos). Luego de ella tienen lugar diversos procesos biológicos consecutivos tales como la granazón, el crecimiento del fruto/del grano que se caracteriza por procesos de división y de expansión celular, luego, por la maduración del grano y/o del fruto.

La primera etapa de la reproducción sexuada, que es clave, es cuando un grano de polen cae sobre el pistilo de una planta. El grano de polen o gameto masculino es generado por las anteras situadas en los extremos de las etaminas de las plantas. Ese grano de polen será transportado por el viento o por los insectos polinizadores al nivel del extremo del pistilo de una planta, a saber, sobre el estigma. Dado que el gameto femenino de la planta está situado en la base del pistilo, el grano de polen germinará sobre el estigma, formará un tubo polínico que encajará en el pistilo y allí

progresará elongándose al nivel del gameto femenino, también denominado óvulo. Ese proceso culmina con la unión del grano de polen y del óvulo, permitiendo así la fecundación o reproducción sexuada de la planta.

La germinación del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico corresponden a la fase progámica. En las plantas de flor, esta fase se desarrolla relativamente rápido (de 6 a 24 horas en promedio; algunas especies de plantas de flor pueden tener una fase progámica más larga). La germinación del grano de polen (hidratación del grano como consecuencia de la caída sobre el extremo de un estigma, luego, emergencia del tubo polínico) puede llevarse a cabo desde una media hora hasta algunas horas. La elongación del tubo polínico posterior se caracteriza por un crecimiento polarizado, por una secreción masiva de materiales de la pared celular como, por ejemplo, las pectinas, así como por la síntesis de los tapones de calosa al nivel de sus paredes.

La rapidez de esta fase progámica confiere una ventaja evolutiva innegable, en lo referente a la reproducción sexuada. En efecto, mientras más lenta es la fase progámica, más riesgos hay de que el grano de polen nunca alcance al óvulo (riesgo de aborto), en especial, debido a los factores medioambientales. De esta forma, cuando la germinación del grano de polen no da lugar a ninguna fecundación, esto

conduce a una disminución de la cantidad de granos y de frutos producidos. Por lo tanto, las etapas de germinación del grano de polen y de la elongación del tubo polínico son etapas críticas de la reproducción sexuada de las plantas de flor, y el éxito de esas dos etapas son indispensables para garantizar, posteriormente, la formación de los granos y de los frutos.

Por otra parte, hay estudios que han demostrado que la reproducción sexuada de las plantas recibe el impacto de los cambios climáticos y, en especial, debido a las variaciones de la temperatura [1]. Así, en los años venideros la mayoría de las regiones agrícolas podrían ser sometidas a las fluctuaciones medioambientales importantes con fuertes variaciones de la temperatura [2]. Por otra parte, se ha demostrado que el estrés térmico inducido por las temperaturas frías o cálidas tiene varios efectos importantes sobre los tejidos reproductores, en especial, al momento de la floración que provoca (i) la formación anormal de los órganos parentales, (ii) la asincronía de la maduración de los gametos masculinos y femeninos, (iii) la disminución de la receptividad del estigma al polen, (iv) la reducción de la viabilidad y de la germinación de los granos de polen, y (v) la disminución del crecimiento del tubo polínico [3] [4] [5].

Frente a dichos cambios, es importante encontrar soluciones agronómicas que permitan mejorar la capacidad de las plantas de asegurar la reproducción sexuada, con el objeto de garantizar la producción de los granos y de los frutos.

Una de las soluciones para favorecer la germinación de un grano de polen es seleccionar nuevas especies que sean, por ejemplo, tolerantes a diversos estreses térmicos inducidos por el frío o por el calor, y que puedan de esta forma llevar a cabo las etapas de reproducción sexuada, cualquiera sea la temperatura exterior. Esto se ha realizado, en especial, para el arroz [6], el tomate [7], el garbanzo [8], el poroto [9] o el maní [10].

Otra posibilidad, es aplicar compuestos sobre los granos de polen con el objeto de estimular la reproducción sexuada de las plantas, por ejemplo, estimulando la germinación de los granos de polen, y favoreciendo el crecimiento del tubo polínico. Se ha demostrado, por ejemplo, que la utilización de 24-epibrassinolide (un tipo de brassinoesteroide, una hormona vegetal natural) o de melatonina sobre los granos de polen de tomate favorece la germinación de los granos de polen, y el crecimiento de su tubo polínico.

Por lo tanto, existe una necesidad de encontrar soluciones para garantizar la reproducción sexuada de las

plantas y, en particular, la germinación de los granos de polen. Dentro de ese contexto se sitúa la invención que responde a una necesidad de nuevas soluciones técnicas para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

Ese es el contexto en el cual la solicitante ha puesto de manifiesto, y esto constituye el fundamento de la presente invención, que el lactosuero ácido permitía estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a la utilización de un lactosuero ácido en forma líquida para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen, en el cual un lactosuero ácido en forma líquida se aplica a la planta en una cantidad suficiente para estimular la germinación del grano de polen y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende (i) un lactosuero ácido y (ii) un extracto de alga marrón.

Definiciones

La expresión «lactosuero ácido» designa al producto resultante de la coagulación de la leche por acidificación (también denominada «suero de leche»). El lactosuero ácido puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas: etapa de coagulación de la leche por acidificación, seguida de una etapa de separación de los dos subproductos siguientes (i) la cuajada y (ii) el lactosuero ácido (separación sólido-líquido), eventualmente seguida de una etapa de microfiltración y/o de concentración del lactosuero ácido. La etapa de coagulación de la leche puede realizarse por acción de enzimas (tal como la adición de presión). La acidificación puede obtenerse por medio de bacterias lácticas o por adición de aditivo químico tal como quimosina, cipsosina y/o cardosina. De preferencia, la acidificación se obtiene por medio de bacterias lácticas. La Figura 1 muestra un esquema de subproductos obtenidos a partir de la leche, entre ellos, el lactosuero. En el marco de la presente invención, el lactosuero ácido puede obtenerse a partir de cualquier leche, de preferencia, a partir de leche de vaca, de leche de cabra, y/o de leche de oveja, con mayor preferencia, a partir de leche de vaca. De

preferencia, el lactosuero ácido presenta un pH que va de 3,5 a 5, con mayor preferencia, de 4 a 5, por ejemplo, de aproximadamente 4,5. El lactosuero ácido puede estar constituido por más del 90 % de agua, de aproximadamente, el 5 % de lactosa, de menos del 1 % de proteínas (tales como lactoglobulinas, albúminas, lactoferrinas, caseinomacropéptidos), de menos del 1 % de sales minerales solubles, de menos del 1 % de ácido láctico y de menos del 0,1 % de materias grasas. La preparación de un lactosuero ácido puede comprender una etapa de secado con el objeto de obtener un lactosuero ácido en forma de polvo. El lactosuero ácido en forma de polvo puede entonces mezclarse con un solvente, por ejemplo, de agua antes de su utilización. En el marco de la invención, un lactosuero ácido está en forma líquida lo que permite aplicarlo fácilmente sobre una planta. Por lo general, el lactosuero ácido se comercializa en forma de polvo. De esta forma, el lactosuero ácido en forma seca puede estar diluido en un solvente, por ejemplo, agua antes de ser aplicado sobre la planta.

En el marco de la presente invención, se entiende por «estimular la germinación de un grano de polen de una planta» el hecho de acelerar la emergencia de un tubo polínico a partir de un grano de polen.

En el marco de la presente invención, una «cantidad suficiente» para estimular la germinación de un grano de

polen de una planta corresponde a una cantidad que permite aumentar la velocidad y/o la frecuencia de germinación de un grano de polen de una planta, de al menos el 5 %, ventajosamente, de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, con respecto a la germinación de un grano de polen no tratado. La frecuencia de germinación corresponde al número de granos de polen de una planta que han germinado, con respecto al número total de granos de polen presentes/contabilizados, de dicha planta en un período de tiempo determinado. La medición de la velocidad y/o de la frecuencia de germinación de un grano de polen puede visualizarse con la ayuda de una lupa binocular o de un microscopio. En el Ejemplo 3 se detalla un método de observación y de cuantificación de la velocidad y de la frecuencia de germinación de granos de polen que se lleva a cabo en el marco de la presente invención.

En el marco de la presente invención, una «cantidad suficiente» para estimular la elongación del tubo polínico de un grano de polen de una planta corresponde a una cantidad que permite aumentar la velocidad de elongación y/o la densidad del tubo polínico de un grano de polen al menos el 5 %, ventajosamente, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, con respecto a un tubo

polínico de un grano de polen no tratado. Por otra parte, una cantidad suficiente para estimular la elongación del tubo polínico de un grano de polen de una planta puede traducirse por un aumento de la expresión de los genes implicados en la elongación del tubo polínico de un grano de polen de una planta, en especial, los genes que codifican para las enzimas de tipo calosa sintasa denominados «CalS» y calosa {*mención en tercer idioma*}sintasa-like llamados «CalS like», por un aumento del número de tapones de calosa del tubo polínico y/o por un aumento de la actividad de la enzima pectina metilesterasa, con respecto a un tubo polínico de un grano de polen no tratado. La presencia y la actividad de las calosas sintasa y de pectina metilesterasas al nivel de un tubo polínico puede utilizarse como un marcador de la elongación de un tubo polínico. La longitud del tubo polínico puede ser determinada midiendo el tamaño del tubo polínico en μm , por ejemplo, con la ayuda de una lupa binocular o de un microscopio. En el Ejemplo 3, se detalla un método de medición de la elongación del tubo polínico que puede llevarse a cabo en el marco de la presente invención. En el Ejemplo 3, se detalla un método de medición de la expresión de los genes implicados en la elongación del tubo polínico de un grano de polen de una planta que puede llevarse en el marco de la presente invención, y que puede realizarse con la ayuda de una PCR.

La medición del número de tapones de calosa del tubo polínico puede realizarse por observación microscópica con la ayuda de una coloración, por ejemplo, con anilina azul, del tubo polínico. En el Ejemplo 3, se detalla un método de medición del número de tapones de calosa del tubo polínico.

La expresión «extracto de alga marrón» designa al producto resultante de la extracción del contenido de las células de un alga marrón. El extracto de alga marrón puede obtenerse por un procedimiento que comprende las siguientes etapas: mezcla del alga marrón fresca o seca con agua, de preferencia triturada, con agua, extracción (separación sólido-líquido), y eventualmente, fraccionamiento y/o concentración. El alga marrón puede cosecharse fácilmente de acuerdo con los métodos clásicos descritos en la literatura. El alga marrón seca contiene, por lo general, menos del 5 % de agua, de preferencia, menos del 3 %, en masa con respecto a la masa total de alga. El extracto de alga marrón se obtiene, ventajosamente, por extracción con un solvente acuoso o un solvente orgánico, por ejemplo, con un solvente acuoso. El extracto de alga marrón puede estar en forma seca, por ejemplo, en forma de polvo, o en forma líquida. De esta forma, el agua del extracto de alga marrón puede ser eliminada con el objeto de obtener un extracto de alga marrón más o menos seco o líquido, por ejemplo, que contenga al menos el 1 % de materia seca con respecto a la

masa total del extracto de alga marrón, por ejemplo, al menos el 10 % de materia seca en masa con respecto a la masa total del extracto de alga marrón, por ejemplo, al menos el 20% de materia seca con respecto a la masa total del extracto de alga marrón, el masa el 30 % de materia seca, al menos el 40 % de materia seca, al menos el 50 % de materia seca, al menos el 60 % de materia seca, al menos el 70 % de materia seca, al menos el 80 % de materia seca, al menos el 90 % de materia seca, al menos el 95 % de materia seca, de preferencia, entre el 1 y el 15 % de materia seca, por ejemplo, entre el 3,5 y el 5 % de materia seca. Eventualmente, el extracto puede ser ultrafiltrado con el objeto de obtener una fracción que presenta una actividad mejorada con respecto al extracto de alga marrón no ultrafiltrada. En el marco de la invención, el extracto de alga marrón se encuentra en forma líquida con el objeto de poder ser aplicado fácilmente sobre una planta. De esta forma, el extracto de alga marrón en forma seca puede diluirse en un solvente, por ejemplo, agua antes de ser aplicado sobre una planta. Se puede obtener un extracto de alga marrón mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. De preferencia, el extracto de alga marrón se elige entre un extracto de *Ascophyllum nodosum*, un extracto de *Fucus serratus*, un extracto de *Fucus vesiculosus*, un extracto de *Laminaria hyperborea*, un extracto de *Laminaria*

saccharina, un extracto de *Laminaria digitata*, un extracto de *Laminaria japónica*, un extracto de *Ecklonia máxima*, un extracto de *Macrocystis pyrifera* , un extracto de *Himanthalia elongata* o un extracto de *Sargassum spp*, con mayor preferencia, un extracto de *Ascophyllum nodosum*.

El término «sacarosa» corresponde al compuesto azucarado llamado α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside (nombre UICPA). La sacarosa tiene, principalmente, el siguiente número de CAS: 57-50-1. La sacarosa puede, por ejemplo, extraerse de plantas tales como la caña de azúcar o la remolacha. La sacarosa puede estar en forma seca, por ejemplo, en forma de azúcar blanco o azúcar moreno, o en forma líquida, por ejemplo, en forma de jarabe. En el marco de la invención, la sacarosa está en forma líquida con el objeto de poder aplicar fácilmente dicho extracto sobre una planta. De esta forma, la sacarosa en forma sea puede diluirse en un solvente, por ejemplo, agua antes de ser aplicada sobre una planta.

El término «fertilizante» designa a una sustancia, o a una mezcla de sustancias, natural o de origen sintético, utilizada en agricultura, en horticultura y en silvicultura, para mejorar los suelos, en especial, su estructura y fertilizar las plantas cultivadas. Los fertilizantes comprenden a las sustancias nutrientes y a las enmiendas.

El término «fertilizante» designa materias fertilizantes cuya función principal es la de aportar a las plantas elementos directamente útiles para su nutrición y para su crecimiento (elementos fertilizantes principales, elementos fertilizantes secundarios y oligoelementos).

Utilización y procedimiento de acuerdo con la invención

La presente invención surge de las ventajas sorprendentes, puestas de manifiesto por los inventores, sobre el efecto del lactosuero ácido sobre la germinación de un grano de polen de una planta y/o la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

En efecto, la invención se refiere a la utilización de un lactosuero ácido en forma líquida, para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

La invención también se refiere a un procedimiento para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen, en el cual un lactosuero ácido en forma líquida se aplica a la planta en una cantidad suficiente para estimular la germinación del grano de polen y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

De preferencia, el lactosuero ácido permite estimular la germinación de un grano de polen de una planta y elongación del tubo polínico de dicho grano de polen. En particular, el lactosuero ácido permite aumentar la velocidad de elongación del tubo polínico al menos el 5 %, ventajosamente, de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, con respecto a un grano de polen no tratado con el lactosuero ácido.

En un modo de realización particular, el lactosuero ácido se aplica a la planta a una temperatura exterior que va de 5 a 25 °C, preferentemente, de 8 a 22 °C, por ejemplo de 8 °C, de 13 °C o de 22 °C. Ventajosamente, cuando el lactosuero ácido se aplica a una temperatura exterior que induce un estrés térmico en la planta, el lactosuero ácido permitirá acelerar la germinación de un grano de polen de una planta y la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen. Esto permitirá, principalmente, mejorar el rendimiento de las cosechas, y aumentar el número de granos y de frutos de la planta, mientras que la planta está sometida a una temperatura exterior que puede acarrear daños al proceso de germinación.

En un modo de realización particular, la planta se encuentra en condición de estrés térmico. En particular, la planta se somete a un estrés térmico. Una temperatura que

induce un estrés térmico depende de la especie de la planta considerada. Por ejemplo, un estrés térmico puede ser inducido por una temperatura que va de 5 a 20 °C, por ejemplo, de 7 a 18 °C, por ejemplo, de 8 a 13 °C. Por ejemplo, para los árboles frutales de carozo, un estrés térmico puede ser inducido por una temperatura que va de 7 a 16 °C. De acuerdo con otro ejemplo, para los árboles frutales de semilla, un estrés térmico puede ser inducido por una temperatura que va de 7 a 16 °C.

La aplicación del lactosuero ácido en forma líquida a la planta se realiza, preferentemente, por pulverización sobre las partes aérea de la planta, en especial, sobre las partes aéreas de la planta donde se encuentran el pistilo (es decir, sobre los órganos florales).

El lactosuero ácido puede ser aplicado a la planta en el momento en que se desea estimular la germinación del grano de polen de dicha planta y/o la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen. En particular, el lactosuero ácido puede ser aplicado a la planta en el momento de la floración de la planta, de preferencia, en el momento de la polinización o en el momento de la fecundación de la planta. Ventajosamente, el lactosuero ácido se aplica a la planta al inicio del estadio de la floración (a saber en el momento de la aparición de las primeras flores). En la práctica, el lactosuero ácido puede ser aplicado en pleno

campo o en pleno monte frutal por pulverización del lactosuero ácido en forma líquida sobre las plantas, en especial, en el nivel del pistilo de las flores.

Son posibles varias aplicaciones del lactosuero ácido sobre la planta. El lactosuero ácido puede ser aplicado de 2 a 8 veces sobre la planta. Por ejemplo, una primera aplicación del lactosuero ácido puede efectuarse sobre una planta, luego, una segunda aplicación del lactosuero ácido puede efectuarse sobre esta misma planta varios días, incluso, varias semanas después de la primera aplicación, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 después de la primera aplicación. Por ejemplo, el lactosuero ácido puede ser aplicado 4 a 8 veces sobre un período total de 1 a 3 semanas. Ventajosamente, la primera pulverización del lactosuero ácido se realiza al inicio de la floración, la segunda pulverización de lactosuero ácido se efectúa más de 15 días después de la primera pulverización, y una tercera pulverización se efectúa al final de la floración. El momento preciso de las aplicaciones será elegido en función del período de floración de una planta determinada.

En el marco de la utilización o del procedimiento de acuerdo con la invención, el lactosuero ácido puede ser incorporado en una composición. Dicha composición se presenta entonces en forma líquida. Por ejemplo, el

lactosuero ácido se mezcla con un solvente acuoso, tal como agua. La preparación de dicha composición podrá realizarse utilizando los conocimientos generales del hombre de oficio. La cantidad de lactosuero ácido de la composición puede estar comprendida entre el 0,5 % y el 25 % en peso seco con respecto al peso seco de la composición, de preferencia entre el 1 % y el 10 %, con mayor preferencia, entre el 1 % y el 5 %, por ejemplo, el 1,5 % en peso seco, con respecto al peso seco de la composición.

El lactosuero ácido puede aplicarse a la planta en cantidades variables de acuerdo con las necesidades de la planta, por ejemplo, en una cantidad que va de 0,001 L/ha a 15 L/ha, de preferencia que va de 0,01 a 10 L/ha, con mayor preferencia que va de 0,01 a 1 L/ha, por ejemplo, que va de 0,01 L/ha a 0,1 L/ha, por ejemplo, de 0,03 L/ha.

La composición que contiene el lactosuero ácido puede aplicarse a la planta en cantidades variables de acuerdo con las necesidades de la planta, por ejemplo, en una cantidad que va de 0,1 a 15 L/ha, con mayor preferencia, que va de 1 a 10 L/ha, con mayor preferencia que va de 1 a 5 L/ha, por ejemplo, de 2 L/ha.

La presente invención encuentra su aplicación en el tratamiento de una muy vasta variedad de plantas, de preferencia, de planta a flor, tal como aquellas elegidas entre los angiospermas y los gimnospermas, en particular las

plantas leguminosas, as plantas cerealeras, los árboles frutales, las plantas oleaginosas. De preferencia, las plantas de flores se eligen entre (i) las dicotiledóneas tales como las solanáceas (ej. tabaco, tomates, papas, berenjenas), las quenopodiáceas (ej. remolacha azucarera), las fabáceas (ej. soja, arveja, alfalfa), las cucurbitáceas (ej. Melón, sandía, pepino, zapallo), las crucíferas o brasicáceas (ej. Colza, mostaza), las compuestas (ej. Achicoria), las umbilíferas (ej. zanahoria, comino), las malváceas (ej. algodónero, cacao, okra), las lamiáceas (lavanda) y las rosáceas; (ii) las monocotiledóneas tales como, por ejemplo, los cereales (ej. trigo, cebada, avena, arroz, maíz) y las liliáceas (ej. cebolla, ajo), y (iii) los árboles frutales de carozo y/o de semilla (manzano, cerezo, ciruelo, peral, árbol de damasco, durazno, los kiwis). También de manera preferida, las plantas de flores se eligen entre el tomate y la viña.

En un modo de realización de la invención, el lactosuero ácido puede aplicarse en asociación con sacarosa y/o en asociación con un extracto de alga marrón. De preferencia, el lactosuero ácido puede aplicarse en asociación con un extracto de *Ascophyllum nodosum*. También de manera preferida, el lactosuero ácido puede aplicarse en asociación con sacarosa y un extracto de *Ascophyllum nodosum*. El extracto de alga marrón y/o la sacarosa también

se aplican en forma líquida. Por ejemplo, la sacarosa puede aplicarse a la planta simultáneamente, antes o después de la aplicación del lactosuero ácido, de preferencia, simultáneamente con la aplicación del lactosuero ácido. El extracto de alga marrón puede aplicarse a la planta simultáneamente, antes o después de la aplicación del lactosuero ácido, de preferencia, simultáneamente con la aplicación del lactosuero ácido. Por ejemplo, el extracto de alga marrón y/o la sacarosa puede aplicarse a la planta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días, antes o después de la aplicación del lactosuero ácido. Por ejemplo, el lactosuero ácido se aplica a la planta simultáneamente con la sacarosa, luego, el extracto de alga marrón se aplica a la planta, por ejemplo, algunos días después. Ventajosamente, el lactosuero ácido, la sacarosa y el extracto de alga marrón se aplican simultáneamente a la planta.

Cuando el lactosuero ácido se aplica en asociación con la sacarosa y/o un extracto de alga marrón, la sacarosa y/o el extracto de alga marrón también se aplican, preferentemente, a la planta en el momento de la floración de la planta, de preferencia, en el momento de la polinización o en el momento de la fecundación. Cuando el lactosuero ácido se aplica en asociación con la sacarosa y/o un extracto de alga marrón, la sacarosa y/o el extracto de

alga marrón también se aplican, preferentemente, por pulverización, en especial, sobre las partes aéreas de la planta donde se encuentra el pistilo.

Cuando el lactosuero ácido se aplica simultáneamente con la sacarosa y/o con el extracto de alga marrón, se pueden incorporar directamente en una misma composición. Dicha composición se describe, principalmente, en la parte «composición de acuerdo con la invención».

El extracto de alga marrón puede aplicarse a la planta en cantidades variables, de acuerdo con las necesidades de la planta, por ejemplo, en una cantidad que va de 0,001 L/ha a 15 L/ha, de preferencia, que va de 0,01 a 10 L/ha, con mayor preferencia que va de 0,01 a 1 L/ha, por ejemplo, que va de 0,01 L/ha a 0,05 L/ha, por ejemplo, de 0,02 L/ha o de 0,03 L/ha.

La sacarosa puede aplicarse a la planta en cantidades variables de acuerdo con las necesidades de la planta, por ejemplo, en una cantidad que va de 0,001 L/ha a 15 L/ha, de preferencia que va de 0,01 a 10 L/ha, con mayor preferencia que va de 0,01 a 1 L/ha, por ejemplo, que va de 0,01 L/ha a 0,1 L/ha, por ejemplo, de 0,02 L/ha.

Composición de acuerdo con la invención

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende (i) un lactosuero ácido y (ii) un extracto de alga marrón.

Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención comprende (i) un lactosuero ácido y (ii) un extracto de *Ascophyllum nosodum*.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender además (iii) sacarosa. Ventajosamente, la composición de acuerdo con la invención comprende (i) un lactosuero ácido, (ii) un extracto de *Ascophyllum nosodum* y (iii) sacarosa.

La cantidad de lactosuero ácido de la composición de acuerdo con la invención puede estar comprendida entre el 0,5 % y el 25 % en peso seco, con respecto al peso seco de la composición, de preferencia entre el 1 % y el 10 % en peso seco, con mayor preferencia entre el 1,5 % en peso seco, con respecto al peso seco de la composición.

La cantidad de extracto de alga marrón de la composición de acuerdo con la invención puede estar comprendida entre el 0,5 % y el 25 % en peso seco con respecto al peso seco de la composición, de preferencia, entre el 1% y el 10 % en peso seco, con mayor preferencia, entre el 0,5 % y el 5 %, por ejemplo, entre el 0,5 % y el 2 % en peso seco, por ejemplo, entre el 1 % y el 1,5 % en peso seco, con respecto al peso seco de la composición.

La cantidad de sacarosa de la composición de acuerdo con la invención puede estar comprendida entre el 0,5 % y el 25 % en peso seco, con respecto al peso seco de la

composición, de preferencia entre el 1 % y el 10 % en peso seco, con mayor preferencia, entre el 1 y el 5 % en peso seco, por ejemplo, el 1 % en peso seco, con respecto al peso seco de la composición.

La relación másica en peso seco entre el extracto de alga marrón y el lactosuero ácido puede estar comprendido entre 0,02 y 50, preferentemente entre 0,1 y 10, con mayor preferencia, entre 0,1 y 5, por ejemplo, entre 0,5 y 1.

La relación másica en peso seco entre la sacarosa y el lactosuero ácido puede estar comprendida entre 0,02 y 50, preferentemente, entre 0,1 y 10, con mayor preferencia, entre 0,2 y 5, por ejemplo, entre 0,6 y 0,7.

Un ejemplo de composición de acuerdo con la invención comprende:

- entre el 0,5 % y el 25 %, por ejemplo, el 1,5 %, en peso seco de lactosuero ácido, con respecto al peso seco de la composición,

- entre el 0,5 % y el 25 %, por ejemplo, entre el 1 y el 1,5 %, en peso seco de extracto de alga marrón, con respecto al peso seco de la composición, y

- entre el 0,5 % y el 25%, por ejemplo, el 1 %, en peso seco de sacarosa, con respecto al peso seco de la composición.

Un ejemplo particular de composición de acuerdo con la invención comprende:

- el 1,5 % en peso seco de lactosuero ácido, con respecto al peso total de la composición.
- el 1% en peso seco de sacarosa, con respecto al peso total de la composición,
- del 1 al 1,5 % en peso seco de extracto de alga marrón, con respecto al peso seco de la composición.

La composición de acuerdo con la invención puede estar en forma seca (por ejemplo, en forma de polvo) o en forma líquida. De preferencia, la composición está en forma líquida para poder ser aplicada directamente a la planta en floración. Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención está en forma de polvo y se mezcla con un solvente, tal como agua, antes de ser aplicada sobre la planta en floración, La preparación de dicha composición podrá realizarse utilizando los conocimientos generales del hombre de oficio, por ejemplo, mezclando el polvo con un solvente, bajo agitación.

La composición de acuerdo con la invención puede ser utilizada para estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o para la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen. Esto permitirá, principalmente, mejorar el rendimiento de las cosechas y aumentar el número de granos y de frutos de una planta.

La composición de acuerdo con la invención también puede utilizarse para llevar a cabo un procedimiento que

permite estimular la germinación de un grano de polen de una planta y/o de estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen, en el cual dicha composición de acuerdo con la invención se aplica a la planta en una cantidad suficiente para estimular la germinación del grano de polen y/o para estimular la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen, y en el cual la composición está en forma líquida. Las características de la utilización y del procedimiento descritos en la parte «utilización y procedimiento» son aplicables a la utilización de la composición de acuerdo con la invención o a la composición de acuerdo con la invención para llevar a cabo el procedimiento.

En particular, la composición de acuerdo con la invención comprende una cantidad suficiente de (i) lactosuero ácido (ii) de extracto de alga marrón, y opcionalmente, de (iii) sacarosa, para tener un efecto sobre la estimulación de la germinación del grano de polen, y/o la elongación del tubo polínico de dicho grano de polen.

La composición de acuerdo con la invención puede ser aplicada a la planta en cantidades variables de acuerdo con las necesidades de la planta tratada, por ejemplo, en una cantidad que va de 0,1 a 15 L/ha, con mayor preferencia que va de 1 a 10 L/ha, con mayor preferencia, que va de 1 a 5 L/ha, por ejemplo, de 2 L/ha.

La composición conforme a la invención también puede comprender, (iv) un fertilizante, de preferente, un abono. Dichas composiciones permiten responder de la menor manera a las necesidades de crecimiento de la planta que se expresarán, principalmente, en términos de mejora del desarrollo de la planta, y del rendimiento. La composición puede comprender uno o varios fertilizantes.

A título de ejemplos de abonos que pueden ser utilizados en la composición, se citarán los abonos líquidos y los abonos hidrosolubles.

El abono puede ser una o varias sustancias elegidas entre la urea, el sulfato de amonio, el nitrato de amonio, el fosfato, el cloruro de potasio, el sulfato de amonio, el nitrato de magnesio, el fosfato, las sales de fosfato, el cloruro de potasio, el nitrato magnesio, el nitrato de manganeso, el nitrato de zinc, el nitrato de cobre, el ácido fosfórico, el nitrato de potasio, el sulfato de potasio, el sulfato de calcio, el cloruro de calcio y el ácido bórico.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Figura 1 representa un esquema de la transformación de la leche cruda en diferentes subproductos, entre ellos el lactosuero.

[Fig. 2] La Figurl 2 representa el porcentaje en tubo polínico viable con el correr del tiempo en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución

control). Las Figuras 2 A, 2 B y 2 C muestran el porcentaje en tubo polínico viable con el correr del tiempo en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución control) a una temperatura de 8 °C, 13 °C y 22 °C, respectivamente. Las figuras 2 D, 2 E, 2 F, 2 G, 2 H, 2 I muestran las imágenes de la emergencia de los tubos polínicos viables con el correr del tiempo e la condición control (columna de la izquierda) y en la condición LAA + sacarosa (columna de la derecha) a las temperaturas de 8 °C, 13 °C y 22 °C.

[Fig. 3] La Figura 3 representa la densidad y la longitud del tubo polínico en micrómetro (μm) en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución control) después de 4 horas. Las figuras 3 A, 3 B y 3 C muestran la longitud del tubo polínico en micrómetro (μm) en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución control) a una temperatura de 8 °C, 13 °C y 22 °C, respectivamente.

[Fig. 4] La Figura 4 representa el porcentaje de tubos polínicos que tienen de 0 a 6 tapones de calosa en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución control) a una temperatura de de 8 °C, 13 °C y 22 °C respectivamente. Las Figuras 4 A, 4 B y 4 C muestran imágenes de granos de polen y de tubos polínicos en condición control a una temperatura de 8 °C, 13 °C y 22 °C,

respectivamente, e indica la presencia de tapones de calosa por una cabeza de flecha. Las Figuras 4 D, 4 E y 4 F muestran imágenes de granos de polen y de tubos polínicos en condición LAA + sacarosa a una temperatura de 8 °C, 13 °C y 22 °C, respectivamente, e indican la presencia de tapones de calosa por una cabeza de flecha.

[Fig. 5] La Figura 5 muestra la expresión relativa de cuatro genes CalS en función de los tratamientos aplicados (solución LAA + sacarosa o solución control) y a una temperatura de 8 °C, 13 °C y 22 °C, respectivamente. El gráfico arriba a la izquierda muestra la expresión del gen Solyc01g006370.3. El gráfico abajo a la izquierda muestra la expresión del gen Solyc01g73750.3. El gráfico arriba a la derecha muestra la expresión del gen Solyc11g005985.1. El gráfico abajo a la derecha muestra la expresión del gen Solyc11g005980.2.

[Fig. 6] La Figura 6 representa el porcentaje de granazón (a saber, el número de frutos formados) en damascos que han sido tratados por pulverización foliar con un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 7] La Figura 7 representa el peso promedio de los damascos en la cosecha, en damascos que han sido tratados por pulverización foliar con un tratamiento a base de una

solución LAA + sacarosa o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 8] La Figura 8 representa el rendimiento de damascos en la cosecha, en damascos que han sido tratados por pulverización foliar con un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 9] La Figura 9 representa el número de racimos de uva en viñas que han sido tratadas por pulverización foliar con un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 10] La Figura 10 representa el rendimiento de las uvas en la cosecha, en viñas que han sido tratadas por pulverización foliar con un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 11] La Figura 11 representa el número de frutos obtenidos por parcela, en la cosecha en perales que han sido tratados por pulverización foliar con un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa, un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa + extracto de alga *Ascophyllum Nodosum* o un tratamiento testigo a base de agua.

[Fig. 12] La Figura 12 representa el peso promedio de frutos en la cosecha en perales que han sido tratados por pulverización foliar con un tratamiento a base de una

solución LAA + sacarosa, un tratamiento a base de una solución LAA + sacarosa + extracto de alga *Ascophyllum Nodosum* o un tratamiento testigo a base de agua.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de alga marrón de tipo *Ascophyllum Nodosum*

Método

Se ha preparado un extracto de *Ascophyllum Nodosum* de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Etapas 1: Lavado

Se han sometido algas de tipo *Ascophyllum nodosum* a dos lavados sucesivos con el objeto de eliminar la arena y la tierra.

Etapas 2: Secado

Las algas así lavadas han sido escurridas y luego secadas, ya sea en una estufa con renovación de aire, o en un horno de túnel con el objeto de obtener un porcentaje de humedad de aproximadamente el 10 %.

Etapas 3: Trituración

Las algas secas han sido luego trituradas en polvo en una granulometría comprendida entre 250 y 600 µm.

Etapas 4: Extracción

Se han dispersado 100 kg de algas secas y trituradas en un reactor de calor que contiene 900 kg de agua acidificada

a pH 2,5, y previamente calentado a 45 °C. El conjunto ha sido mantenido bajo agitación durante 3 horas.

Etapas 5: Separación

El extracto soluble ha sido liberado de los fragmentos de algas por centrifugación o por decantación/filtración sobre un filtro de tierra de diatomeas o un filtro de placa.

Etapas 6 Conservación

Para estabilizar bacteriológicamente el extracto, se ha agregado el 0,1 % de benzoato de sodio y el 0,1 % de sorbato de potasio bajo agitación, y se ha subido el pH del extracto a 3,5 con una solución de NaOH al 30 %.

El extracto líquido concentrado así obtenido comprende entre el 3,5 y el 5 % en peso de extracto seco (a saber 35 a 50 g de materia seca por litro de extracto concentrado). El extracto concentrado así obtenido corresponde al extracto utilizado en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2: Preparación de una composición de acuerdo con la invención que comprende lactosuero ácido, y un extracto de alga marrón de tipo *Ascophyllum Nodosum*

Se ponen en solución 15 gramos de lactosuero ácido en polvo en solución en 100 mL de agua, con el objeto de obtener una solución concentrada de lactosuero ácido al 15 % en peso seco.

Se han puesto en solución 10 gramos de sacarosa (en forma de polvo y sólido) en 100 mL de agua con el objeto de

obtener una solución concentrada en sacarosa al 10 % en peso seco.

Se han mezclado 300 mL de un extracto concentrado de alga marrón de tipo *Ascophyllum nodosum* (que comprende del 3,5 al 5 % en peso seco de un extracto) obtenido en el Ejemplo 1 con la solución de 100 mL de lactosuero ácido y con la solución de 100 mL de sacarosa. Se ha agregado agua con el objeto de obtener una composición final de un volumen total de 1 litro. La concentración final de lactosuero ácido es del 1,5 %, la concentración final de sacarosa es de un 1 %, y la concentración final de extracto de alga seco está comprendido entre el 1 y el 1,5 %.

[Tabla 1]

Composición en forma líquida	Cantidad en peso seco (%)	Cantidad en L
Extracto de alga marrón de tipo <i>Ascophyllum Nodosum</i> (extracto concentrado que comprende del 3,5 al 5 % de materia seca)	1 al 1,5 %	300 mL
Lactosuero ácido (solución al 15 % en peso seco de lactosuero ácido)	1,5 %	100 mL
Sacarosa (solución al 10 % en peso seco de sacarosa)	1 %	100 mL
Agua	QSP	500 mL

Ejemplo 3: Efecto de una solución que comprende lactosuero ácido sobre la germinación y la elongación de granos de polen resultantes de *Solanum lycopersicum*

Material y método

Se han plantado plantas de tomate de tipo *Solanum lycopersicum* (variedad de granos de cerasiforme 'West Virginia 106') a 1 cm bajo la superficie de suelo esterilizado, y se los ha cultivado en una cámara de crecimiento. Las plantas han sido cultivadas en condiciones óptimas con ciclos de 16 h de luz a una temperatura de 25 °C y de 8 h de oscuridad a una temperatura de 22 °C. La humedad relativa ha sido mantenida al 60 %, y las plantas han sido regadas cada 2 días. En el momento de la floración, las flores han sido cosechadas con el objeto de recoger los granos de polen.

Cultivo de granos de polen y de los tubos polínicos

Los granos de polen han sido recogidos a partir de anteras recién dehiscentes. Se han sumergido las etaminas de cinco flores en 5 mL de medio BK [1,62 mM H₃BO₃, 1,25 mM Ca (NO₃)₂, 4H₂O, 2,97 mM KNO₃ y 1,65 mM MgSO₄, 7H₂O] que contiene el 10 % (w/v) de sacarosa (Brewbaker y Kwack, 1963). Los granos de polen han sido puestos en suspensión en el medio BK por vórtex y las etaminas han sido retiradas con pinzas pequeñas. Los tubos polínicos de tomates han sido

cultivados en placas de 24 cavidades (de ThermoFisher), en la oscuridad, sin agitación, a varias temperaturas: 8, 13, 22 °C. Las observaciones han sido efectuadas después de 2, 4 y 6 h de crecimiento. Un grano de polen ha sido considerado como germinado cuando la longitud del tubo polínico superaba el diámetro del grano de polen.

Procedimiento de preparación de una solución LAA + sacarosa:

Se han mezclado 15 g de polvo de lactosuero ácido con 1 L de agua con el objeto de obtener una solución de LAA concentrada al 1,5 % en peso seco (es decir 1,5 g para 100 mL). Se han agregado 10 g de sacarosa a esta solución (es decir el 1 % en peso seco de sacarosa agregado a la solución de LAA, es decir 1 g para 100 mL).

Procedimiento de preparación de una solución que comprende un extracto de *Ascophyllum Nodosum*:

Se ha preparado una solución acuosa que tiene una concentración del 4 % en peso seco de extracto de *Ascophyllum nodosum*.

Tratamientos aplicados:

Los tratamientos siguientes han sido agregados al medio de cultivo de los granos de polen y/o de los tubos polínicos:

- Tratamiento con una solución de lactosuero ácido y sacarosa, denominado «LAA + sacarosa» preparada de acuerdo

con el procedimiento descrito anteriormente. La solución de LAA + sacarosa ha sido diluida con el agua milli-Q para alcanzar una concentración final de lactosuero ácido de 2 µg/mL de medio BK.

- Tratamiento con una solución de agua Milli-Q utilizada como control negativo.

- Tratamiento que combina simultáneamente una solución de lactosuero ácido + sacarosa y una solución de extracto de *Ascophyllum nodosum*. La solución de LAA + sacarosa ha sido diluida con el agua milli-Q para alcanzar una concentración final de lactosuero ácido de 2 µg/mL de medio BK. Se ha diluido la solución de extracto de *Ascophyllum nodosum* con agua milli-Q para alcanzar una concentración final de extracto de *Ascophyllum Nodosum* de 2 µg/mL de medio BK.

Parámetros medidos mediante microscopio

Se ha utilizado un microscopio invertido Leica DMI 6000B equipado con cámara Leica DFC 450 para observar la evolución en el tiempo de la germinación de los granos de polen y la elongación del tubo polínico. Se ha observado el depósito de tapones de calosa bajo epifluorescencia con la ayuda de un filtro de absorción 405 nm y de un filtro de emisión 523 nm. Se ha utilizado el programa ImageJ [11] para medir el porcentaje de germinación del tubo polínico, la elongación del tubo polínico, el número de tapones de calosa.

Análisis estadísticos

Los datos corresponden al promedio de 6 réplicas biológicas realizadas con fechas diferentes. Las diferencias significativas entre el control y el tratamiento han sido determinadas por el método ANOVA con un factor seguido del test de comparación múltiple de Dunnett. Los datos han sido marcados con diferentes letras cuando difieran con respecto a las condiciones de control (valor $P < 0,05$). Para la germinación, representa entre 1000 y 2000 granos de polen contados para cada repetición y puntos temporales. Para la longitud del tubo polínico, el número de mediciones variaba de 80 a 120 tubos polínicos observados para cada repetición.

Medición del número de germinación de los granos de polen, de la longitud de los tubos polínicos y de su densidad

El número de granos de polen que ha germinado versus el número de granos de polen que no han germinado o que tienen un tubo polínico explotado ha sido contado para el control, el tratamiento con la solución LAA + sacarosa, y el tratamiento con la solución LAA + sacarosa (concentración final de LAA de 2 $\mu\text{g/mL}$) en combinación con la solución que comprende un extracto de *Ascophyllum nodosum* (concentración final de extracto de *Ascophyllum nodosum* de 2 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 2: Se ha observado un aumento del número de granos de polen para el cual un tubo polínico «viable» ha emergido cuando la

solución LAA + sacarosa ha sido aplicada in vitro sobre los granos de polen de tomates a las temperaturas de 8 °C, 13 °C y 22 °C. También se ha observado un aumento del número de granos de polen para el cual un tubo polínico «viable» ha emergido cuando la solución LAA + sacarosa se aplica en combinación con la solución que comprende un extracto de *Ascophyllum nodosum*, principalmente, con 52,99 granos de polen que tiene un tubo polínico viable con la combinación LAA + sacarosa + extracto de *Ascophyllum nodosum*, 46,91 99 granos de polen que tienen un tubo polínico viable con la solución LAA + sacarosa y 35,91 granos de polen que tiene un tubo polínico viable para el control. Esos resultados muestran el efecto de la utilización del lactosuero ácido sobre la estimulación de la germinación del grano de polen, así como el efecto de la asociación con la sacarosa, y el extracto de *Ascophyllum nodosum*.

[Tabla 2]

Temperatura en °C	Tratamiento aplicado	Número de grano de polen no germinado	Número de grano de polen para el cual ha emergido un tubo polínico «viable».	Número de grano de polen para el cual ha emergido un tubo polínico «explotado».
8 °C	Control	98,30 ± 0,57	0,52 ± 0,28	1,18 ± 0,36
	LAA +	94,08 ± 1,69*	5,05 ± 1,71	0,86 ± 0,30

	sacarosa			
	LAA + sacarosa + Extracto de <i>Ascophyllum nodosum</i>	99,45 ± 0,30	0,55 ± 0,30	0,00 ± 0,00
13 °C	Control	61,87 ± 1,94	35,91 ± 1,82	2,22 ± 0,47
	LAA + sacarosa	50,03 ± 1,85*	46,91 ± 1,82*	3,05 ± 0,59
	LAA + sacarosa + Extracto de <i>Ascophyllum nodosum</i>	45,60 ± 1,88*	52,99 ± 1,72*	1,41 ± 0,56
22 °C	Control	16,71 ± 2,00	66,95 ± 2,24	16,34 ± 1,48
	LAA + sacarosa	15,55 ± 2,07	67,23 ± 1,94	17,22 ± 1,40
	LAA + sacarosa + Extracto de <i>Ascophyllum nodosum</i>	14,74 ± 3,71	71,42 ± 2,87	13,84 ± 1,78

La figura 2 muestra el efecto de la temperatura y de los tratamientos sobre la morfología del tubo polínico y la viabilidad.

A la temperatura óptima de 22 °C para el crecimiento *in vitro* de tubos polínicos de tomates, la germinación era rápida con el 67 % de granos de polen germinados y de tubos polínicos viables después de 2 h de cultivo para el control (Figuras 2C, 2F), y 67 % para el tratamiento con la solución LAA + sacarosa (Figuras 2C, 2I).

El tratamiento con la solución LAA + sacarosa ha favorecido la germinación del polen a 8 °C con un aumento de la germinación de los granos de polen después de 4 h (figuras 2A, 2D, 2G). Después de 6 h, 48 % de los granos de polen han germinado, y los tubos polínicos eran morfológicamente normales después de la aplicación del tratamiento LAA + sacarosa, con respecto al control (36 %) (figura 2A y figuras 2D, 2G). Una vez efectuadas la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico 13 °C, la morfología y la integridad del tubo polínico también han sido muy bien conservados (figuras 2B, 2E, 2H). El tratamiento con la solución LAA + sacarosa tuvo efectos positivos sobre el número de tubos polínicos, a las 2, 4 y 6 h de cultivo (figura 2B) a la temperatura de 13 °C. En particular, después de 2 h de cultivo, el tratamiento con la

solución LAA + sacarosa ha permitido la germinación del 46 % de los granos de polen.

El gráfico de densidad de la longitud de los tubos polínicos después de 4 h a las temperaturas de 8, 13 y 22 °C (Figura 3) muestra el efecto del tratamiento con la solución LAA + sacarosa sobre la elongación del tubo polínico. En efecto, a una temperatura de 8 °C, el tubo polínico tiene una longitud de 100 µm para el control, de 150 µm cuando se los trata con la solución LAA + sacarosa (figura 3A). A una temperatura de 13 °C, el tubo polínico tiene una longitud de 120 µm para el control, y era significativamente más elevado cuando se los trató con la solución LAA + sacarosa con una longitud de 150 µm (Figura 3B). A una temperatura de 22 °C, el tubo polínico tiene una longitud de 280 µm para el control, y era significativamente más elevado cuando se los trató con la solución LAA + sacarosa con una longitud de 300 µm (Figura 3C).

Se ha determinado la duración necesaria para alcanzar el 50 % del porcentaje de germinación (valor D), y los resultados se presentan en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Tratamiento	D a 8 °C	D a 13 °C	D a 22 °C
Control	4 h 40	1 h 45	0 h 53
Solución LAA + sacarosa	3 h 05	1 h 20	0 h 50

El tratamiento con la solución LAA + sacarosa ha disminuido los valores D a las temperaturas testeadas con un efecto mayor a 8 y 13 ° C. En efecto, D 8 ° C y D 13 ° C con la solución LAA + sacarosa eran, respectivamente, de 3 h 05 y 1 h 20 (tabla 3).

Determinación del número de tapones de calosa

Coloración citoquímica de los tapones de calosa

Los tubos polínicos han sido fijados después de una duración de cultivo que corresponde a 4 veces la duración necesaria para obtener el 50 % del porcentaje de germinación más elevado del control a cada temperatura testada (Tabla 4). El medio de fijación (100 mM de PIPES, 4 mM MgSO₄, 7 H₂O, 4 mM EGTA, 10% (w/v) de sacarosa y el 5 % (v/v) de paraformaldehído a pH 7,5) ha sido agregado al medio BK, y luego, incubados durante una noche a 4 °C con los tubos polínicos. Los tubos polínicos han sido centrifugados a 4 000 g durante 7 min. El culote ha sido puesto nuevamente en suspensión 250 µl de medio BK fresco.

[Tabla 4]

Tratamiento	4*D a 8 °C	4*D a 13 °C	4*D a 22 °C
Control	18 h 409	7 h	3 h 30
Solución LAA + sacarosa	12 h 20	5 h 20	3 h 20

A las temperaturas de 22 °C y 13 °C, se ha agregado el 0,3 % de azul de anilina decolorado (DAB) preparado en un tampón fosfato de 100 mM a pH 12 (Johnson-Brousseau y McCormick, 2004) al medio en una concentración final del 0,05 %. Se ha utilizado a 8 °C una doble coloración con DAB y con calcofluor blanco en las concentraciones final del 0,05 % y el 0,1 %, respectivamente. Las observaciones se han efectuado después de 2 h de incubación en la oscuridad, a la temperatura ambiente.

Resultados:

La figura 4 muestra el número de tapones de calosa formados en función de los tratamientos aplicados. El número de tapones de calosa es más elevado durante el tratamiento con la solución LAA + sacarosa. En condición de cultivo a una temperatura de 13 °C con el tratamiento con la solución LAA + sacarosa, el porcentaje de tubo polínico que presentaba más de 3 tapones de calosa era del 40 %, y el porcentaje de tubo polínico que presentaba más de 4 tapones de calosa era del 18 %. En condición testigo a una temperatura de 13 °C, el porcentaje de tubo polínico que presentaba más de 3 tapones de calosa era del 35 %, y el porcentaje de tubo polínico que presentaba más de 4 tapones de calosa era del 8 %. De esta forma, la utilización de una solución LAA + sacarosa sobre los polenes y tubos polínicos ha permitido aumentar la formación de los tapones de calosa.

Medición de la expresión de los genes CalS por qRT-PCR

La expresión génica de cuatro secuencias de genes CalS (Figura 5) (*Solyc01g73750.3*, *Solyc01g006370.3*, *Solyc11g005980.2* et *Solyc11g005985.1*.) en el genoma del tomate ha sido medida utilizando el análisis TBLASTN [12].

Extracción de ARN y análisis de la expresión génica

El ARN ha sido extraído del cultivo de los granos de polen de dos flores de tomate en 2 ml de medio de germinación BK para cada tratamiento (testigo, solución LAA) a 8, 13, et 22 ° C. Las muestras han sido recogidas a D8°C, D13°C y D22°C (tabla 3). Al inicio, el medio de germinación BK ha sido retirado del cultivo de los granos de polen después de la centrifugación, y reemplazado por 1 ml de NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Los tubos polínicos han sido luego hendidos por flujo-reflujo y sometidos a vórtex. La extracción del ARN total ha sido realizada utilizando Nucleospin® RNA del kit NucleoZOL siguiendo el protocolo del fabricante (Macherey- Nagel, Düren, Alemania). La calidad del ARN extraído ha sido verificada en 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EE. UU.), y posterior tratamiento con DNase (kit Turbo DNA-free®) y la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN, con la ayuda del kit de síntesis de ADNc claro iScript™ gDNA (Bio-Rad, CA, Estados Unidos de Norteamérica). Las muestras de

ADNc diluidas han sido utilizadas para estudiar la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (CFX384 Touch [™], Bio-Rad, CA, EE. UU.) en un volumen total de 10 µl utilizando la tecnología «SoAdvanced Universal SYBR Green Supermix» (Bio-Rad, CA, Estados Unidos de Norteamérica). Todas las reacciones qPCR han sido realizadas con técnica triple utilizando reacciones de ADNc independientes para cada uno de los seis replicados biológicos y 300 nM de pares de iniciadores específicos del gen. El protocolo de la oscilación térmica comprendía una sola etapa de activación de la polimerasa a 98 ° C durante, 3 min seguido de 40 ciclos de amplificación, una etapa final de extensión a 72 ° C durante 5 min también como análisis de la curva de fusión. Cada ciclo de amplificación comprendía una etapa de desnaturalización a 98 °C durante 15 s, una etapa de recocido del iniciador durante 30 s, y una breve extensión a 72 °C durante 15 s. Para cada par de iniciadores, la eficacia de los iniciadores ha sido determinada efectuando un análisis de curva estándar utilizando diluciones en serie. Los datos de expresión han sido adquiridos y analizados con la ayuda del *software* CFX Maestro versión 1.1 (Bio-Rad, CA, Estados Unidos de Norteamérica). Los iniciadores específicos para todos los genes candidatos y de referencia se indican en la tabla 5.

[Tabla 5]

Gen	Sequence Id	Iniciador
<i>CalsS</i> cDNA XM_019211256.2	<i>Solyc11g005980.2</i>	Iniciador directo: CGTCGAGTCTTGCTTCTCGT (SEQ ID NO : 1) Iniciador indirecto: AGCTGAGCTCTGTCTGCTTG (SEQ ID NO: 2)
<i>CalsS</i> cDNA XM_004228545.4	<i>Solyc11g005985.1</i>	Iniciador directo: AGTGGGAAGAACAGCTTCGG (SEQ ID NO : 3) Iniciador inverso: CTTCTCCGTGCTTCGAGGTT (SEQ ID NO : 4)
<i>CalsS</i> cDNA XM_026029202.1	<i>Solyc01g006370.3</i>	Iniciador directo: AAGTGATTGCACGGGAAGC (SEQ ID NO : 5) Iniciador inverso: CTGAAGCAGTCCACTGACCA (SEQ ID NO : 6)
<i>CalsS</i> cDNA XM_026031249.1	<i>Solyc01g073750.3</i>	Iniciador directo: AGGAGGATTATGGAGTTGCTG (SEQ ID NO : 7) Iniciador inverso: GCAACTTCCTCTTAACCTTACCAA (SEQ ID NO : 8)

Resultados:

El efecto de los esfuerzos de frío no se ve acompañado por fuertes variaciones de la expresión de los genes *CalS* en la condición testigo. Los resultados presentados en la Figura 5 muestran una variación de la expresión de los genes *CalS*, con respecto a la condición testigo cuando la solución LAA + sacarosa ha sido aplicada, cualquiera sea la temperatura. Se observa, en especial, un aumento de la expresión del gen *Solyc01g006370.3*. De esta forma, la utilización de la solución LAA + sacarosa sobre los granos de polen y los tubos polínicos ha permitido aumentar de forma global la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de calosa a diferentes temperaturas exteriores, en especial, los genes que codifican para las enzimas de tipo calosa sintasa *CalS* y calosa sintasa-like *CalS* like.

Ejemplo 4: Demostración de los efectos de la utilización del lactosuero ácido sobre los árboles de damasco

Protocolo experimental

El ensayo se ha desarrollado sobre una parcela de árboles de damasco plantados en 2007 (*Prunus armeniaca*; variedad Mele Cot). Este ensayo apunta a demostrar el efecto del lactosuero ácido sobre el desarrollo del fruto, en

especial, durante la granazón, fase inicial de la formación del fruto. Se ha medido el rendimiento de la cosecha.

Se han utilizado cinco árboles de la variedad Mele Cot injertados mediante portainjerto Mirabolan (variedad conocida para tener un bajo porcentaje de formación del fruto después de la reproducción sexuada en el árbol de damasco). Para este ensayo se han comparado realizados por pulverización foliar:

- un tratamiento que consiste en una solución LAA + sacarosa: Se han disuelto 15 g de lactosuero ácido en forma de polvo en 1 L de agua y mezclado a 10 g de sacarosa en forma de polvo (es decir una solución que comprende el 1,5 % en peso seco de lactosuero ácido y el 1 % en peso seco de sacarosa, con respecto al peso total de la solución). Se han realizado tres aplicaciones de la solución LAA + sacarosa en una concentración de 2L/ha en el estadio fenológico BBCH 59,64 ey69 de los árboles.

- un tratamiento testigo para el cual se ha aplicado agua en forma de pulverización foliar en los mismos estadios fenológicos (a saber, BBCH 59,64 y 69).

Los árboles de damasco han sido tratados con un tratamiento fitosanitario usual para evitar la destrucción de la cosecha por parásitos.

Posteriormente, los árboles de damasco han sido cosechados en el estadio BBCH99.

Resultados:

El porcentaje de granazón (a saber, el número de frutos formados) ha sido calculado para cada uno de los dos tratamientos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6. Los resultados muestran que cuando se ha aplicado la solución LAA + sacarosa, el porcentaje de granazón determinado en BBCH 73 ha aumentado, pasando del 6,9 % para la condición testigo, al 8,5 % para la solución LAA + sacarosa.

El peso promedio de los damascos en el momento de la cosecha ha sido calculado para cada uno de los dos tratamientos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7. Los resultados muestran que cuando se aplica la solución LAA + sacarosa el peso promedio de los damascos en el momento de la cosecha determinado en BBCH 99 ha aumentado, pasando de 58 gramos para la condición testigo a 70 gramos para la solución LAA + sacarosa.

Por último, el rendimiento en el momento de la cosecha ha sido calculado para cada uno de los dos tratamientos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8. Los resultados muestran que cuando se ha aplicado la solución LAA + sacarosa, el rendimiento en el momento de la cosecha determinado en BBCH 99 ha aumentado, pasando de 4,1

toneladas para la condición testigo a 4,25 toneladas para la solución LAA + sacarosa.

Ejemplo 5: Demostración de los efectos de la utilización de lactosuero ácido sobre la viña

Protocolo experimental

El ensayo se ha desarrollado en una parcela de viñas plantadas en 2003 (*Vitis vinifera*; variedad *Sugraone*). Este ensayo tiene como objeto demostrar el efecto del lactosuero ácido en combinación con un extracto de *Ascophyllum nodosum* sobre el rendimiento y la calidad del grano de uva de mesa en el momento de la cosecha.

Para este ensayo se han comparado dos tratamientos foliares:

- un tratamiento que consiste en una solución LAA + sacarosa: Se han disuelto 15 g de lactosuero ácido en forma de polvo en 1 L de agua y se han mezclado con 10 g de sacarosa en forma de polvo (es decir una solución que comprende el 1,5 % en peso seco de lactosuero ácido y el 1 % en peso seco de sacarosa, con respecto al peso total de la solución). Se han realizado tres aplicaciones de la solución LAA + sacarosa en una concentración de 2 L/ha en el estadio fenológico BBCH 59, 64 y 69 de los pies de viña.

- un tratamiento testigo para el cual se ha aplicado agua en forma de pulverización foliar dentro del marco de la floración en el estadio fenológico BBCH 57, 65 y 69.

Para cada modalidad, se han tratado siete pies de viña. Los pies de viña han sido tratados con un tratamiento fitosanitario usual para evitar la destrucción de la cosecha por parásitos.

Luego se han cosechado los racimos y los granos de uva en el estadio 99.

Resultados:

Se ha determinado el número de racimos por pie de viña en el momento de la cosecha para cada uno de los tres programas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9. Estos resultados muestran que, en el testigo, se han contado 8,12 racimos en promedio por pie de viña. Cuando se ha aplicado la solución LAA + sacarosa, el número de racimos contado era de 8,78 por pie de viña.

El rendimiento de los granos de uva en el momento de la cosecha ha sido determinado para cada uno de los dos programas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 10. Estos resultados muestran que, en el testigo, el rendimiento de granos de uva por parcela era de 53,98 kg (es decir 15,93 toneladas por hectárea). Cuando se ha aplicado

la solución LAA + sacarosa, el rendimiento por parcela era de 54,68 kg (es decir, 16,140 toneladas por hectárea).

Ejemplo 6: Demostración de la utilización de lactosuero ácido en combinación con un extracto de *Ascophyllum nodosum* en perales

Protocolo experimental

El ensayo se ha desarrollado en una parcela de perales plantados en 2003 peral (*Pyrus communis*; variedad Concorde). Este ensayo tiene como objeto demostrar el efecto del lactosuero ácido en combinación con un extracto de *Ascophyllum nodosum* sobre el rendimiento de la pera.

Se han utilizado seis árboles de la variedad Concorde. Para este ensayo se han comparado tres tratamientos aplicados por pulverización foliar:

- un tratamiento que consiste en una solución LAA + sacarosa: Se han disuelto 15 g de lactosuero ácido en forma de polvo en 1 L de agua y se han mezclado con 10 g de sacarosa en forma de polvo (es decir una solución que comprende el 1,5 % en peso seco de lactosuero ácido y el 1 % en peso seco de sacarosa, con respecto al peso total de la solución). Se han realizado tres aplicaciones de la solución LAA + sacarosa en una concentración de 2 L/ha en el estadio fenológico BBCH 59, 64 y 69 de los árboles.

- se ha aplicado un tratamiento que consiste en una solución LAA + sacarosa + alga que corresponde a la solución del Ejemplo 2. Se han realizado tres aplicaciones de la solución LAA + sacarosa + alga (preparada de acuerdo con el Ejemplo 2) en una concentración de 2 L/ha en el estadio fenológico BBCH 59, 64 y 69 de los árboles.

- se ha preparado un tratamiento testigo para el cual se ha aplicado agua en forma de pulverización foliar en el marco de la floración en el estadio fenológico BBCH 59, 64 y 69 de los árboles.

Los perales han sido tratados con un tratamiento fitosanitario usual para evitar la destrucción de la cosecha por parásitos.

Luego, se han cosechado las peras en el estadio BBCH99.

Resultados:

El número de frutos obtenidos por parcela en el momento de la cosecha, ha sido determinado para cada uno de los tres tratamientos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11. Estos resultados muestran que en el testigo, se han producido 10 kg de peras por parcela, mientras que cuando se ha aplicado la solución LAA + sacarosa en combinación con el extracto de *Ascophyllum Nodosum*, se han producido 12 kg de peras por parcela.

El peso promedio de los frutos en el momento de la cosecha ha sido determinado para cada uno de los tres tratamientos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 12. Estos resultados muestran que en la condición testigo, el peso promedio de un fruto era de 116,47 gramos. Cuando se ha aplicado la solución LAA + sacarosa, el peso promedio de un fruto era entonces de 117,58 gramos. Por último, cuando se ha aplicado el extracto de *Ascophyllum Nodosum* con la solución LAA + sacarosa, el peso promedio de un fruto era de 131,77 gramos. Por lo tanto, esto muestra claramente el efecto sinérgico de la combinación del lactosuero ácido con un extracto de *Ascophyllum Nodosum* sobre el peso de los frutos en el momento de la cosecha.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lamaoui et al., 2018
2. GIEC 2014, Hoegh-Guldberg et al., 2018
3. Zamir et al., 1981;
4. Kakani et al., 2002;
5. Boavida y MacCormick, 2007
6. Prasad et al., 2006
7. Zamir et al., 1982
8. Clarke y Siddique, 2004
9. Porch y Jahn, 2001
10. Kakani et al., 2002
11. Abramoff et al., 2004

12. Altschul et al., 1997